

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BEYİNE HEDEFLENDİRİLMİŞ BEVASİZUMAB YÜKLÜ NANOPARTİKÜLER
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Sedenay AKBAŞ

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2020**

ÖZET

Akbas, S., Beyine hedeflendirilmiş Bevasizumab yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve etkinliklerinin değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020. Bu çalışmada, Bevasizumab'ın (BVZ) beyne hedeflendirilmesi amacıyla, kan-beyin endotelinde eksprese olduğu bilinen transferrin reseptörlerine (TfR) spesifik bağlanan Anti-CD71 antikoru ile konjuge edilmiş poli (laktik-ko-glikolik asit)-Poli etilen glikol (PLGA-PEG) nanopartiküller hazırlanmıştır. Konjugasyon basamağında, sentezlenen Oleil Sisteinamid (OCA) molekülü kullanılmıştır. Anti-CD71 antikoru konjuge edilen nanopartiküllerin kontrol grupları olarak, Anti-CD71 ile aynı yapıda ancak reseptöre spesifik olmayan İzotip Kontrol antikoru konjuge edilmiş nanopartiküller kullanılmıştır. BVZ, aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllere yüklenerek enkapsülasyon etkinliği ve salım özellikleri değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları bEnd.3 ve hCMEC/D3 endotel hücreleri ve U87 glioma hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu üç hücre hattında hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin sitotoksitesi araştırılmıştır ve antikoru ile antikoru konjuge nanopartiküllerin bu hücrelerin yüzeyindeki TfRlere bağlanma afiniteleri araştırılmıştır. KBB'den geçiş aşamasında, ilaç taşıyıcı sistemin reseptör aracılı endositozunun gerçekleşeceği bEnd.3 ve hCMEC/D3 hücreleri ile hücre içerisine alım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve oluşturulan monokültür transitoz deneyleri ile BVZ'nin in vitro KBB'den geçişi gösterilmiştir. Nil kırmızısı yüklenmiş nanopartiküllerin, KBB'yi geçişi in vivo deneylerle araştırılmış ve floresan mikroskop ile gösterilmiştir. Nude farelerde in vivo GBM modeli geliştirilmiş ve ilaç yüklenmiş kontrol grupları ile ilaç yüklenmiş Anti-CD71 antikoru konjuge edilmiş nanopartikül gruplarının etkinlikleri karşılaştırılmıştır. BVZ yüklü ve aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin verildiği fare grubu, diğer fare gruplarına göre daha uzun süre hayatta kalmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nanoteknoloji, PLGA, BVZ, Transitoz, Glioma, bEnd.3, hCMEC/D3

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 216S704).

ABSTRACT

Akbas, S., Preparing and evaluating the effectiveness of BVZ loaded nanoparticulate drug delivery systems targeted to the brain, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Technology Program PhD Thesis, Ankara, 2020.

In this study, in order to target Bevacizumab to the brain, PLGA-PEG nanoparticles conjugated with Anti-CD71 antibodies that bind specifically to transferrin receptors known to be expressed in the blood-brain endothelium were prepared. In the conjugation step, synthesized OCA molecule was used. As the control groups of the anti-CD71 antibody conjugated nanoparticles, nanoparticles conjugated with Isotype Control antibodies, which are the same as Anti-CD71 but not specific to the receptor, were used. Bevacizumab was loaded into actively targeted nanoparticles to evaluate encapsulation efficiency and release properties. Cell culture studies were performed on bEnd.3 and hCMEC / D3 endothelial cells and U87 glioma cells. The cytotoxicity of the drug delivery system prepared in these three cell lines was investigated and the binding affinities of antibodies and antibody conjugated nanoparticles to TfRs on the surface of these cells were investigated. In the transition phase of the blood-brain barrier, intake studies were carried out with bEnd.3 and hCMEC / D3 cells, in which the receptor-mediated endocytosis of the drug delivery system would occur, and the in vitro passage of bevacizumab through the blood-brain barrier was demonstrated with the monoculture transcytosis experiments. The passage of Nile red loaded nanoparticles across the blood brain barrier was investigated by in vivo experiments and demonstrated by fluorescence microscopy. An in vivo GBM model was developed in nude mice and the efficacy of drug loaded control groups and drug loaded Anti-CD71 antibody conjugated nanoparticle groups were compared. The group of mice loaded with bevacizumab and given actively targeted nanoparticles survived longer than other groups of mice.

Keywords: Nanotechnology, PLGA, BVZ, Transcytosis, Glioma, bEnd.3, hCMEC / D3

This study was supported by TÜBİTAK (Project No: 216S704).

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xiii |
| ŞEKİLLER | xv |
| TABLolar | xix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Beyne İlaç Hedeflendirilmesi | 2 |
| 2.1.1. Kan-Beyin Bariyeri | 2 |
| 2.1.2. Beyne İlaç Hedeflendirme Stratejileri | 5 |
| 2.2. Beyne İlaç Hedeflendirmede Nanoteknolojik Yaklaşımlar | 11 |
| 2.2.1. Nanoteknoloji | 11 |
| 2.2.2. Nanobiyoteknoloji | 14 |
| 2.3. Glioblastoma Multiforme | 16 |
| 2.4. Bevasizumab | 20 |
| 2.5. Poli(laktik ko-glikolik asit) Polimeri | 23 |
| 2.6. Nanopartikül-Aktif Hedefleme Ajanı Antikor Konjugasyon Stratejileri | 26 |
| 2.7. Hücre Kültürü Çalışmaları | 29 |
| 2.7.1. Fare (bEnd.3) ve İnsan (hCMEC/D3) Beyin Endotelial Hücreleri | 29 |
| 2.7.2. Hücrelerin Canlılıkları Üzerine Nanopartiküllerin Etkilerinin Değerlendirilmesi | 30 |
| 2.7.3. Nanopartiküllerin Hücre İçerisine Alım ve Transitoz Çalışması | 31 |
| 2.8. İn vivo Glioblastoma Multiforme Modelinin Oluşturulması | 33 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 35 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Kullanılan Cihazlar ve Yazılımlar | 35 |
| 3.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler | 36 |
| 3.3. Bevasizumab'ın Ticari Ürün Formülasyonundan Elde Edilmesi | 37 |
| 3.4. Bevasizumab Miktar Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu | 38 |
| 3.5. Bevasizumab Ön Stabilite Çalışmaları | 42 |
| 3.6. İlaç Taşıyıcı Sistemin Tasarlanması | 45 |
| 3.6.1. Oleil Sisteinamid Sentezi ve Analizleri | 47 |
| 3.7. Nanopartiküllerin Hazırlanması | 50 |
| 3.8. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu | 54 |
| 3.8.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini | 54 |
| 3.8.2. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi | 54 |
| 3.8.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi | 55 |
| 3.8.4. İn Vitro Salım Deneyleri | 55 |
| 3.8.5. Stabilite Çalışmaları | 55 |
| 3.9. İn Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları | 56 |
| 3.9.1. Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi | 56 |
| 3.9.2. Nanopartiküllerin Hücre İçerisine Alım Çalışmaları | 56 |
| 3.9.3. Antikor-Reseptör Bağlanma Testleri | 57 |
| 3.9.4. Oluşturulan İn Vitro Kan Beyin Engeli Modelinden Nanopartiküllerin Transitozunun Değerlendirilmesi | 59 |
| 3.10. İn vivo Çalışmalar | 60 |
| 3.10.1. Nanopartiküllerin in vivo Kan Beyin Bariyerini Geçişinin Gösterilmesi | 60 |
| 3.10.2. İn vivo Glioblastoma Multiforme Modelinin Geliştirilmesi | 61 |
| 3.10.3. İn vivo Glioma Modeli Geliştirilmiş Farelerde İlaç Taşıyıcı Sistemin Etkinliğinin Değerlendirilmesi | 62 |
| 3.11. İstatistiksel Analiz | 63 |
| 4. BULGULAR | 64 |
| 4.1. BVZ için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu | 64 |
| 4.2. BVZ Ön Stabilite Çalışmaları | 71 |
| 4.2.1. Bevasizumab Üzerinde Sıcaklık Etkisinin Değerlendirilmesi | 71 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.2. Bevasizumab Üzerine pH Etkisinin Değerlendirilmesi | 73 |
| 4.2.3. Bevasizumab Üzerine Mekanik Stres Etkisinin Değerlendirilmesi | 75 |
| 4.3. İlaç Taşıyıcı Sistemin Tasarlanması | 77 |
| 4.3.1. Oleil Sisteinamid Analizleri | 77 |
| 4.4. Nanopartiküllerin Hazırlanması | 80 |
| 4.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu | 83 |
| 4.5.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini | 83 |
| 4.5.2. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi | 85 |
| 4.5.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi | 89 |
| 4.5.4. İn Vitro Salım Deneyleleri | 90 |
| 4.5.5. Stabilite Çalışmaları | 90 |
| 4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları | 94 |
| 4.6.1. Güvenlilik Çalışmaları; Boş Nanopartiküllerin bEnd.3, hCMEC/D3 ve U87 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması | 94 |
| 4.6.2. Hücre İçine Alım Çalışmaları | 99 |
| 4.6.3. Antikor-Reseptör Bağlanma Testleri | 101 |
| 4.6.4. Transitoz Çalışmaları | 104 |
| 4.7. İn vivo Çalışmalar | 106 |
| 4.7.1. Beyne Hedeflendirilmiş Nanopartiküllerin, Kan Beyin Bariyerini Geçişlerinin in vivo Çalışmalarla Gösterilmesi | 106 |
| 4.7.2. İn vivo Glioma Modelinin Geliştirilmesi | 108 |
| 4.7.3. İn vivo Glioblastoma Multiforme Modelinde BVZ Yüklü Hedeflendirilmiş Nanopartiküllerin Etkinliklerinin İncelenmesi | 111 |
| 5. TARTIŞMA | 115 |
| 5.1. Nanopartiküllerin Ara Molekül Sentezi ile Hazırlanması, Aktif Hedeflendirilmesi ve Karakterizasyonu | 115 |
| 5.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Aktif Hedeflendirilmiş Nanopartiküllerin Sitotoksitesilerinin, Hücre İçine Alımlarının ve Transitozlarının Değerlendirilmesi | 121 |
| 5.3. İn vivo Çalışmalarla Aktif Hedeflendirilmenin Gösterilmesi | 124 |

| | |
|--|-----|
| 5.4. İn vivo Glioma Modelinde Beyne Hedeflendirilmiş Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemin Etkinliğinin Değerlendirilmesi | 125 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 127 |
| 7. KAYNAKLAR | 129 |
| 8. EKLER | |
| EK 1: Etik Kurul Onay Belgesi | |
| EK 2: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası | |
| EK 3: Orjinallik Ekran Çıktısı | |
| EK 4: Dijital Makbuz | |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------------|--|
| AFM | Atomik Kuvvet Mikroskobu |
| Anti-CD71 NP | Anti-CD71 antikoru ile konjuge edilmiş OCA-PLGA-PEG nanopartiküller |
| BCA | Bikinkoninik asit |
| bEnd.3 | Fare Beyin Endotelyal Hücreleri |
| BVZ | Bevasizumab |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| DLS | Dinamik Işık Saçılımı |
| DMEM | Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı |
| DMF | Dimetil Sülfoksit |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| EE | Enkapsülasyon Etkinliği |
| FBS | Fetal Bovin Serum |
| FDA | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi |
| FITC | Florosein İzosiyanat |
| GBM | Glioblastoma Multiforme |
| hCMEC/D3 | İnsan Serebral Mikrovasküler Endotel Hücreleri |
| KBB | Kan-Beyin Bariyeri |
| Kontrol NP | İzotip Kontrol Antikoru ile konjuge edilmiş OCA-PLGA-PEG nanopartiküller |
| LC-SMCC | süksinimidil-4-(N-maleimidometil)siklohegzan-1-karboksi-(6-amidokaproat) |
| mAb | Monoklonal antikor |
| MFI | Ortalama Floresan Yoğunluğu |
| MTT | 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür |
| OCA | Oleil Sisteinamid |
| PBS | Fosfat Tamponlu Tuz |
| PDI | Polidispersite İndeksi |

| | |
|----------------|---|
| PEG | Polietilen Glikol |
| PLGA | Poli(laktik-ko-glikolik asit) |
| SDS | Sodyum Dodesil Sülfat |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskobu |
| TfR | Transferrin Reseptörü |
| U87 | İnsan Glioblastoma Multiforme Hücreleri |
| U87-Luc | Lusiferaz Eksprese Eden İnsan Glioblastoma Multiforme Hücreleri |
| VEGF | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |

ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|--|--------------|
| 2.1. Kan beyin bariyerini oluşturan yapıların şematik gösterimi | 4 |
| 2.2. Nanopartiküllerin KBB'ye penetrasyon mekanizmaları | 10 |
| 2.3. Kan beyin bariyeri ve glioblastoma multiforme çevresi | 19 |
| 2.4. Bevasizumab etki mekanizması, angiogenesisi VEGF'e bağlarak, VEGF'in kendi reseptörüne bağlanmasını inhibe ederek sağlar | 22 |
| 2.5. Sistemik dolaşımında, hedeflendirilmiş nanopartiküllerin, serum proteinleri ve opsoninler ile kaplanması | 26 |
| 2.6. Nanopartiküllere antikor konjugasyonu stratejileri | 28 |
| 2.7. bEnd.3 hücreleriyle oluşturulan kan beyin engeli modeli | 32 |
| 2.8. Transepitelyal/transendotelyal elektriksel direnç (TEER), hücre tabakasının ölçülen elektrik direncini ifade eder, hücre tabakasının bütünlüğü ve permeabilitesi hakkında bilgi verir. | 32 |
| 3.1. Bevasizumab'ın formülasyon bileşenlerinden diyaliz yöntemi ile ayrılması çalışması görüntüsü | 38 |
| 3.2. ELISA çalışma prensibi şematik gösterimi. | 39 |
| 3.3. Tasarlanan ilaç taşıyıcı sistem: Anti-CD71 antikoruna konugue edilmiş PLGA-PEG Nanopartikülü | 46 |
| 3.4. Oleil Sisteinamid sentezi | 48 |
| 3.5. A) Oleil Sisteinamid, B) Maleimid ile aktiveleştirilmiş mAb, C) Yüzeyine Oleil Sisteinamid molekülleri yerleşmiş olan PLGA Nanopartikülü. | 52 |
| 4.1. Bevasizumab ELISA kalibrasyon eğrisi | 64 |
| 4.2. Bevasizumab ELISA Doğruluk çalışması, 1. Gün verileri | 65 |
| 4.3. Bevasizumab ELISA Doğruluk çalışması, 2. Gün verileri | 66 |
| 4.4. Bevasizumab ELISA Doğruluk çalışması, 3. Gün verileri | 66 |
| 4.5. Bevasizumab ELISA Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması, 1. Gün verileri | 67 |
| 4.6. Bevasizumab ELISA Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması, 2. Gün verileri | 68 |
| 4.7. Bevasizumab ELISA Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması, 3. Gün verileri | 68 |
| 4.8. Bevasizumab ELISA Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması, 4. Gün verileri | 69 |
| 4.9. Bevasizumab ELISA Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması, 5. Gün verileri | 69 |
| 4.10. Bevasizumab ELISA Deney içi tekrarlanabilirlik çalışması, 1.deney verileri | 70 |
| 4.11. Bevasizumab ELISA Deney içi tekrarlanabilirlik çalışması, 2.deney verileri | 70 |
| 4.12. Bevasizumab ELISA Deney içi tekrarlanabilirlik çalışması, 3.deney verileri | 71 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 4.13. | Bevasizumab ELISA Doğruluk çalışması verileri | 71 |
| 4.14. | Bevasizumab'ın yoğunluk olarak agregasyon T_{onset} analizleri | 72 |
| 4.15. | Bevasizumab'ın T_{onset} noktasının belirlenmesi | 73 |
| 4.16. | Bevasizumab partikül büyüklüğü üzerine pH etkisinin, DLS yöntemi ile incelenmesi | 75 |
| 4.17. | Bevasizumab partikül büyüklüğü üzerine mekanik stresin etkisi, DLS yöntemi ile incelenmesi | 76 |
| 4.18. | Oleil Sisteinamid sentezi deney görüntüleri. | 77 |
| 4.19. | Asetonitrilde çözülmüş, sentezlenen Oleil Sisteinamid (MW= 385 g mol ⁻¹)'nin Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi | 78 |
| 4.20. | DMSO'da çözülmüş olan Oleil Sisteinamid'in HNMR spektrumu. | 79 |
| 4.21. | Yüzey Gerilimi (Atensiyon) cihazı İki farklı yöntem ile Oleil Sisteinamid yüzey aktivitesinin ölçülmesi | 79 |
| 4.22. | Ellman's Analizi UV Visible Spektrometresi Kalibrasyon Eğrisi ve kalibrasyon denklemi | 80 |
| 4.23. | BCA Analizi kalibrasyon eğrisi | 82 |
| 4.24. | Bevasizumab yüklü Anti-CD71 NPLerin DLS yöntemi ile ölçülmüş partikül büyüklüğü dağılımı | 84 |
| 4.25. | Bevasizumab yüklü Kontrol NPLerin DLS yöntemi ile ölçülmüş partikül büyüklüğü dağılımı | 84 |
| 4.26. | Bevasizumab yüklü Kontrol NPLerin 3D ve 2D AFM görüntüleri | 86 |
| 4.27. | Bevasizumab yüklü Anti-CD71 NPLerin 3D ve 2D AFM görüntüleri | 87 |
| 4.28. | Bevasizumab yüklü Anti-CD71 NPLerin SEM görüntüleri | 88 |
| 4.29. | Bevasizumab yüklü Kontrol NPLerin SEM görüntüleri | 89 |
| 4.30. | Bevasizumab'ın nanopartiküllerden farklı pH'larda in vitro salım grafiği | 90 |
| 4.31. | Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüklerindeki değişimler | 91 |
| 4.32. | Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin polidispersite indekslerindeki değişimler | 91 |
| 4.33. | Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerindeki değişimler | 92 |
| 4.34. | 37°C'de MEM besiyeri içerisinde nanopartiküllerin ve MEM ortamının DLS yöntemi ile ölçülen partikül büyüklükleri | 93 |
| 4.35. | 37°C'de MEM besiyeri içerisinde nanopartiküllerin ve MEM ortamının DLS yöntemi ile ölçülen polidispersite indeksleri | 93 |
| 4.36. | bEnd.3 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine nanopartiküllerin etkisi | 94 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| 4.37. | hCMEC/D3 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine nanopartiküllerin etkisi | 95 |
| 4.38. | U87 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine nanopartiküllerin etkisi | 96 |
| 4.39. | bEnd.3 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine, Bevasizumab yüklü nanopartiküllerin etkisi | 97 |
| 4.40. | hCMEC/D3 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine, Bevasizumab yüklü nanopartiküllerin etkisi | 98 |
| 4.41. | U87 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine, Bevasizumab yüklü nanopartiküllerin etkisi | 99 |
| 4.42. | Hazırlanan floresan işaretli Anti-CD71 NP ve Kontrol NPLerin bEnd.3 hücrelerine uygulanmasının ardından belirlenen pozitif hücrelerin floresan yoğunluklarının karşılaştırılması | 100 |
| 4.43. | Hazırlanan floresan işaretli Anti-CD71 NP ve Kontrol NPLerin hCMEC/D3 hücrelerine uygulanmasının ardından belirlenen pozitif hücrelerin floresan intensitelerinin karşılaştırılması | 100 |
| 4.44. | Anti-CD71 NP (solda) ve Kontrol NPLerin (sağda) bEnd.3 hücrelerinde hücre içine alımlarının floresan mikroskobu görüntüsü | 101 |
| 4.45. | bEnd.3, hCMEC/D3 ve U87 hücrelerine Anti-CD71 ve izotip kontrol antikoların bağlanması | 102 |
| 4.46. | Fare Anti-CD71 konjuge edilmiş (kırmızı) ve İzotip kontrol antikoru konjuge edilmiş (mavi) nanopartiküllerin BEnd.3 hücrelerinin reseptörlerine bağlanmasını gösteren akım sitometri analizi | 102 |
| 4.47. | İnsan Anti-CD71 konjuge edilmiş ve İzotip kontrol antikoru konjuge edilmiş partiküllerin hCMEC/D3 hücrelerinin reseptörlerine bağlanmasını gösteren akım sitometri analizi | 103 |
| 4.48. | İnsan Anti-CD71 konjuge edilmiş (kırmızı) ve İzotip kontrol antikoru konjuge edilmiş partiküllerin (mavi) U87 hücrelerinin reseptörlerine bağlanmasını gösteren akım sitometri analizi | 103 |
| 4.49. | 6 kuyucuklu transwell görüntüsü, insertlere bEnd.3 hücreleri ekilmiş ve DMEM eklenmiş transwell görüntüsü | 104 |
| 4.50. | Transwell içindeki insertlere ekilmiş olan b.End.3 hücrelerinde TEER ölçümü görüntüsü | 105 |
| 4.51. | Nil kırmızısı içeren hedefli ve kontrol nanopartikül gruplarının farelere iv olarak verilmesinden 16 saat sonra alınan beyin kesitlerinin floresan mikroskop görüntüsü | 107 |
| 4.52. | Nude farelerin beynine ekilen U87-LUC hücrelerinin, in vivo görüntüleme cihazı ile haftalık sinyal takibi görüntüleri | 109 |
| 4.53. | U87 hücrelerinin nude farelerde oluşturduğu tümör dokusuna ait Hematoksilen-Eozin Boyamaları (1.Fare) | 110 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| 4.54. | U87 hücrelerinin nude farelerde oluşturduğu tümör dokusuna ait Hematoksilen-Eozin Boyamaları (2.Fare) | 110 |
| 4.55. | U87 hücrelerinin nude farelerde oluşturduğu tümör dokusuna ait Hematoksilen-Eozin Boyamaları (3.Fare) | 111 |
| 4.56. | Geliştirilen in vivo Glioblastoma Multiforme modelinde, ilaç gruplarının tümör büyümelerinin izlenmesi | 112 |
| 4.57. | İn vivo Glioblastoma Multiforme modelinde ilaç gruplarının uygulanması sonrası farelerin % ağırlık değişimi | 113 |
| 4.58. | İn vivo Glioblastoma Multiforme modelinde ilaç gruplarının uygulanması sonrası MFI Lusiferaz Aktivitesi | 114 |
| 5.1. | Reseptör aracılı endositozun şematik gösterimi | 123 |

TABLolar

| Tablo | | Sayfa |
|--------------|---|--------------|
| 2.1. | Kanser immünoterapisinde kullanılan başlıca monoklonal antikorlar ve hedef antijenleri | 21 |
| 3.1. | BVZ partikül büyüklüğü için ölçüm parametreleri | 43 |
| 3.2. | BVZ'ın agregasyon noktası analizi için ölçüm parametreleri | 44 |
| 4.1. | OCA-PLGA ve PLGA NPLerin Ellman's Assay sonucunda hesaplanan yüzey sülfidril konsantrasyonu. | 81 |
| 4.2. | OCA-PLGA ve PLGA nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri | 81 |
| 4.3. | BCA Analizi verileri | 83 |
| 4.4. | Hazırlanan nanopartiküllerin DLS ölçüm verileri | 85 |

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, ilaç geliştirme çalışmalarında son yıllarda üzerinde sıklıkla çalışılan alanlardan birisidir. Ancak ilaç geliştirme uzun süren ve zahmetli bir süreçtir. Her ne kadar nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler üzerine her geçen yıl daha fazla araştırma yapılsa ve veri üretilse de nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde çeşitli zorluklar karşımıza çıkmaktadır. Bu zorlukların öngörülebilmesi için preklinik çalışmalar önem kazanmaktadır.

Bu doktora tezi kapsamında beyne ilaç hedeflendirme stratejileri üzerinde durulmuştur. Merkezi sinir sistemi hastalıkları ya da beyin tümörleri gibi kan beyin bariyerinden (KBB) ilaç geçişinin sınırlı olması sebebiyle tedavi zorluğu yaşanan hastalıklarda, aktif hedeflendirme ile ilacın hedeflenen dokuya daha düşük dozda ulaştırılması, hastanın yaşam kalitesi açısından üstünlük sağlayacaktır.

Beyne aktif hedeflendirilmiş ve BVZ yüklenmiş ilaç taşıyıcı sistemin hazırlanmasında PLGA nanopartiküller tercih edilmiş olup, aktif hedeflendirme amacıyla, beyin endotel hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilen TfR'ye spesifik Anti-CD71 antikoru kullanılmıştır. Tez kapsamında, KBB'nin in vitro modellenmesi ve in vivo Glioblastoma Multiforme (GBM) modelinin geliştirilerek, ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğinin değerlendirilmesi sağlanmıştır. Elde edilen verilerin, bu alanda yapılacak çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyne İlaç Hedeflendirilmesi

2.1.1. Kan-Beyin Bariyeri

İnsan beyninde, yaklaşık 664 km kan damarı bulunmaktadır ve bu damarlar, beyin hücrelerine oksijen ve enerji metabolitlerini iletmek, karbondioksit ile diğer atıkları uzaklaştırmakla görevlidirler. Beyin, toplam vücut ağırlığının %2'si kadar olsa da, tüm vücudun tükettiği enerjinin %20'sini tüketmektedir. Merkezi sinir sistemi, kendisini çeşitli patojenlerden, toksik moleküllerden ve dolaşımdaki kan hücrelerinden korumak amacıyla, birçok bariyer içermektedir. Serebrospinal sıvı-kan bariyeri, kan-beyin bariyeri (KBB), kan-retinal bariyer ve kan-spinal kord bariyeri bunlardan bazılarıdır. Tüm bu bariyerler arasında KBB en önemli ve en geniş olanıdır (1-3).

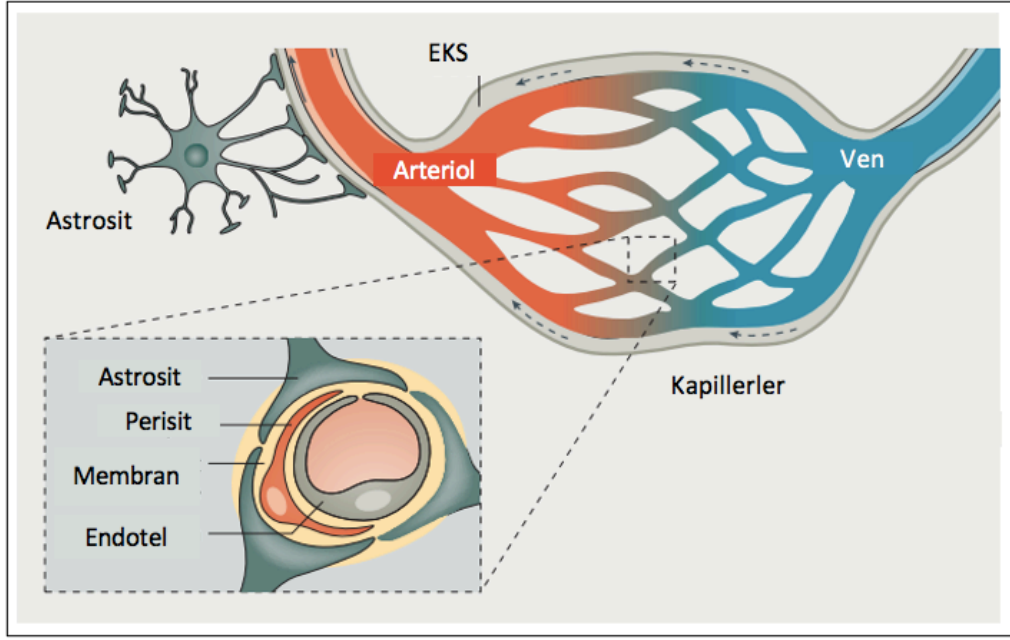
KBB, nöral doku ve kan arasında konumlanan, hayati öneme sahip bir bariyerdir. Bu bariyer; beynin homeostazını sağlayarak, iyon ve molekül geçişlerini kontrol eder. Bu yüzden beynin korunmasında rolü çok büyüktür. Bu bariyerde meydana gelen fizyolojik ya da patolojik bir bozulma ise, kişide nörodejenerasyona veya nöroinflamasyona sebep olmaktadır. Alzheimer's ve Parkinson gibi hastalıklarda da yine KBB'de problemler gözlenmekte, KBB'nin geçirgenliği artmakta ve böylece beyin, çeşitli tehlikelere karşı savunmasız kalmaktadır. Nanoteknolojik yaklaşımlar ile, beyne hedeflendirme sağlanabilmekte, nörodejeneratif hastalıklara karşı da bu nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler umut olabilmektedir (4).

Kapillerler ise en küçük serebral kan damarlarıdır ve KBB'nin %85'ini oluştururlar. Kan ve beyin arasında madde geçişleri için geniş bir yüzey alanı sağlarlar. KBB'de yer alan kapiller damarlar, sistemik kapillerlere göre çok daha az transitoza izin verirler. Geçiş için, en uygun olan moleküllerin ya özelleşmiş olmaları gerekir ya da transport aracılı geçiş ile KBB'den geçmeleri gerekir. KBB bütünlüğü, beyin interstisyel sıvının kimyasal bileşimi için çok önemlidir. İnterstisyel sıvı ise, sinaptik iletimlerde, bilginin işlenmesinde ve nöral iletkenlikte çok önemli rol oynamaktadır. KBB bütünlüğünün bozulması, yüksek vasküler geçirgenliğe sebep olarak, serebral

kan akışının azalmasına yol açar. Bu patolojik durumda, KBB'den normalde geçemeyecek olan toksik kan molekülleri, mikrobiyal ajanlar beyne girerek inflamatuvar ya da immun yanıtlara yol açabilirler. Bu patolojik durum, Alzheimer's, Parkinson, Huntington, Multiple Skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda ya da GBM gibi beyin tümörlerinin varlığında ortaya çıkmaktadır (5).

KBB, ilaçların beyne geçişini engellemede birincil faktörlerden birisidir. İlacın molekül büyüklüğü, yağda çözünübilirliği, hidrofilitesi, disosiyasyon katsayısı ve diğer birçok fizikokimyasal özelliği, KBB geçişinde önemli rol oynamaktadır. Küçük moleküllü ilaçların %98'i KBB'yi geçememekte ve bu durum merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (3, 6).

Anatomik olarak, KBB'nin %99'u endotel hücrelerden oluşan membrandan meydana gelmektedir. KBB'nin 3 ana bölümü; iç tabakada beyin endotel hücreleri ve bunları birbirine bağlayan sıkı kavşaklar , orta tabakada matriks ve periferel hücreler ve dış tabakada ise astrositler ve ekstraselüler matriks olarak tanımlanabilmektedir (Şekil 2.1). KBB'nin en temel hücreleri endotel hücrelerdir ve bir ilacın beyne geçişi için bu hücrelerden geçmesi gerekmektedir. Endotel hücrelerin ve astrositlerin oluşturduğu fiziksel bariyerin yanında, çeşitli enzimlerden ve transporterlerden oluşan bir de biyokimyasal bariyer bulunmaktadır. Bu yapılar birlikte KBB bütünlüğünün ve seçici geçirgen özelliğinin korunmasında rol almaktadırlar. Astrositler, nöronları koruyan ve destekleyen glial hücrelerdir. Bu hücreler, nörotransmitter ve iyon konsantrasyonlarını kontrol ederek, nöral mikroçevrenin homeostatik dengesini korurlar. Astrositler aynı zamanda endotel hücrelerle ilişki içindediler; end-feet uzantıları serebral kabillerlerin abluminal tarafında bulunmaktadır. Böylece KBB bütünlüğü ile ilgili önemli bir rol üstlenmekte ve KBB yapısını desteklemektedirler. Son zamanlardaki in vitro ve in vivo çalışmalara göre, astrositlerden salınan çeşitli efektör moleküller bariyerin sızdırmazlığını koruma ve artırma yönünde etkili olduğunu ortaya koymuştur (7, 8).



Şekil 2.1. Kan beyin bariyerini oluşturan yapıların şematik gösterimi (ecs: ekstraselüler boşluk) (6)

Perisitler, kapiller çapı, serebral kan akışı ve ekstraselüler matriksteki protein sekresyonunu regüle eden, KBB'nin en önemli bileşenlerinden biri olan perivasküler hücrelerdir. Platelet türevi büyüme faktörünün (PdgfB) durdurulduğu farelerde perisitlerin tamamen kaybolması durumunda, merkezi sinir sistemi mikrokanaamalarına rastlanmış, sıkı kavşaklarda (tight junctions, TJ) fonksiyon bozuklukları meydana gelmiş, vasküler permeabilite artmıştır. Perisitler KBB bütünlüğünü sağlamakla birlikte, astrosit ayaklarının serebral damarlara yönelmesine de rehberlik etmektedir. Beyin endotelial hücreleri ise okludin, kludin, 1-3-5-12, membran ilişkili guanilat kinazlar, ZO1, ZO2, ZO3 sıkı kavşak proteinleri içeren sıkı kavşaklar ile kaderinler, PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule), adheren kavşak molekülleri olan (JAMs) JAMA, JAMB ve JAMC içeren adheren kavşaklar ile birbirlerine bağlanmışlardır (9, 10).

Oksijenin KBB'den geçişi, küçük arteriyoller ve kapillerler sayesinde olabilmektedir ve karbondioksitle birlikte oksijen, KBB'den en hızlı difüze olan moleküllerdendir. Bunların yanında küçük yağda çözünebilir moleküller ve molekül ağırlığı 400 Da altında olan/8'den az hidrojen bağı bulunduran (etanol gibi) moleküller

de KBB'den basit transmembran difüzyon ile geçebilmektedir. Karbonhidratlar, aminoasitler, yağ asitleri, monokarboksilik asitler, nükleotidler, hormonlar, vitaminler, organik anyon ve katyonlar gibi çözünebilir moleküller ise taşıyıcı aracılı transport ile KBB'yi geçebilmektedirler. Bir başka yol olan reseptör aracılı transitoz ise protein ve peptitlerin transendotelyal geçişini iki şekilde sağlayabilir. Bunlardan birisi transferrin ve insülin gibi kandan beyne geçiştir. Diğeri ise beyinden kana geçiştir ve apolipoprotein örnek olarak verilebilir. KBB'nin abluminal membranındaki sodyum pompası da beyin interstisyel sıvısının sodyum ve potasyum değişimini düzenlemekle görevlidir. ATP bağlayan kaset transporterlar ise (ATP-binding cassette (ABC) transporters) KBB'nin luminal tarafında eksprese edilirler. Bu ABC transporterlar, hastaya verilen ilaçların ya da yabancı maddelerin endotelden kana aktif akışını sağlayarak beyinde birikmesini engeller. Endotelyal hücreler arasından geçiş mekanizması paraselüler olarak adlandırılmakta ve konsantrasyon gradientine göre iyonlarla çözülmüş moleküllerin geçişi bu yolla olmaktadır. Endotelyal hücrelerden geçiş ise transsellüler yol olarak isimlendirilmekle birlikte, bu iki yol arasındaki denge, KBB'nin permeabilitesi, dolaylı olarak da sağlık durumu hakkında bilgi vermektedir (9, 11-13).

2.1.2. Beyne İlaç Hedeflendirme Stratejileri

İlaçların KBB'den geçemeyerek etkinliklerini gösterememeleri, KBB'nin aşılması yolunda araştırmaların artmasına ve birçok önerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu yöntemler; invazif ve invazif olmayan olarak ikiye ayrılabilir ve aşağıdaki başlıklar altında incelenebilir.

İntranasal yol ile KBB'den geçişin artırılması

İntranasal yol, hızlı absorpsiyon sağlayan, uygulaması kolay, invazif olmayan bir yoldur. İlaçların, koku alma mukozası (olfactory mucosa) çevresindeki koku alma nöronlarının aksonları sayesinde, KBB ile karşılaşmadan serebrospinal sıvıya ya da beyne iletilmesi mümkün olabilmektedir. Birçok peptit, protein ve küçük molekül bu şekilde beyne iletilebilmektedir. Olanzepin ile yapılan bir çalışmada, nanokapsüller

hazırlanmış ve sıçanlara intranasal yolla uygulama sonucunda, sıçanların beyindeki olanzapin miktarının ilaç çözeltisi kontrolüne göre 1,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. İntanasal yolun avantajlarına karşılık, sınırlamaları da bulunmaktadır. Bunlar; ilacın dozu ve fizikokimyasal özellikleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanında olfaktör bölgenin, nasal epitelyuma oranı kemirgenlerde %50 iken, insanlarda yalnızca %5dir ve bu durum, ilacın insana uygulanabilirliği açısından sorun yaratmaktadır. Ayrıca ilacın fizikokimyasal özellikleri ile beyinde ulaştığı bölge arasında bir korelasyona rastlanamamıştır. İlaçların intranasal yol ile verilmesi sonrasında yapılan kantitatif analizlerde etkinlik değerlerinde tutarsızlıklar görülmüştür. İntanasal yol ile KBB'nin bypass edilebilmesi için mekanizmanın daha iyi anlaşılması ve daha güvenilir kantitatif analiz metodları geliştirilmesi gerekmektedir (14, 15).

Fiziksel metodlar ile KBB'den geçişin artırılması

KBB'nin fiziksel bir bariyer olarak ilaçların sistemik dolaşımdan beyne geçişini engelliyor olması nedeniyle, osmotik bozulma, ultrason ile bozulma ve manyetik bozulma gibi yöntemler ortaya atılmıştır. Mannitol, KBB'nin geçici olarak açılmasını sağlayan bir madde olarak bilinmektedir. Ancak mannitolün enjeksiyonunda, konsantrasyon, uygulama hızı, uygulama zamanı ve enjeksiyon sonrası retansiyon zamanı KBB açılmasında önemli etkilere sahiptir. Mannitol enjeksiyonundan sonra, KBB'de yer alan vasküler endotelial hücreler dehidrate olurlar ve böylece büzüşerek sıkı kavşakların gevşemesine neden olurlar. KBB'nin geçirgenliğini kontrol eden mekanizmalardan biri olan sıkı kavşaklar bozulduğunda ise, geri dönüşümsüz merkezi sinir sistemi hasarı meydana gelir. Mannitol gibi yüksek osmotik basınç yaratan diğer maddeler; arabistan şekeri, üre, fruktoz, süt amidi ve gliseroldür. Bu maddeler de osmotik basınç yaratarak KBB'nin açılması için kullanılabilirler. Ancak KBB bütünlüğünün bu şekilde bozulması, istenen ilacın dışında diğer büyük moleküllerin ya da toksik maddelerin de beyne penetrasyonuna izin vermekte ve orada biriken maddeler myelin yapısında parçalanmalara dolayısı ile de nöropatolojik değişimlere yol açmakta ya da merkezi sinir sisteminin normal fonksiyonunu bozmaktadır (16-18).

Son yıllarda, ultrason kullanılan teknikler de KBB'nin açılması için kullanılmaktadır. Bu metot, hastaya sistemik olarak uygulanan mikro-kabarcıklar ile geliştirilmiştir. Bu mikro-kabarcıklar akustik olarak aktive edilebilmekte ve KBB'nin geri dönüşebilir şekilde açılmasını sağlamaktadır. Alkins ve arkadaşları, ¹⁰B izotopu ile zenginleştirilmiş L-4-boronofenilalanin-fruktoz (BPA-f) maddesinin, enjekte edilebilir mikro-kabarcıklar yardımı ile ve odaklanmış ultrason ile invazif olmayan bir şekilde beyne iletilmesi üzerine çalışmışlardır. Mikro-kabarcıkların ultrason etkisi ile hacimlerinin artması ve KBB'nin fiziksel olarak açılması sonrasında BPA-f'nin tümörde biriktiği gösterilmiştir. Ultrason etkisinin ortadan kaldırılması ile ise mikro-kabarcık eski hacmine dönmüş ve KBB eski haline gelmiştir. Glioblastoma için alternatif bir tedavi olarak önerilmiş olsa da yöntem her yerde uygulamaya uygun değildir ve üzerinde ayrıntılı çalışmalar devam etmektedir (19, 20).

KBB'nin açılması için bir başka fiziksel yöntem olan manyetik nanopartiküller, değişimli manyetik alana maruz kaldıklarında, ısı kaynağı haline gelirler. Manyetik alan etkisi ile oluşan ısı sayesinde KBB bütünlüğü değişmekte ve permeabilitesi artmaktadır. Manyetik nanopartiküller ile KBB'yi aşma stratejisi umut verse de, bu partiküllerin beyin için kullanımları sınırlıdır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) insanlar üzerinde kullanılacak olan manyetik alanı yetişkinler için 8T ve çocuklar için 4T olarak sınırlamıştır (21).

Hücreye Penetre Olan Peptitler (Cell Penetrating Peptides (CPPs)) Aracılığı İle KBB'den geçişin artırılması

Hücreye penetre olan peptitler, genellikle 30 aminoasitten daha az sayıda aminoasit içerirler ve küçük molekülün yanında kendi ağırlıklarının 100 katı büyüklükteki, protein, plazmid, siRNA, lipozom gibi makromolekülleri de hücre içerisine taşıyabilirler. Bu peptitler, biyolojik olarak güvenlidirler ve toksisiteleri de düşüktür. Tüm bu özellikleri bu peptitleri ilaç taşıyıcı olarak etkili bir ajan konumuna getirmekte ve yeni bir alan doğurmaktadır. CPPlerin membranlardan geçiş mekanizması endositozdur. Endositoz yolağı, klatrin aracılı endositoz, kaveol aracılı endositoz ve makropinositozdan oluşmaktadır. Makropinositoz ana endositoz

yolağıdır. nanopartiküller CPPLer ile birleştirildiğinde, transfer etkinliklerinin arttığı gözlenmiştir. Yeni bir alan olduğu için ayrıntılı yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (22).

Pasif Hedeflendirme ile KBB'den geçişin artırılması

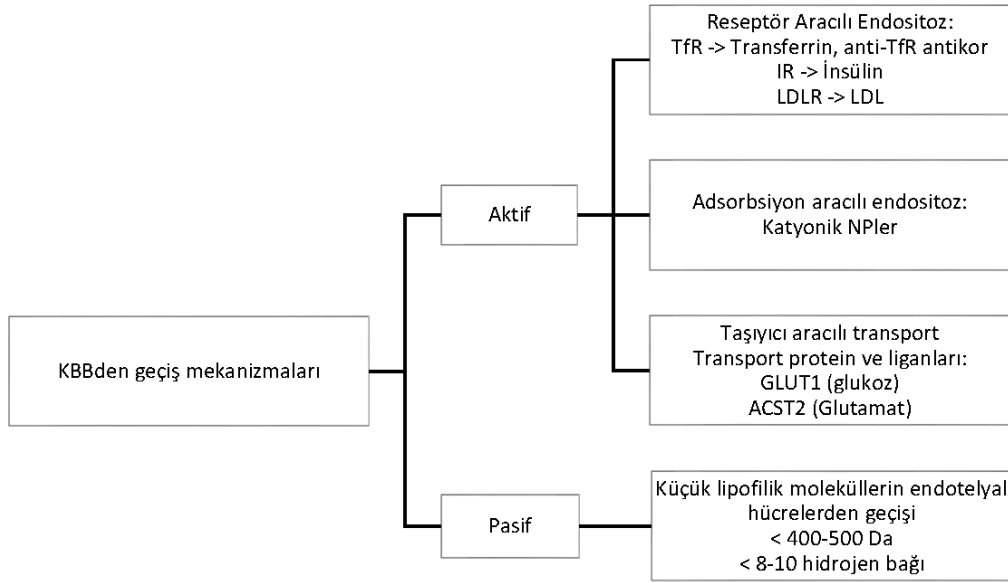
Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, ilacın spesifik bir fizyolojik bölgeye ulaşması ve etkinlik göstermesi için hazırlanan sistemlerdir. Böylece hedef bölgede artırılmış terapötik etki ve hedeflenmeyen bölgelerde azaltılmış yan/toksik etki gözlenecektir. İlaç hedeflendirme stratejileri aktif ve pasif hedeflendirme olarak başlıklandırılır. Aktif hedeflendirmede antikor-antijen ya da ligand-reseptör gibi spesifik biyolojik etkileşimlerden yararlanılarak ilaçların taşınması amaçlanır. Pasif hedeflendirme ise hedeflenen bölgedeki farklılaşmış fizyolojik koşullar nedeniyle ilacın o bölgede tercihi olarak birikmesi esastır. Sistemik dolaşıma verilen nanopartiküllerin retikuloendotelial sistem ile toplanarak karaciğer ve dalakta toplanması pasif hedeflendirmeye örnek olarak verilebilir. Artmış geçirgenlik ve kalıcılık etkisi (EPR), düzensiz olarak artmış damarlanma yapıları ve yetersiz lenfatik drenajları ile karakterize tümör dokularında nanopartiküllerin birikmelerine neden olan pasif hedeflendirme mekanizmalarından birisidir (23, 24).

Nanopartiküllerin büyüklükleri EPR etkisi için çok önemli bir faktördür. Hidrofilik bir yüzeye sahip olan 10-100 nm boyutlarındaki nanopartiküller fagositozdan kaçabilmektedirler. Bu sayede sistemik dolaşımda daha uzun süre kalabilmekte ve tümör dokularına ulaşma şanslarını artırmaktadırlar. Tümörlerin yeni ürettikleri damarların çok düzensiz ve sızdıran yapısı nedeniyle damarlardaki endotelial hücrelerin ve lenfatik damarların arasında boşluklar meydana gelmekte, bu boşluklardan nanopartiküller geçebilmektedir. Bu etkiye EPR etkisi adı verilir. Her tümördeki damarlanmanın düzensiz şekilde oluşması, ölçülebilir ya da tahmin edilebilir olmaması, sistemik dolaşımdaki ilacın ne kadarının tümör dokusuna geçeceği ile ilgili olarak kantitatif bir tayinin mümkün olmaması pasif hedeflendirme stratejisini tek başına yetersiz kılmaktadır (25).

Reseptör Aracılı Endositoz KBB'den geçişin artırılması

İnsülin ya da transferrin gibi makromoleküllerin KBB'den geçişi, reseptör aracılı endositoz ile olmaktadır. Büyük molekülü ilaçların KBB'den geçişi diğer yollar ile mümkün olmadığından, membrandaki reseptörlerin ligandları tasarlanarak ilaçların reseptör aracılı endositoz ile geçişi amaçlanmıştır. Düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilişkili protein 1 (LRP1) ve LRP2 ligandları da ilaç taşıyıcı sistemlerin aktif hedeflendirilmesi için kullanılan ligandlardır. KBB'de eksprese edilen bu reseptörler, laktoferrin, melanotransferrin gibi maddelerin KBB'den reseptör aracılı endositoz ile geçişini sağlarlar. Şekil 2.2'de nanopartiküllerin KBB'ye penetrasyon mekanizmaları gösterilmiştir.

CD71, 95 kD molekül ağırlığına sahip, II homodimerik transmembran glikoproteinidir. Aynı zamanda T9 ya da TfR olarak bilinir. TfR (CD71), beyin kapillerlerinde, yüksek oranda eksprese edilen bir reseptördür ve kendi ligandı olan demirin beyne geçişini sağlamaktadır. Dolayısı ile bu reseptör ligandı olarak tasarlanan bir ligand, endositoz sırasında demir ile yarışmak zorunda kalacaktır. OX26 ise, peptidomimetik monoklonal antikordur (mAb) ve TfRepitopeat ligandı olarak tasarlanmıştır. TfRepitopeat doğal olmayan bir TF bağlama bölgesi olup, demir ya da diğer ilaçlar ile de yarışmak zorunda kalmamaktadır. Yapılan bir çalışmada, İntravenöz OX26-BDNF (beyin kaynaklı nörotrofik faktör), orta serebral arter tıkanıklığı bulunan sıçanlarda inme hacminde %65-70'lik bir azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. TfR gibi kapiller endotelial hücre yüzeylerinde eksprese edilen insülin reseptörleri, insülinin reseptör aracılı endositoz ile beyne girişini sağlarlar (4, 26).



Şekil 2.2. Nanopartiküllerin KBB'ye penetrasyon mekanizmaları (4). (Kısaltmalar: TfR, transferrin reseptör; IR, insulin reseptör; LDL, düşük-dansiteli lipoprotein; LDLR, düşük-dansiteli lipoprotein reseptör)

2018 yılındaki bir çalışmada, glioblastoma multiforme için geliştirilen bir ilaç taşıyıcı sistemde, yüksek toksisitesi ve düşük biyoyararlanımı nedeniyle sakıncaları olan temozolamid etkin maddesi, PLGA nanopartiküllere yüklenmiş ve TfR'ye spesifik OX26 tip mAb ile hedeflendirilmiştir (26). OX26 antikorunu, nanopartiküllerin glioma hücreleri içerisine girişini sağlamış ve U87 ve U215 hücreleri üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmalarında temozolamidin antikanser aktivitesinin artırıldığı gösterilmiştir. Loureiro ve arkadaşlarının 2016 yılındaki çalışmalarında, anti-TfR mAb ve anti anti-A β (DE2B4- anti-amyloid) ile hedeflendirilmiş olan PLGA nanopartiküllere Alzheimer hastalığında endike iA β ₅ yüklenmiş ve domuz endotelial hücreleri (PBCECs) ile hücre içerisine alım çalışması yapılmıştır (27). Antikor hedeflendirilmesi yapılan nanopartiküllerin iA β ₅ etkin maddesini, kontrol grubuna göre daha yüksek oranda hücre içerisine taşıdığı gösterilmiştir. Aynı araştırma grubu, 2017 yılında yaptıkları bir çalışmada, Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere, katı lipit nanopartiküllere resveratrol yüklemiş ve nanopartiküller Anti-TfR mAb ile hedeflendirilmişlerdir. Sonuç olarak mAb ile hedeflendirilen nanopartiküllerin transitozunun daha fazla olduğu gözlenmiştir (7, 27).

2.2. Beyne İlaç Hedeflendirmede Nanoteknolojik Yaklaşımlar

2.2.1. Nanoteknoloji

Nanomateriyaller, 1-100 nm boyutlarında olan mekanik, elektronik, fotonik ve manyetik özellikler gösteren, ilaç ya da gen taşınmasında, biomedikal görüntüleme için kullanılan materyallerdir. Lipozomlar, lipid nanopartiküller, dendrimerler, miseller, altın nanopartiküller ise kanser tanısında da kullanılabilir. Kanser tedavisi, ameliyat, radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi ya da bunların kombinasyonu ile sürdürülmekle birlikte bu yöntemlerin sistemik yan etkileri, immün sistemin baskılanması, invazif tedavi gibi hastanın hayat kalitesini düşürmesi, araştırmacıları farklı yollar aramaya itmektedir. Hedeflendirilmiş kanser tedavisi ile, sitotoksik ilacın sağlıklı hücrelere değil, yalnızca tümör bölgesine gönderilmesi amaçlanmıştır. Nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte, ilaçların nanopartiküllere enkapsüle edilmeleri ve böylece ilacın yan etkilerin azaltılması, kontrollü salım sağlanması, kanda dolaşım süresinin artırılması ve bu sürede stabilitesinin korunması, çözünürlüğünün artırılması, biyodağılımının değiştirilmesi, toksisitesinin azaltılması maddenin çeşitli enzimlerden vs korunması söz konusu olabilmektedir. Bu yaklaşım kanser tedavisinde etkinliği artırmıştır. Piyasada varolan nanoilaçların yanısıra, klinik denemeler aşamasında olan da birçok nanoilaç bulunmaktadır (28, 29).

Antikanser ilaçların taşınmasında kullanılması planlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin, tümörlere iki şekilde etki etmesi amaçlanır: Artmış geçirgenlik ve kalıcılık etkisi (Enhanced permeation and retention, EPR) etkisi ve aktif hedeflendirme. Bu şekilde antikanser ilacın, terapötik penceresinin genişletilmesi ve hedeflenen organ/dokular dışında kalan bölgelerde ise toksisitesinin azaltılması hedeflenir. EPR etkisi ile, artırılmış kalıcılık sayesinde, ilacın vücutta daha uzun süre sirküle olması ile etkinliğinin artırılması, böylece de pasif hedeflendirmenin sağlanması amaçlanır. Ancak, EPR etkisi tek başına, antikanserin etkinliğinin artırılması için yeterli olamamaktadır. Çünkü tümör fizyolojisindeki ters basınç gradienti ve transport direnci, nanopartiküllerin tümör dokusunda birikmesini ve tümöre penetre olmalarını engellemektedir. Tümör dokusunda, artmış intersitisyel sıvı basınç ve düzensiz olarak

çoğalmış, sızdıran damarlanma, fonksiyonları bozulmuş lenfatik kanallar gözlemlenir. Bu durum, tümörlerde kan damarlarından interstisyuma sürekli bir akış olduğunu gösterir. Bu akış nedeniyle kan dolaşımından tümöre ulaşmaya çalışan nanopartiküller tümör dokusu içerisine giremeden, interstisyum içerisinde dağılma eğilimindedirler (30).

Aktif hedeflendirme ile hedeflendirilen ilaçların, spesifik seçicilik ile istenen dokuya iletilmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede, çevredeki sağlıklı dokulara zarar vermemekte, sadece kanserli dokuda etki göstermektedir. Aktif hedeflendirme ligand-reseptör etkileşimlerine bağlı olarak gerçekleşir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin, şekil, büyüklük, yüzey yükü, kimyasal yapıları vs gibi özellikleri de optimize edilmelidir. Elde edilen ilaç taşıyıcı sistemin toksisitesinin, biyouyumluluğunun ve biyodağılılırlığının araştırılması gerekmektedir (31).

Doxil[®], PEGile lipozomal doksorubisin formülasyonu olarak tasarlanmıştır. Böylece doksorubisinin kanda kalış süresi artırılmıştır ve kardiyotoksitesisi azaltılmıştır. Doxil[®]'in 1995'te Kaposi sarkoma ve yumurtalık kanseri için FDA tarafından onaylanması ile görülmüştür ki, nanoilaçlar klinik alanda birçok getiri sağlamaktadır. Bu getirilere artırılmış etkinlik, azaltılmış toksisite, kontrollü salım, hedeflendirme vs örnek olarak verilebilir. Tüm bu üstünlükler, hastaların yaşam sürelerini uzatmakta ya da tedavi süresinde antikanser ilaçların ağır yan etkilerini azaltmakta, böylece yaşam kalitesini artırmaktadır. Doxil[®]'in FDA onayı almasından sonra, Paklitaksel'in de nanoteknolojik formu (Abraxane[®]) onaylanmış ve diğer nanoilaçların (nanokonjugatlar vs) yolunu açmıştır. 2019 yılı itibariyle piyasada 12 adet FDA onaylı nanoteknolojik ilaç bulunmakta ve 13 adet nanoteknolojik ilaç için de faz I,II,III çalışmaları devam etmektedir (32).

Nanopartiküllerin partikül boyutu ve yüzey yükünün önemi

Nanopartiküllerin in vitro ve in vivo deneylerde istenen sonuçları vermeleri için, biyodağılımlarının ve farmakokinetik özelliklerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Bunun için de nanopartiküllerin karakterizasyonu büyük önem

taşımaktadır. Nanopartikül karakterizasyonu ile birlikte, ilacın terapötik getirileri tahmin edilebilir ve muhtemel problemler önceden engellenebilir.

Dinamik ışık saçılımı yöntemi (Dynamic light scattering, DLS), partikül büyüklüğü ölçümlerinde sıklıkla kullanılan, güvenilir ve basit bir metottur. DLS metodu ile; süspansiyon içerisindeki nanopartiküllerin Brownian hareketleri ile hızları arasında ilişki kurulur (translasyonel difüzyon eşitliği) ve Stokes-Einstein eşitliği sayesinde partikül büyüklüğü hesaplanır. DLS metodu ile elde edilen sonuç, partiküllerin ortalama büyüklüğü ve büyüklük dağılımının homojenliği anlamına gelen polidispersite indeksi (PDI) olarak ifade edilir. PDI değerinin 0,1 ile 0,25 arasında olması dar bir partikül büyüklüğü dağılımı anlamına gelirken bu değer 0,5'i aşması istenen bir durum değildir. Partikül büyüklüğü, nanopartiküller ile ilgili birincil önceliğe sahip olan özelliktir. Partikül büyüklüğü bir nanopartikülün, biyodağılımını, kanda kalış süresini, hedef dokuya ulaşma başarısını etkilemektedir. Mikroskop ile partikül büyüklüğü ölçümü kesin sonuçlar verse de mikroskoba göre örnek hazırlama prosesinin uzun ve zahmetli olması, bu işlemler sırasında nanopartiküllerin agrege olabilmelerine sebep olmaktadır. Bu şekilde gözlenen partiküller ile bir büyüklük dağılımı elde etmek oldukça zordur. Nanopartikül takip analizleri (Nanoparticle tracking technique) karanlık bir ortamda floresan mikroskop ile gerçekleştirilmekte ve bir nanopartikülün belirli bir zamandaki Brownian hareketlerinin ölçümüne dayanmaktadır. Bu metod ile bir nanopartikülün yüksek çözünürlükte izlenmesi mümkün olsa da, örneklerin ölçülebilmesi için seyreltmeye ihtiyaç duyulması bir sakınca olarak karşımıza çıkmaktadır (33).

Nanopartiküllerin fizikokimyasal değişikliklerinin, hücresel alım özelliklerinde ya da biyolojik proseslerinde büyük rol oynadığı bilinmektedir. Lipozomlar, quantum dotlar, polimerik nanopartiküller, altın nanopartiküller ya da silika nanopartiküller gibi ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklükleri ve yüzey yükleri, bu sistemlerin ilaç taşıma etkinliklerini değiştirebilmekte ve hücre içerisine alım mekanizmalarını etkileyebilmektedir. Polimerik nanopartiküller özellikle tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir çünkü tümör dokusuna pasif hedeflendirme, yüksek enkapsülasyon etkinliği ve birçok etkin maddenin taşınabilirliği gibi avantajlar sağlamaktadırlar.

Ancak, bu nanopartiküllerin homojen bir süspansiyon olarak stabiliteilerinin sağlanması, yüzey yüklerine ve monodispers partikül büyüklük dağılımlarına bağlıdır. Partikül büyüklük dağılımları monodispers olmayan nanopartiküllerin, pasif hedeflendirme ile hedeflenen dokuya ulaşma ihtimalleri aynı olmadığı için etkin maddenin biyodağılımı ile ilgili doğru bir sonuca varılamamakta ve bu da tedavi etkinliğini belirsiz kılmaktadır. Bir başka nokta, nanopartiküllerin hedeflenen organa göre partikül büyüklüğünün belirlenmesi gerektiğidir. Örneğin akciğer içerisindeki kılcal damarlara hedeflendirilen nanopartiküllerin büyüklüklerinin 5-6 μm 'den daha büyük olması gerekmektedir (34, 35).

Yüzey yükü, zeta potansiyel olarak ifade edilmekte ve nanopartiküllerin çevre ile olan etkileşimini direkt olarak etkilemektedir. Nanopartiküllerin buldukları ortamda, etraflarını saran, güçlü bağlanmış iç tabaka (stern tabakası) bulunmaktadır. Bu güçlü bağlanmış tabakaya, zayıf bağlanmış olan bir de dış tabaka yer almaktadır. Nanopartikülün yüzeyindeki tabakalar ile ortam arasındaki elektrik potansiyeli farkında zeta potansiyel denir. Zeta potansiyel genel olarak lazer Doppler elektroforez yöntemi ile ya da DLS yöntemi ile ölçülür. Genel olarak polimerik nanopartiküllerin zeta potansiyeli +30 mV ile -30 mV arasındadır. Yüzey yükü uygun olmayan nanopartiküllerin, raf ömürleri kısa olmakta ve stabiliteilerini sağlamak mümkün olmamaktadır. Nanopartiküllerin yüzey yükü, partiküllerin sistemik dolaşımda kalma sürelerini etkilemektedir. Retiküloendotelyal sistem tarafından tanınan nanopartiküller, sistemik dolaşımdan hızla temizlenmekte ve etkin madde kargosu hedef dokuya ulaştırılamamaktadır (33).

2.2.2. Nanobiyoteknoloji

Nanobiyoteknoloji; biyoteknoloji ve nanoteknolojinin birleşimi olmakla birlikte, gen terapisi, ilaç taşınması, biyomarkerlar, moleküler görüntüleme ve biyosensörleri kapsamaktadır. Bilim insanları, ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde yeni polimerlere ve polimer-ilac kombinasyonlarına yönelmiş durumdadır. Nanobiyoteknoloji araştırmaları sayesinde yakın gelecekte yenilikçi nanocihazlar ve nanosistemler geliştirilebilecektir. Bu sayede biyolojik materyallerin, hedeflenen

bölgeye, daha az yan etki ile ve uzun süreli stabiliteleri sağlanmış olarak iletilmesi mümkün olacaktır (34).

Bildiğimiz üzere KBB, kan ile beyin arasında, nurtientler, peptitler, proteinler ve immün hücreler için geçişe izin veren bir bariyerdir ve beyni zararlı ajanlara karşı korur. Son yıllardaki çalışmalara göre ise KBB endoteline penetrasyonu artıran transport sistemleri, enzimler ve reseptörler belirlenmiştir. Vücuttaki diğer organlardaki damarlanmaya göre KBB, plazmadaki ilaçların beyne geçişini engeller, örneğin proteinlere göre yağda çözünen moleküllerin KBB'den geçişi daha kolay olmaktadır. Merkezi sinir sistemine ilaç taşınması amacıyla geliştirilen ürünlerde KBB'nin etkisini gözardı etmemek gerekir. Büyük yapılu proteinlerin KBB'den geçişi ise reseptör aracılı yollar ile olabilmektedir. Bu şekilde geçişe örnek olarak transferrin verilebilir çünkü beynin fonksiyonlarını sürdürebilmesi için belirli miktarda demire ihtiyaç duyar. Bunun yanında insülin ya da IgG gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin de genel olarak endotelial hücreler aracılığı ile beyne geçebilmesi, terapötik ajanların da bariyerden geçebilmelerine yönelik yeni yaklaşımların gelişmesine önayak olabilir (34, 36).

MAblar, intravenöz olarak enjekte edildiklerinde, KBB'yi geçemeyebildikleri için ya da geçseler de beyinde terapötik konsantrasyona ulaşamadıklarından düşük etkinlik gösterdikleri için, bu antikörlerin beyne taşınmaları için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Antikörlerin direkt intrakranial uygulanması, KBB'nin bozulması ya da nanopartiküllere bu antikörlerin konjugasyonu bu stratejilerden bazılarıdır.

Antikörlerin nanotaşıyıcılara enkapsülasyonu ile bu kısıtlamaların önüne geçilmesi amaçlanmaktadır. Böylece antikör dozlamasının azaltılması ve buna bağlı olarak gelişen toksisitenin azaltılması mümkün olabilecektir. Etkinliğin artırılması, amaca yönelik tasarlanabilen nanotaşıyıcılar, kontrollü salımın sağlanabilmesi de diğer üstünlükler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca nanotaşıyıcılar antikörleri lizozomal kompartmanlarda degrade olmaktan da korumaktadırlar. Nanotaşıyıcıların aktif olarak hedeflendirilmeleri, yüzeylerine, reseptörüne yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanan bir antikörün bağlanması ile sağlanabilir. Bu hedefleyici antikörün reseptörünün hedef doku hücrelerinde overeksprese ediliyor olması tercih edilir bir

durumdur. Bu şekilde nanotaşıyıcıların fonksiyonalizasyonu ile, taşınan etkin madde için birçok üstünlük sağlanırken, aktif hedeflendirme ile de sinerjik etki elde edilir.

Nanoenkapsülasyon prosesinin antikor stabilitesini bozması bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu prosesde pH, organik solvanlar, yüksek basınç, sıcaklık değişimleri, mekanik stres koşulları değerlendirilmelidir. Antikorum bu koşullarda degrade olması ile ortaya çıkabilecek olan degradasyon ya da agregasyon ürünleri immunojenik reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Bu durum sonucunda ise, immun cevap meydana gelmesi ve dolayısı ile tedavi etkinliğinin ortadan kalkması ortaya çıkabilmektedir (37, 38).

Modern nanotıp tarihi çok uzun olmasa da konvansiyonel onkoloji ilaçlarına göre daha fazla umut vadetmektedir. Onkolojide kullanılan ilaçların, faz I çalışmalarından FDA onayına kadar olan süreçte, klinik başarısı yaklaşık %5 olarak görülürken, terapötik antikorların da içerisinde bulunduğu hedeflendirilmiş ilaçların klinik başarısı yaklaşık %10'dur.

2.3. Glioblastoma Multiforme

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre (WHO), GBM yetişkinlerde en sık görülen beyin tümörüdür. Tüm gliomaların %54'ünü oluştururken, primer beyin tümörlerinin %16'sına GMB olarak tanı konmaktadır (37). Glioblastoma, yetişkinlerde en çok görülen primer beyin tümörlerindedir ve genellikle hastanın tanıdan sonra 15 aydan daha kısa süre yaşam süresi olan oldukça agresif tümörlerdir. Tanıdan sonra 5 yıllık hayatta kalma yüzdesi ise %6,4-%14 arasındadır. (39, 40) Multiforme, GBM'in oldukça heterojen bir yapıda olduğunu ifade etmektedir. GBM tümörlerinin büyük çoğunluğu oldukça invazif ve infiltratif tümörlerdir. (41) Beyin kanserinin en ölümcül ve en yaygın olarak rastlanan formu olan glioblastoma multiforme, hastada hızlı büyüme göstermesi ile karakterizedir. Bu kanser türü, günümüzde uygulanan tedavilerden ameliyat ya da radyoterapi gibi seçeneklere direnç göstermekte olduğu için, yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Hastaya tanı konulduktan sonra hayatta kalma süresi 7-15 ay ile sınırlıdır. Glioblastoma multiforme, beyin parenkimasında çok hızlı vasküler proliferasyona yol açarak, agresif bir şekilde büyüme gösterir.

Glioblastoma multiforme için standart tedavi halen ameliyattır. Tümör dokusunun mümkün olan kısmının alınması amaçlanır ancak, tümörün agresif yapısı ve damarlanmasının çok fazla olması nedeni ile tümörün tamamının alınması genellikle mümkün olmaz (42, 43).

Yeni üretilen etkin maddelerin KBB'yi geçememeleri ve etkinliklerini gösterememeleri sebebiyle de beyin tümörlerinin tedavisi zor hale gelmektedir. Beyindeki kanser oluşumu sonrasında, KBB bütünlüğü bozulmakta ve artmış damarlanma ve endotelial proliferasyon, hipoksi ya da tümör nekrozu gibi çeşitli patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır. KBB bütünlüğünün kaybolması da homojen olarak değil, düzensiz olarak ortaya çıkmakta bu da ilaçların tümör bölgesine ulaşımının heterojen olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca tümör dokusundaki heterojen kan sızıışı, dokuda anormal bir kan akışına sebep olmakta böylece ilaçlarla birlikte aynı zamanda oksijenin de doğru bir şekilde hücrelere dağıtılmasını engellemektedir (10, 44).

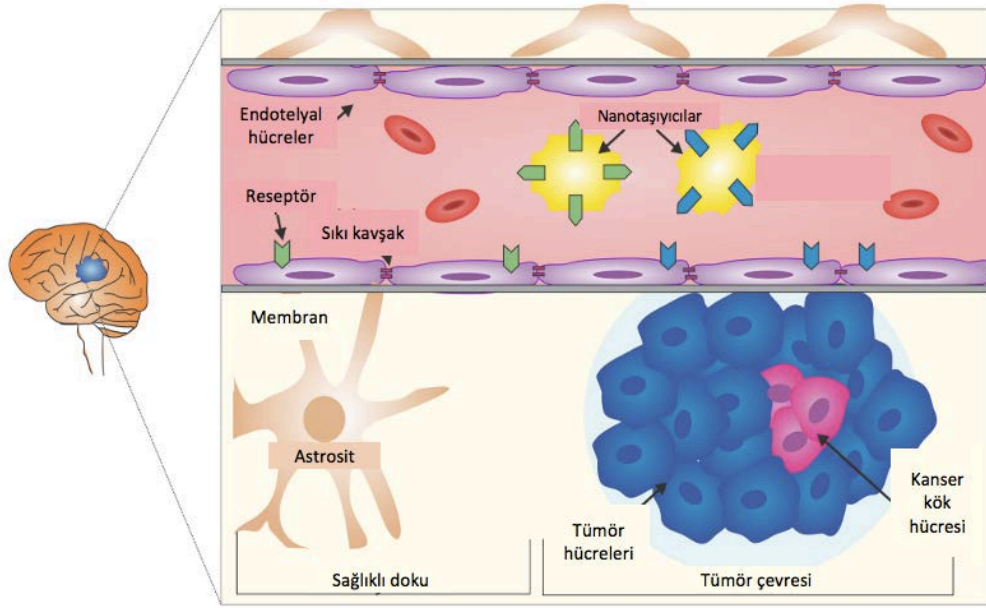
GBM için kemoterapi, 1970lerde, araştırmacıların karmustin etkinliği ile ilgili çalışmaları ile başlamıştır. Bu etkin madde, KBB'yi geçebilmekte ve direkt olarak kanser hücreleri üzerinde etki gösterebilmektedir. 1979 yılında ise, radyasyon tedavisinin beyin kanserleri üzerindeki etkisi gösterilmiş ve böylece kemoterapi ve radyoterapinin GBM tedavisi için kullanılmasının önünü açmıştır. Günümüzde, GBM hastaları için standart tedavide, ameliyat öncesi ya da sonrasında, radyoterapi yalnız olarak ya da kemoterapi ile birlikte uygulanabilmektedir (45-47).

GBM için ilaç tedavisi günümüzde de birkaç ilaç ile sınırlıdır. 1999 yılında FDA tarafından GBM için onaylanan oral antikanser Temozolamid halen kullanılmaktadır. BVZ'nin 2009 yılında FDA onaylı olarak GBM tedavisinde kullanılmaya başlanması ile yeni bir tedavi yolu açılmıştır. Yeni tedavi yaklaşımları adına yapılan çalışmalardan ancak birkaç tanesi umut vadetmiştir. Tedavide etkinliğin artırılması ve kısa hayatta kalma süresine sahip olan hastaların, tedavi süresince yaşam kalitelerinin artırılması amaçlanmaktadır. Bunun için de, nanoteknolojik temelli ilaç taşıyıcı sistemler gittikçe önem kazanmaktadır (42, 48-50).

Glioblastoma Multiforme Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar

Nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler ile etkin maddelerin beyin dokusuna gönderilmesi amaçlanmakla birlikte, KBB bu etkin maddelerin ve toksinlerin beyne geçişinde en ciddi engeli teşkil etmektedir. KBB, kan ve nöral doku arasında fiziksel bir engel olarak yer almaktadır (Şekil 2.3.). Endotelial hücreler, astrositler, perisitler ve komşu nöronların bir araya gelmesi ile oluşmuştur. Endotelial hücreler, sıkı kavşaklar ile bir arada tutulurlar ve maddelerin geçişini sınırlarlar. KBB, ABC proteinleri (atp-binding cassette transporters) ve P-gp (p-glycoprotein) gibi efflux proteinleri içerir. Beyin endotelinin luminal yüzeyinde yer alan p-gp proteini, beyin kapillerlerinden proteinlerin transportunu sağlar. P-gp'den kaçabilecek olan moleküller, yağda çözünebilen küçük molekküller, elektrik yükü nötral moleküller ya da 400-600 Da molekül büyüklüğünün altındaki besinlerdir. Beyne hedeflendirilerek gönderilen etkin maddelerin büyük çoğunluğunun başarısız olmasının sebebi olan KBB, beyni yabancı maddelere karşı korumasının yanında, çoğu nörolojik hastalığın tedavisini de olumsuz etkilemektedir (51, 52).

Merkezi sinir sistemini hedef alan ya da beyin dokusundaki bir tümör tedavisinde kullanılacak olan etkin maddenin beyne ulaştırılması için, toksisite ya da KBB'nin aşılması gibi engelleri geçmesi gerekmektedir. Etkin maddelerin tümör bölgesine ulaştırılması da tek başına problemi çözmekte çünkü, kanser hücrelerinin kompleks tümör mikroçevresi, invazif özellikleri ve metabolizmalarının değişmiş olması, maddelerin etkinliğini azaltmaktadır. Şekil 2.3 ile gösterildiği gibi, nanopartiküllerin tümör bölgesine ulaşabilmeleri için sıkı kavşaklar ya da reseptörler gibi yolları kullanmaları gerekmektedir. Nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler, ilaçların optimize edilerek beyin dokusuna yönlendirilmesi, spesifik bölgeye ilaç taşınması, etkin maddenin stabilitesinin korunması ya da kontrollü/devamlı salımı için üstünlük yaratmaktadır.



Şekil 2.3. Kan beyin bariyeri ve glioblastoma multiforme çevresi (52)

Lipozomlar, nanoemülsiyonlar, polimerik miseller ya da demir oksit nanopartiküller gibi birçok nanomateryal, GBM tedavisinde kullanılan etkin maddelerin taşınması için araştırılmaktadır. GBM tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemlerden biri, Zhou ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerdir. BU nanopartiküllerin EPR etkisi sayesinde tümör bölgesine ulaşması hedeflenmiş ve U87MG ksenograf intrakranial sıçan modelinde, serbest paklitakselin uygulandığı hayvan gruplarına göre enkapsüle edilen paklitakselin uygulandığı hayvan gruplarında daha uzun yaşam süresi gözlenmiştir (25).

Polimerik miseller de GBM tedavisinde kullanılmak üzere araştırılmış ve antikanser ilaç olan doksorubisinin PEG ile konjuge edilmesi sayesinde polimerik miseller oluşturulmuş ve L9 intrakranial sıçan tümör modelinde, serbest doksorubisine göre daha fazla tümör dokusuna giriş sağlamıştır. Polimerik misellerin yanında lipozomlarla da çalışılmıştır. Lipozomlar, fosfolipitlerden oluşan çift tabakalı yapılardır ve amfifilik ya da hidrofobik maddelerin taşınması için avantaj sağlarlar. Bir çalışmada, doksorubisin taşıyan bir lipozoma IL-13 konjugasyonu ile, yüksek oranda

IL-13Ralfa2 taşıyan GBM için aktif hedeflendirme sağlanmış ve tümör hücrelerden doksorubisinin P-gp ile atılmasının önüne geçilmiştir (51, 52).

2.4. Bevasizumab

Antikorlar biyoteknolojik, farmasötik ve endüstriyel uygulamalarda sıklıkla kullanılan terapötik ajanlardır. Özellikle de kanser, astım ya da immün ve enfeksiyon hastalıklarında terapötik olarak kullanılmaları için araştırmalar sürmektedir. Terapötik antikorların istenmeyen yan etkilerinden kaçınılarak, afiniteleri olan reseptörlere bağlanabilmeleri ve böylece daha az miktarda uygulama ile daha etkin bir tedavi amaçlanması ise son zamanlarda üzerinde sıklıkla çalışılan konulardandır. Özellikle de klinik tedavide onaylanmış mAb'lar, reseptörlerine yüksek spesifite göstermekte ve başarılı tedavi sağlamaktadırlar (37).

İlk mAb 1986'da onaylandıktan sonra günümüze kadar yaklaşık 50 mAb FDA tarafından onaylanmıştır. Geliştirilen rekombinant teknoloji ile de yeni üretilmiş ya da inovatif mAb'lar da piyasada yer almaya başlamıştır (Tablo 2.1). MAb'lar büyük moleküllü (yaklaşık 150 kDa) ve pahalı moleküller olduğundan, yüksek dozlarda uygulama, mAb'lar ile tedaviyi pahalı kılmaktadır. Ayrıca hastaya, çoklu olarak parenteral ya da intravitreal yol ile verilmeleri de mAb'larla tedavinin uyumluluğunu azaltmaktadır. Örneğin FDA onaylı mAb'lardan olan, ranibizumab, BVZ ve infliximab birden fazla intravitreal uygulama gerektirmektedir. Antikorların intravitreal yol ile verildiklerinde yarı-ömürlerinin kısa olması (7-10 gün) nedeniyle birden fazla kez hastaya uygulama gerektirmeleri bu sakıncaya yol açmaktadır. Hastaya yapılan tekrarlı uygulama, gözde vitröz kanama ya da lens/retinal ayrılmaya sebep olabilmektedir (53).

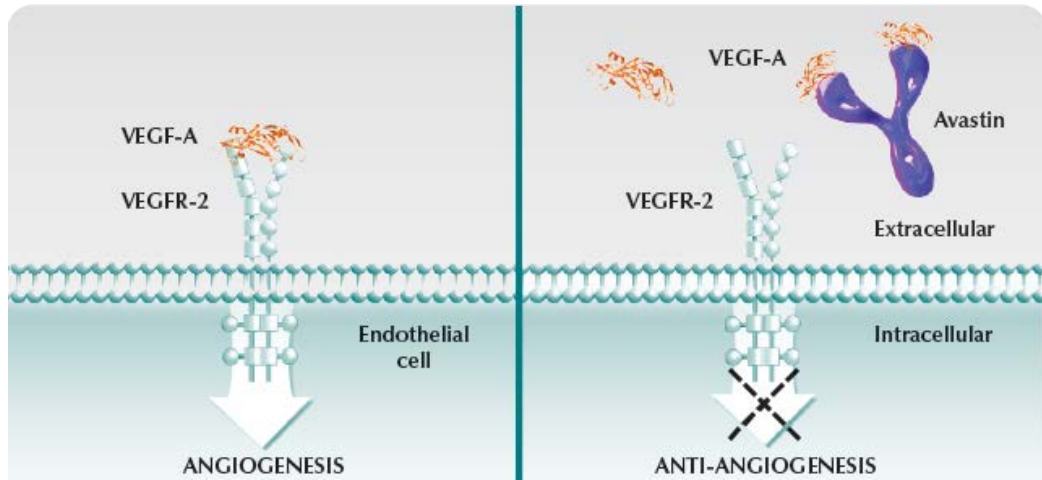
Tablo 2.1. Kanser immünoterapisinde kullanılan başlıca monoklonal antikolar ve hedef antijenleri (54-57)

| Hedef Antijen | mAb | Antikoru Tipi | Kullanıldığı Başlıca kanser Türleri |
|---------------|-------------|----------------|--|
| EGFR | Cetuximab | Kimerik, IgG1 | Metastatik kolorektal kanser ve skuamöz hücre kanserleri |
| EGFR | Panitumumab | İnsan, IgG2 | Metastatik kolorektal kanser |
| EGFR-2 (HER2) | Trastuzumab | Humanize, IgG1 | Meme kanseri |
| CD20 | Rituximab | Kimerik, IgG1 | B hücre non-Hodgkin lenfoma |
| CD20 | Ofatumumab | İnsan, IgG1 | Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) |
| CD52 | Alemtuzumab | Humanize, IgG1 | B hücre lösemisi |
| CTLA-4 | Ipilimumab | İnsan, IgG1 | Metastatik Melanoma |
| VEGF | BVZ | Humanize, IgG1 | Metastatik kolorektal kanser, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri, GBM, Metastatik renal hücre karsinoması, metastatik serviks kanseri |

Tümör büyümesi, tümörü besleyen damarlardan yeni damarların oluşması anlamına gelen anjiogenez süreci ile gerçekleşir. Bu süreçte, endotelial hücrelerin kan damarlarının iç yüzeyinde migrasyonu, büyümeleri ve farklılaşmaları gerçekleşir. Yeni kan damarlarının oluşumu süreci çeşitli kimyasal sinyaller ile kontrol edilir. Tümörün anjiyojenezi, vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) platelet-türevi büyüme faktörü, hipoksi indüklenebilir faktör 1alfa ve diğer birçok faktör ile sağlanır. Bu faktörlerden anjiyogenez üzerinde en etkili olanı VEGF olarak bilinmektedir; normal endotelial hücrelerin üzerindeki kendisine spesifik reseptörelere bağlanarak, bu hücrelerden yeni hücrelerin yapımını uyarır. Bu süreci durduran kimyasal sinyallere ise, anjiyogenez inhibitörleri denmektedir. Normal sağlıklı hücrelerde anjiogenez uyarıcı ve inhibe edici sinyaller denge halindedir ve yalnızca kan damarlarının ihtiyacı olduğunda, örneğin yaşça büyüme ya da iyileşme süreci, bu denge anjiogenez uyarıcı taraf lehine bozulurken, kanser hücrelerinde bu denge bozulmuş durumdadır. Kanser hücrelerinde dengesiz ve düzensiz olarak damarlanma artışına rastlanmaktadır (58).

Anjiyojenezin önemi dolayısıyla, VEGF yollarının bloklanması, tümör büyümesinin durdurulmasında önemli stratejilerden biri haline gelmiştir. VEGF inhibisyonunda ise klinik çalışmalarda en etkili görülen etkin madde ise, bir

rekombinant humanize mAb olan BVZ olmuştur. BVZ (Avastin®; Genentech, Inc., South San Francisco, CA), yapısında sabit kısmını (constant) IgG₁ oluştururken, VEGF bağlayan bölgeleri ise faregillerden alınmıştır. VEGF (VEGF-A), kan endotelial hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen VEGFR1 (FLT1) ve VEGFR2 (Flk1 ya da KDR) reseptörlerine bağlanır. VEGFR2 endotelial hücre mitogenezinde ve mikrovasküler permeabilitenin artmasında ana medyatör olarak bilinir. VEGFR1 ise tümör büyümesinde ve metastazında etkili olabilecek matriks metalloproteinazın indüksiyonundan sorumludur. Preklinik çalışmalarda da gösterildiği üzere, BVZ etkisini VEGF'e seçici olarak bağlanarak ve VEGF'in biyolojik aktivitesini nötralize ederek gösterir. Böylece VEGF görevini yapamadığı için tümörde damarlanma azalır. BVZ, tümör büyüklüğünde azalma gerekmeksizin tümör damarlanmasını normalize ederek, damarlarda artmış permeabiliteyi azaltır. Bu da tümör büyümesinin azalmasına neden olur (Şekil 2.4)(44, 48, 58).



Şekil 2.4. Bevasizumab etki mekanizması, anjiogenesizi VEGF'e bağlarak, VEGF'in kendi reseptörüne bağlanmasını inhibe ederek sağlar (www.avastin-hcp.com)

BVZ, metastatik kolorektal kanser, skuamöz olmayan küçük hücreli akciğer kanseri, metastatik renal hücre karsinoması, dirençli ve tekrarlayan ya da metastatik servikal kanser, epitelyal overyan, fallopi tüpü ya da primer peritoneal kanser tedavisi

için kullanılmaktadır. 2009 Yılında, FDA BVZ'nin GBM tedavisinde kullanımına onay vermiştir (59).

BVZ'nin diyare, yüksek kan basıncı, yorgunluk ve güçsüzlük, kas ve eklemlerde ağrı, enfeksiyon kapma riskini yükseltmesi, el ve ayak parmaklarında hissizlik, iştah kaybı, konstipasyon, menstural döngünün bozulması gibi sık görülen yan etkileri ve kalp problemleri, kanama riskini artırması, iç organlar arasında anormal bağlantılara sebep olması, hızlı kalp atışı, nöbet geçirtme riski ve derinin ciddi enfeksiyonu gibi önemli yan etkileri bulunmaktadır. Bütün bu yan etkiler ve mAb'ların genel olarak üretimlerinin pahalı bir süreç olması ve BVZ gibi etkin maddelerin konvansiyonel yol ile kanser dokusuna istenen oranda ulaştırılamamaları, BVZ için yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin araştırılmasının önünü açmıştır (60).

2.5. Poli(laktik ko-glikolik asit) Polimeri

KBB'yi geçebilen polimerik nanopartiküllere örnek olarak; kitosanlar, dendrimerler, nanojeller, PLGA nanopartiküller, PLA nanopartiküller verilebilir ve bu yapıların biyouyumlu, nontoksik, nontrombojenik, nonimmunolojik olmaları gerekir. Polimerik nanopartiküller, ilaçları enkapsüle ederek, onları dış etmenlerden korumaları ve bariyere zarar vermeden ilaçların beyine taşınmalarını sağladıkları için merkezi sinir sistemine ilaç taşınmasında avantaj sağlarlar. İlaçların kontrollü salımlarının sağlanabilmesi, polimerik yapıları sayesinde biyolojik olarak parçalanır olmaları ve hedeflendirilebilir olmaları da polimerik nanopartikülleri bu alanda avantajlı kılar. Nanopartikülleri oluşturan polimerlerin FDA onaylı polimerlerden seçilmesi, ucuz olmaları, dolayısı ile ölçek büyütme (scale-up) çalışmalarında kolaylık sağlamaları, polimerik nanopartiküllerin tercih sebeplerindedir (61).

Nanoenkapsülasyonun, terapötik ilaçların ve özellikle de mAb'ların etkinliğinin artırılmasında ve dokuya hedeflendirilme stratejilerinin geliştirilmesinde etkili olması ile birlikte, enkapsülasyon metodları dikkatle seçilmeli ve taşıyıcı sistemin oluşturulmasında biyolojik olarak uyumlu ve biyoparçalanır polimerler, lipitler vs kullanılmalıdır.

Polimerik nanopartiküller doğal ya da sentetik polimerlerden elde edilmiş olabilirler. Polimerik nanopartiküllerin içerisinde ilaçlar fiziksel olarak disperse olmuş durumdadır. Antikorun nanopartikül ile taşınması birçok yol ile olabilir; antikor nanopartikül yüzeyine adsorbe olmuş, nanopartikül içerisinde enkapsile edilmiş ya da matriks içerisinde çözülmüş/disperde olmuş şekilde bulunabilir. PLGA, biyolojik olarak parçalanır ve biyolojik olarak uyumlu, FDA onaylı bir polimer olmakla birlikte, iki polimerin rastgele ring-opening kopolimerizasyonları ile sentez edilmiştir. PLGA nanopartikülleri ile ilaçların uzatılmış salımları sağlanabilir ve KBB'yi geçebilmesi ile MSS'ne hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcılar geliştirilebilir. Bilindiği üzere, sentetik biyoparçalanabilir polimerler, doğal polimerlerden daha stabildir. Bu polimerlere en iyi örnek olan PLGA, literatürde de en sık kullanılan polimerlerdendir. PLGA, kontrollü salım sağlayabilmekte, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir bir polimerler olarak düşük düzeyde toksisite göstermektedir (25, 61, 62).

PEGilasyon

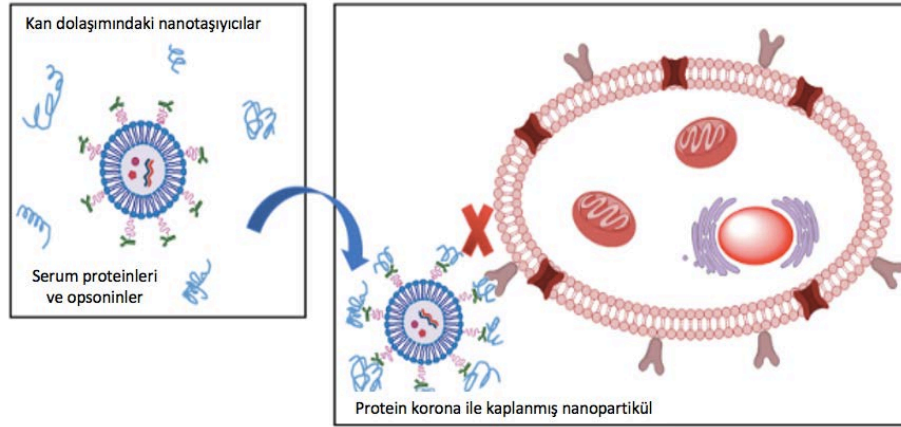
Nanopartiküllerin yüzeyinin PEG ile kaplanması, yani PEGilasyon işlemi, hedeflenen dokulara ya da hücrelere etkin madde taşınmasında etkinliğin artırılmasında sık kullanılan bir yaklaşımdır. Sistemik olarak uygulanan nanopartiküllerin dolaşımda kalış sürelerinin uzatılması, immunojenisitelerinin azaltılması, PEGilasyon ile mümkün olabilmektedir.

Protein ve peptit gibi yapılar, hızla degrade olup kan dolaşımından çok hızlı bir şekilde temizlendiği için, bu yapıların kanda kalış sürelerinin dolayısı ile de biyoyararlanımlarının artırılması önem kazanmıştır. Kan dolaşımındaki komponentlere dirençli olan bir inert polimer ile nanopartiküllerin kaplanması ile kan dolaşımında tanınmalarının ve retiküloendotelyal sistem tarafından karaciğer/dalak gibi organlara gönderilmelerinin engellenmesi amaçlanmıştır. Bu özellikleri taşıyan PEG, en sık kullanılan "stealth" polimerdir ve FDA tarafından genel olarak güvenli Generally Regarded as Safe (GRAS) olarak sınıflandırılır. İlk olarak 1977 yılında, Davis and Abuchowski albumin ile PEG arasında kovalent bir bağ oluşturmuş ve bu bağ sayesinde albuminin kanda kalış süresinin arttığını ve immünojenisitesinin azaldığını

göstermişlerdir. 1990 yılında ise ilk PEGile protein ürün olan Adagen, şiddetli kombine immün eksiklik için FDA tarafından onay almıştır (63).

Nanopartiküllerin sistemik uygulanmasından sonra, kan dolaşımı ile hedef organ ya da dokulara ulaşması amaçlanır. Bu aşamada kanda kalış süreleri çok önemli bir parametredir. Mononükleer fagosit sistem (mononuclear phagocyte system, MPS), karaciğer, dalak ve lenf nodları gibi kısımlardan ve bu kısımlara ait olan dendrit hücreler, kan monositleri, granüositler ve makrofajlardan oluşan bir sistemdir. MPS, kandaki yabancı maddelerin temizlenmesinden, kandan uzaklaştırılmalarından sorumludur (64).

Kanda dolaşan nanopartiküller opsoninler olarak bilinen, kompleman bileşenleri, immunglobulinler, fibronektin ve apolipoproteinlerden oluşan serum proteinleri tarafından tanınırlar. Bu opsoninler nanopartiküllerin yüzeyinde adsorbe olurlar (opsonizasyon) ve fagositler tarafından temizlenmelerini sağlarlar. Opsonizasyon, genellikle hidrofobik etkileşimler ile gerçekleşse de elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları da etkili olabilmektedir. Bunun yanında, nanopartiküller direkt olarak makrofajlar tarafından da yakalanabilirler. Kan dolaşımında nanopartiküller ile etkileşebilecek yüzlerce tip serum proteini olduğu gösterilmiştir. Bu proteinlerin nanopartiküller ile etkileşmeleri sonucunda, nanopartiküllerin etrafında toplanmaları ile protein korona meydana gelmektedir. Opsonizasyon yalnızca nanopartiküllerin kanda kalış sürelerini kısaltmakla kalmayıp, aynı zamanda aktif hedeflendirme etkinliğinin de düşmesine neden olmaktadır (Şekil 2.5)(24, 65).



Şekil 2.5. Sistemik dolaşımında, hedeflendirilmiş nanopartiküllerin, serum proteinleri ve opsoninler ile kaplanması (24)

Dolaşımdaki nanopartiküllerin agregasyonu da MPS ya da diğer makrofajlar tarafından alınmalarının yanında, sistemik dolaşımda kalma sürelerini azaltmaktadır. Yüksüz ve hidrofobik nanopartiküller, van der Waals ve/veya sulu ortamdaki hidrofobik etkileşimler ile hızla agregate olma eğilimindedirler. Ancak negatif ya da pozitif yüklü nanopartiküller, genel olarak kolloidal stabilitelelerini korumaktadırlar. Yine de kan dolaşımında güçlü iyonik etkileşmeler, nanopartiküllerin yüzey yüklerini nötral hale getirerek agregate olmalarına neden olmaktadır (24, 66).

Hidrofilik yapısından dolayı PEG, bağlandığı nanopartikül yüzeyinde hidrate bir bulut oluşturur. Bu sterik engel sayesinde diğer nanopartiküller ya da kan komponentleri uzak tutulmuş, hem agregasyonun hem de opsonizasyonun önüne geçilmiş olur. Klivanov ve arkadaşlarının çalışmasında gösterilmiştir ki PEGilasyon, sistemik olarak uygulanan lipozomların yarı ömürlerini 30 dakikadan 5 saate kadar çıkarmıştır (67). Bu çalışmalar sonucunda, 1995 yılında, ilk defa PEGile bir lipozom formülasyonu olan Doxil, FDA tarafından onaylanmıştır (63).

2.6. Nanopartikül-Aktif Hedefleme Ajanı Antikor Konjugasyon Stratejileri

Kemoterapötiklerin, istenen miktarda, azaltılmış toksik etki ile, sağlıklı bölgelere minimum zarar verecek şekilde hedeflenen bölgeye gönderilebilmesi amacı ile, bu kemoterapötikleri taşıyan nanopartiküllere antikorların konjuge edilmesi

yaklaşımı önem kazanmıştır. Bu hedeflendirici antikorların, yüksek afinite ile reseptörlerine bağlanmaları ve hücre içine girişi artırmaları ile ilaç taşıyıcı sistemlere konjugasyonu da üzerinde sıkça çalışılan konulardan olmuştur. Hedeflendirici antikorlar sayesinde, nanopartiküller hücre içine reseptör aracılı endositoz ile girebilirler ve hücre içinde birikebilirler. Reseptör aracılı endositoz sayesinde de P-Gp tarafından tanınmadan hücre içerisinde birikme imkanları olabilir. Antikorların nanopartiküllere istenen oranda ve şekillerde konjuge edilebilmeleri de avantaj yaratan durumlardandır. Lipozomlar, polimerik miseller ve polimerik nanopartiküllere antikor konjugasyonları uygulanmaya başlanmış ve umut verici sonuçlar alınmıştır (68, 69).

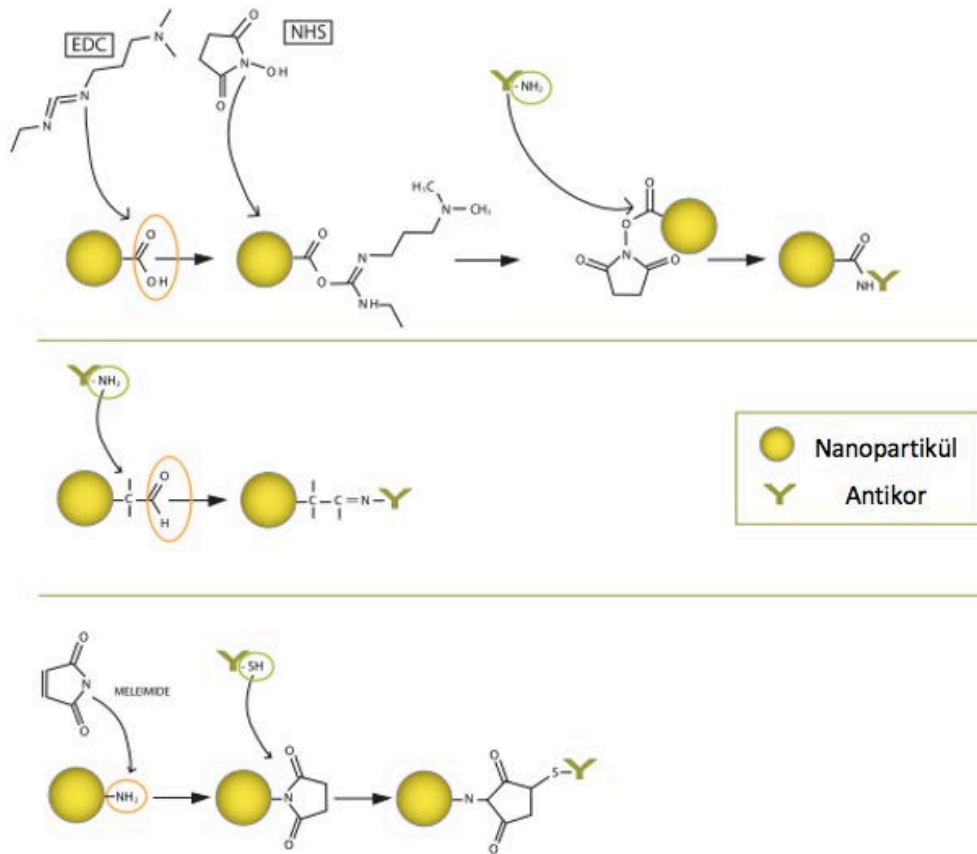
Nanopartiküllerin antikorlar ile konjuge edilmesi işlemi, hedeflendirme için çok büyük önem taşımaktadır. Nanopartiküle konjuge edilen antikorun, spesifik olarak bağlandığı reseptörün, tümör hücresi yüzeyinde eksprese ediliyor olması gerekmektedir. Antikor konjuge nanopartiküller, karşılaşabilecekleri fizyolojik bariyerlerden geçebilmeli, hedeflenen hücreler tarafından tanınabilmeli ve reseptör-antikor etkileşimleri ile hücre içine alınabilmelidir. Hedeflendirici antikorlar, streptavidin ya da biotin gibi adapter moleküllerin aracı olarak rol aldığı reaksiyonlar ile nanopartiküllere adsorbsiyon ile bağlanabilirler. Konjugasyon işlemi etkili, stabil sonuç veren, yüzeyde belirli miktarda hedefleyici antikorun bulunmasını sağlayacak bir yöntem olmalıdır. Bu kimyasal işlemler sırasında da antikorun etkinliğinin kaybolmadığı analizler ile gösterilmelidir (70).

NHS-EDC kimyası ile konjugasyon

Konjugasyon işlemi, fiziksel adsorbsiyona göre çok daha üstündür; fiziksel adsorbsiyonda antikor kan proteinleri tarafından nanopartikülden uzaklaşabilir. Konjugasyonda, nanopartiküllerin yüzeyinde en çok bulunan kimyasal gruplar kullanılır. Bu gruplar genellikle aminler ve karboksilik asit uçlarıdır. Antikorların konjuge edilmeleri için kullanılan metodlar özet olarak Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Özetle; 1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) ve N-hydroxysuccinimide (NHS) varlığında nanopartikül yüzeyindeki karboksilik asit uçları

ile antikordaki primer amin grupları reaksiyona girmektedir. Bu reaksiyondan stabil bir amid bağı meydana gelmektedir. Bunun yanında, partikül yüzeyindeki amin gruplarının, antikordaki sülfidril grupları ile maleimid kimyası üzerinden bağlanması sonucunda yine sağlam bir tiyoeter bağı oluşmaktadır. Bu metod diğerine göre daha tercih edilebilir bir metoddur (71).

Şekil 2.6'da gösterildiği gibi, 1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) ve N-hydroxysuccinimide (NHS) varlığında nanopartikül yüzeyindeki karboksilik asit uçları ile antikordaki primer amin grupları reaksiyona girmektedir. Bu reaksiyondan stabil bir amid bağı meydana gelmektedir (Üstte). Partikül yüzeyindeki aldehit grupları ve antikordaki primer amin gruplarının reaksiyonu (Ortada). Partikül yüzeyindeki amin gruplarının, antikordaki sülfidril grupları ile maleimid kimyası üzerinden bağlanması sonucunda yine sağlam bir tiyoeter bağı oluşmaktadır (Altta).



Şekil 2.6. Nanopartiküllere antikor konjugasyonu stratejileri (68)

2.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.7.1. Fare (bEnd.3) ve İnsan (hCMEC/D3) Beyin Endotelyal Hücreleri

KBB'nin ilaç moleküllerinin beyne geçişini engellemesi sebebiyle, merkezi sinir sistemi hastalıklarını hedef alan ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde in vitro deneylerde KBB'nin modellenmesi ve ilaç taşıyıcı sistemin bu modelde test edilmesi önem taşımaktadır. İyi karakterize edilmiş biyolojik hücreler ile gerçekleştirilen in vitro çalışmalar, ilaç taşıyıcı sistemin KBB'ye penetrasyonunun ölçülmesinde ve hedefleme stratejilerinin çalışıp çalışmadığının gösterilmesinde yararlı olabilmektedir. KBB'nin seçici geçirgen yapısını oluşturan sıkı kavşaklar, endotelyal hücreler arasında bulunmaktadır. KBB, hidrofilik moleküllerin beyne geçişine izin verirken, endotelyal hücrelerde eksprese edilen P-gp gibi transporterları ise lipofilik moleküllerin kandan beyne transselüler geçişine engel olmaktadır (4, 8, 12, 17, 72, 73).

Günümüzde bilimsel araştırmalarda kullanılmak üzere, Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu (ECACC) gibi piyasadaki hücre bankalarında bulunan bEnd.3 ve b.End5 hücreleri, fare beyinlerinden elde edilmiştir. bEnd.3 hücreleri fare beyin endotelyal hücreleridir ve KBB'nin birincil komponenti olarak kabul edilen hücrelerdir. bEnd.3, domuz PBMEC/C1-2 ve insan hCMEC/D3, gibi beyin kapiller endotelyal hücre hatları ya da serebral olmayan CaCo-2, MDCK-MDR1 ve ECV304 gibi hücre hatları, KBB'nin modellendiği in vitro çalışmalarda sıkı paraselüler bariyerler oluşturabilirler. Bunların yanında, akış modelli boş-fiber modeller, mikrofluidik modeller ya da insan pluripotent kök hücre kökenli in vitro modeller de varolsa da, bu yaklaşımlar uzmanlık gerektirdikleri ve çok yaygın olarak kullanılmadıkları için dezavantaj sağlamaktadırlar (74, 75).

bEnd.3 hücreleri, aslında serebral mikrovasküler hücre biyolojisi araştırmalarında kullanılmak üzere üretilmiş olsa da, KBB'nin geçilmesini hedefleyen ilaç taşıyıcı sistem tasarımlarının in vitro modellerinde de sıklıkla kullanılmaktadırlar. Yabancı maddelerin KBB'den geçişini engelleyen birçok transporter eksprese etmektedir. bEnd.3 hücre hattı, tıpkı primer fare endotelyal hücreleri gibi, floresein

permeabilitesi göstermekte ve klaudin-5 sıkı kavşak proteini eksprese etmektedir. Ayrıca, P-gp, glukoz transporter (GLUT1) ve monokarboksilik asit transporter (MCT1) gibi çeşitli transporterleri bulundurmaktadır. TfR1 gibi reseptörleri de eksprese etmektedir (76).

1970lerde, KBB'nin in vitro ortamda taklit edilebilmesi için, serebral mikrodamar endotelyal hücrelerin (CECs) izole edilmeye başlanmıştır. Ancak, bu hücrelerin insan taze serebral dokusundan elde edilmesi, hücrelerin çalışmalarda kullanılması için pratik bir yol olmadığından, araştırmacılar başka hücre hatlarına yönelmişlerdir. hCMEC/D3 hücre hattı, stabil, kolayca çoğaltılabilen ve transfer edilebilen bir hücre hattı olma üstünlüklerini taşıdığı için, KBB'yi taklit etmede üstünlük sağlamıştır. hCMEC/D3 hücreleri, in vivo insan KBB hücrelerin reseptörlerinin çoğunu (örneğin; MDR1, BCRP, MRP4, TfR, insülin reseptörü vs) eksprese etmektedir. Bu hücre hattı, ilaçların hücre içine alımı, aktif transportu gibi çalışmalarda KBB'nin taklit edilmesinde kullanılabilir (76, 77).

In vitro ve in vivo GBM modelleri için en çok kullanılan iki hücre hattı U251 ve U87 hücre hatlarıdır. U251 malignant glioma Hücre hattı, 75 yaşındaki bir erkek hastadan alınmıştır ve U87 malignant glioma hücre hattı ise, pleomorfik glioma hastası bir kadından elde edilmiştir. Bu iki hücre hattı GBM modellemelerde sıklıkla kullanılsa da, invazyon ve hücre migrasyonu gibi konularda birbirlerinden farklılıklar gösterirler. Li ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmaya göre, aynı koşullarda, U87 hücreleri U251 hücrelerine göre daha hızlı proliferasyon göstermektedir ve daha hızlı migrasyon özelliği göstermektedir. U87 hücrelerinin daha agresif olması, in vitro ve in vivo çalışmalarda GBM modellerinin oluşturulması konusunda üstünlük sağlamaktadır (78, 79).

2.7.2. Hücrelerin Canlılıkları Üzerine Nanopartiküllerin Etkilerinin Değerlendirilmesi

Nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ve ilaç yüklenmesi aşamalarından sonra, bu formülasyonların hücre hatları üzerindeki sitotoksitelerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. İlaç yüklenmiş ve yüklenmemiş

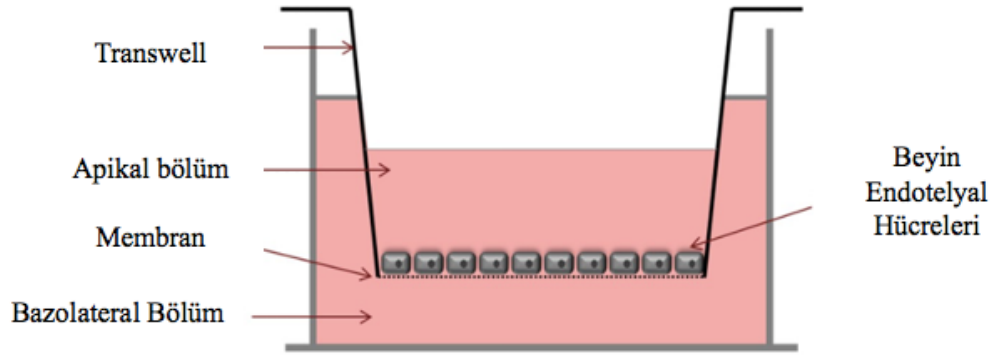
halde hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre hatları üzerine sitotoksitesi, MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT testi; mitokondriyal aktivitenin tetrazolyum tuzlarını renkli formazan kristallerine dönüştürmesini temel almaktadır (80).

2.7.3. Nanopartiküllerin Hücre İçerisine Alım ve Transitoz Çalışması

Nanopartiküllerin hücre içerisine alım çalışmaları, konfokal, floresan mikroskop analizleri ya da bunlarla birlikte akım sitometri yöntemi ile araştırılabilmektedir. Nanopartiküllerin uygun boyalar/belirteçler ile işaretlenmesi sonrasında, hücre içerisine alımları incelenebilmektedir. Mikroskopi yöntemleri ile yalnızca belirli sayıda hücre değerlendirilebileceğinden akım sitometri yöntemi kantitatif analiz üstünlüğü ile öne çıkmaktadır. Akım sitometri hücre süspansiyonunun lazer ışığına maruz kaldığı noktadan geçişi sonrasında floresan özellik gösteren hücre sayısı ve floresan şiddetinin ölçülmesine dayanmaktadır (81, 82).

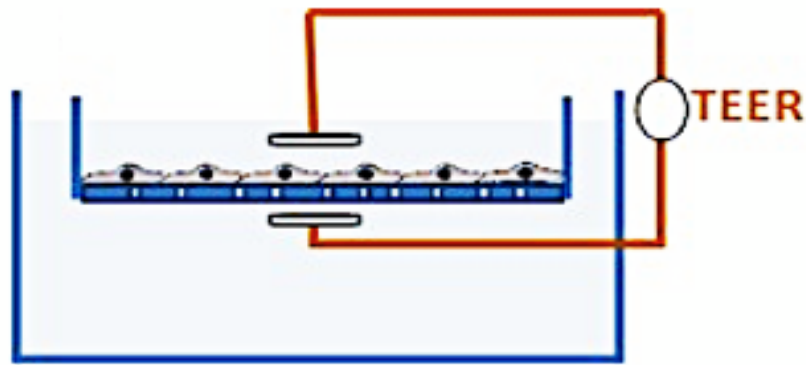
KBB'yi aşmak amacıyla bir nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem geliştirildiğinde öncelikli olarak bu nanopartiküllerin hedeflendirilmesinde kullanılan hedeflendirmenin hücre içine alımı etkileyip etkilemediğinin gösterilmesi en önemli basamaklardandır. Günümüzde KBB ile nanopartiküllerin etkileşimini incelemek amacıyla bilimsel araştırmalarda kullanılmak üzere bEnd.3 ve b.End5 , PBMEC/C1-2 ve insan hCMEC/D3 gibi beyin kapiller endotel hücre hatları geliştirilmiş ve sıklıkla kullanılmaktadır (83).

Transitoz deneylerinde, endotel hücreleri bir insert üzerine ekilerek burada birbirleri arasında sık kavşaklar oluşturarak KBB'yi modellediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Transwell içerisindeki insert'ün taban kısmında, endotel hücrelerinin tutunacağı membran yapısı bulunmaktadır. Transwell sisteminin üst kısmı, KBB'nin apikal (luminal) kısmını temsil ederken, alt kompartmanı (basolateral) bölüm ise KBB'nin beyin tarafını temsil etmektedir (Şekil 2.7). Bu modelde çalışmaya başlamadan önce KBB'nin bütünlüğünün oluştuğunun belirlenmesi amacıyla hücrelerin oluşturduğu transendotelial elektrik direnci (TEER) takip edilmektedir (12, 84).



Şekil 2.7. bEnd.3 hücreleriyle oluşturulan kan beyin engeli modeli

Endotelial hücreler arasındaki sıkı kavşakların sıklığının ölçülmesi için (TEER) kullanılır (Şekil 2.8). TEER, küçük hidrofilik bir molekülün permeabilitesi ile korele bir değerdir. Oluşturulan in vitro modeldeki hücrelerin permeabilitelerinin ve bütünlüklerinin KBB'yi modellemek için uygun olduğunu göstermek için kullanılır. Endotel bütünlüğü sağlandıktan sonra apikale uygulanan nanopartiküllerin bazolateral kısımda geçişinin değerlendirilmesi ile nanopartiküllerin beyne geçişi hakkında fikir elde edilebilmektedir.



Şekil 2.8. Transepitelial/transendotelial elektriksel direnç (TEER), hücre tabakasının ölçülen elektrik direncini ifade eder, hücre tabakasının bütünlüğü ve permeabilitesi hakkında bilgi verir (76).

2.8. İn vivo Glioblastoma Multiforme Modelinin Oluşturulması

GBM modeli oluştururken hücre kültürü yetersiz kalmaktadır çünkü tümörün ve in vivo ortamın kompleks biyolojisini, anjiyogenezi ve metastazi yansıtamamaktadır. GBM modelinin histolojik olarak, genetik olarak insan gliomasına benzemesi ve ortotopik olması gerekmektedir. Çünkü denenecek yeni terapötik sistemlerin klinik verilerinin güvenilir tahminleri için hayvan modelinin insan tümörünü çok iyi şekilde yansıtmaması gerekmektedir (79). Bu tümör ile müdacedelede kullanılacak ilaçların geliştirilmesi için gerekli literatür çalışmalarında hayvan modellerine gereksinim duyulmaktadır. En fazla kullanılan hayvan faredir. Farelerde Fertilize edilmiş yumurtalara DNA mikroenjeksiyonu ya da kök hücreler ile homolog rekombinasyon yöntemi ile genetik değişimler sağlamak diğer türlere göre çok daha kolaydır. Ayrıca farelerin 20 jenerasyondur inbred olarak üretilmiş olmaları ve dolayısı ile genetik olarak birbir aynı olmaları da tercih edilmelerinde etkindir (78, 79).

Nude fareler, insan kanser hücrelerinin transplante edilerek tümör oluşumunu sağlayabilmeleri için kullanılan bağışıklık sistemi zayıflatılmış farelerdir. Bu farelere kanser hücrelerinin ksenotransplantasyonu ile kolaylıkla izlenebilir, kontrol edilebilir, ölçülebilir tümörler elde edilebilmektedir. Bu hücre hatları, otoriteler tarafından test edilmiş ve fareler üzerinde tümörizasyonları kanıtlanmıştır. Bu hücre hatlarının kolayca çoğaltılabilmesi, laboratuvar ortamında sürdürülebilir olmaları da tümör çalışmalarını kolaylaştıran etmenlerdendir. Bu hücre hatları aynı zamanda çeşitli mutasyonlara sahip olabilirler. Ancak hücre hatları her zaman insan tümörlerindeki genetik çeşitliliği ya da tümör içi heterojeniteyi yansıtamaz. İnsan tümör hücrelerinin bağışıklığı baskılanmış (SCID: severely compromised immunodeficient ya da nude) farelere implante edilmesi sonrasında elde edilen sonuçların insanlarda elde edilecek sonuçlar ile paralelliği sorgulanabilir. Daha kolay ve ucuz bir yol olduğu için akademide ve farmasötik endüstride sıklıkla kullanılmaya devam etmektedir (78, 79, 85).

Farelerde GBM modeli oluşturmak için kullanılabilecek yöntemler; ortotopik, ksenograft ya da transgenik olabilmektedir. İdeal bir fare GBM modeli, geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemin klinik sonuçlarının doğru bir şekilde tahmin edilmesine izin verecek özelliklere sahip olmalı, insan gliomasına histolojik benzerlik göstermeli, insan gliomasına genetik bir benzerlik taşımalı ve ortotopik olmalıdır. Transgenik fare modelleri, kolayca yeniden üretilebilir, rastgele manipüle edilebilir ve insan tümörlerine daha yakın modeller oluştursa da, bu modellerin oluşturulması zaman almaktadır ve pahalıdır. Ancak ksenograft ve allograft modeller, genetik olarak modifiye edilmiş modellere göre, ilaçların terapötik etkilerinin araştırılmasına daha hızlı yanıt vermektedir (86).

Beyin tümörü çalışmalarında sıklıkla kullanılan modeller ksenograft modellerdir. Tümör hücrelerinin deri altına subkütan olarak implant edildiği heterotipik modeller ve tümör hücrelerinin intrakraniyal olarak implant edildiği ortotipik modeller olmak üzere iki çeşit ksenograft model vardır. Heterotipik model her ne kadar basit, hızlı ve daha az öldürme oranına sahip olsa da beyin parenkiması mikroçevresinin ve KBB'nin bulunmaması, ilaçların beyne ulaşması ile ilgili çalışmalarda sakınca yaratmaktadır. Ortotopik modeller ise hücrelerin implante edildikten sonra çoğalma hızları ve insan beyin tümörü mikroçevresi ile KBB'nin modelde yer alması açısından prelinik çalışmalar için çok daha uygun modellerdir (85, 87-89).

İn vivo GBM modellerinin oluşturulmasında çok kullanılan hücre hatları – 9L, T9, RG2, F98, RT-2, C6, 9L, GL261, U251MG ve U87MG olmasına karşın, U87MG hücre hattı ile oluşturulan tümörlerin damarlanmasının homojen olması ve BVZ'nin bağlanarak etki ettiği VEGF'i daha fazla salgılaması, çalışmalarda U87 hücre hattının daha çok tercih edilmesine neden olmuştur (90). U87 hücre hattı, daha agresif ve invazif olduğundan, in vivo GMB modelleri için üstünlük taşımaktadır (91).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Yazılımlar

| Cihaz/Yazılım | Marka/Program Adı |
|---|--|
| Akım sitometri cihazı | Becton-Dickinson, A.B.D. |
| Atomik kuvvet mikroskobu | Veeco, A.B.D. |
| Çok noktalı manyetik karıştırıcı | Variomag Telesystem, Almanya |
| Floresan mikroskop | Leica, Germany |
| FTIR cihazı | Bruker, A.B.D. |
| Hassas terazi | Mettler Toledo, İsviçre |
| Isıtıcı manyetik karıştırıcı | IKA, Almanya |
| İnkübatör | Sanyo, Japonya |
| İn vivo görüntüleme sistemi | Newton Vilber, Fransa |
| İstatistik yazılımı | Minitab 16 |
| Laminar hava akımlı kültür kabini | Faster, İtalya |
| Liyofilizatör | Jouan, Danimarka |
| Mikropipetler | Ependorf, Almanya |
| Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı | Malvern Instruments, İngiltere |
| Refraktif İndeks Ölçümü | Schimidt Haensch ATR W2, Almanya |
| Resim düzenleme yazılımları | ImageJ, Image Plus, Adobe Photoshop CS3 |
| Rotavapor | IKA, Almanya |
| Santrifüj aleti | Hermle Z383 K, Almanya |
| Termostatlı yatay çalkalayıcı | Memmert, Almanya |
| Ultra saf su sistemi | Milipore, A.B.D. |
| Vizkozite Ölçümü | Ubbelohde vizkozimetresi, Hacettepe Üniversitesi |
| Vorteks | IKA, Almanya |
| Yüzey Gerilimi Ölçümleri | Attension, Biolin Scientific AB İsviçre |

3.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler

| Madde | Marka |
|---|---------------------------|
| BVZ (Avastin [®]) | Genentech, A.B.D. |
| PLGA (50:50, Mw: 7.000-17.000) | Sigma Aldrich, A.B.D. |
| PLGA-PEG (PEG Mn: 5.000, PLGA Mn: 10.000) | Sigma Aldrich, A.B.D. |
| Etanol | Sigma Aldrich, A.B.D. |
| DMSO | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Formaldehit | Sigma Aldrich A.B.D. |
| DAPI | Sigma Aldrich A.B.D. |
| SDS | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Oleik asit | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Nil Kırmızısı | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Tetrahidrofuran | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Trietil amin | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Etil Kloroformat | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Etil Asetat | Sigma Aldrich A.B.D. |
| MgSO ₄ | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Pluronic F-68 | Sigma Aldrich A.B.D. |
| Tween 20 | Merck, Almanya |
| Saflaştırılmış İnsan Anti-CD71 Antikoru | Biolegend, A.B.D. |
| Saflaştırılmış Fare Anti-CD71 Antikoru | Biolegend, A.B.D. |
| Saflaştırılmış Sıçan IgG2a, κ İzotip Kontrol Antikoru | Biolegend, A.B.D. |
| Saflaştırılmış Fare IgG2a, κ İzotip Kontrol Antikoru | Biolegend, A.B.D. |
| DMEM | Lonza, İsviçre |
| FBS | Lonza, İsviçre |
| L-Glutamin | Lonza, İsviçre |
| Penisilin-Streptomisin | Lonza, İsviçre |
| Tripsin EDTA | Lonza, İsviçre |
| Endogro temel besiyeri ortamı | Milipore, Almanya |
| Endogro destek kiti | Milipore, Almanya |
| Slide-A-Lyzer [®] Diyaliz Kaseti | Thermo Scientific, A.B.D. |

3.3. Bevasizumab'ın Ticari Ürün Formülasyonundan Elde Edilmesi

Tez çalışmaları kapsamında gerçekleştirilecek çalışmalar için kullanılacak olan BVZ, tek başına bir molekül olarak satın alınamadığından, ticari formu olan Avastin® satın alınmış ve 25 mg/ml konsantrasyonda BVZ içeren bu formülasyondaki yardımcı maddeler diyaliz yöntemi ile uzaklaştırılmıştır. Avastin® formülasyonu içeriği aşağıda verilmiştir:

- 25 mg/ml BVZ
- 51 mM Sodyum Fosfat pH 6,2 Tamponu
- 60 mg/ml α,α -trehaloz dihidrat
- %0,04 polysorbate 20

25 mg/ml Bevacizumab içeren formülasyonun 3 ml'si, 3.500 MWCO diyaliz kaseti içerisine bir şırınga yardımı ile eklenmiştir. Kasetin kapağı uygun şekilde kapatılarak manyetik karıştırıcı üzerindeki 1 L'lik ultra saf su ortamı içerisine yerleştirilmiştir. Diyaliz kasetinin membran por açıklığı değeri, küçük moleküllerin geçebileceği ancak Bevacizumab'ın geçemeyeceği şekilde belirlenmiştir. Bu şekilde BVZ diyaliz kaseti içerisinde kalırken, formülasyon bileşenleri diyaliz kasetinin içerisine yerleştirildiği ultra saf su ortamına geçmiştir. Diyaliz işlemi +4°C'de 2 saat boyunca sürdürülmüş, daha sonra diyaliz ortamı tazelenerek 2 saat daha devam ettirilmiştir (Şekil 3.1). Diyaliz ortamı yeniden değiştirilerek, gece boyunca diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonrasında kaset içerisinde kalan BVZ çözeltisi şırınga yardımı ile alınarak, tez kapsamındaki tüm deneylerde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.



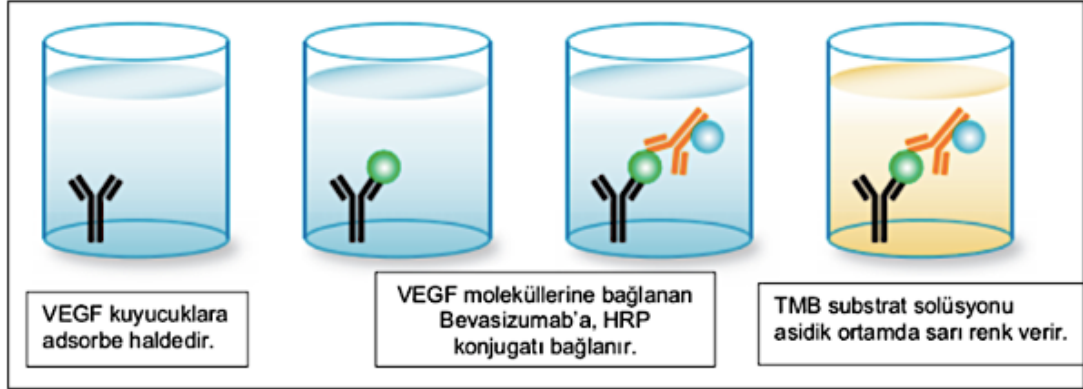
Şekil 3.1. Bevasizumab'ın formülasyon bileşenlerinden diyaliz yöntemi ile ayrılması çalışması görüntüsü

3.4. Bevasizumab Miktar Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu

BVZ miktar tayini ELISA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında kullanılan ELISA metodu, İLKOGEN İlaç San. Ve Tic. A.Ş firmasından Uzm. Melike Berksöz tarafından geliştirilmiş ve valide edilmiş, tez çalışmaları için bağışlanmıştır.

ELISA prensibi şu şekilde açıklanabilir: Bir hücre kültürü plağının her bir kuyucuğu BVZ'nin bağlandığı VEGF ile kaplanmıştır. Örnekler ve standartlar bu kuyucuklara eklendiğinde BVZ molekülleri VEGF moleküllerine bağlamakta ve kuyucukların içerisinde kalmaktadır. Yıkama işlemleri ile bağlanmayan diğer moleküller ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada eklenen Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatı bir glikoproteindir ve VEGF'lere tutunmuş olan BVZlere bağlanmaktadır. 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) substrat solüsyonu ise HRP varlığında mavi renk vermektedir. Son olarak eklenen durdurma çözeltisi ise asidik bir

çözeltidir ve asidik ortamda mavi renk sarı renge dönmekte, absorbansı sabitlenmektedir (Şekil 3.2). HRP ve TMB arasındaki bu etkileşimden faydalanarak, kuyucuklar içerisindeki VEGF'e bağlı BVZ miktarı kolorimetrik olarak kantitatif miktar tayinine olanak vermektedir.



Şekil 3.2. ELISA çalışma prensibi şematik gösterimi. (www.bio-rad-antibodies.com)

ELISA prosedürü aşağıda açıklanmıştır:

Çözelti ve Materyal Hazırlanması:

- Plaka kaplama tamponu olarak, 200 mM karbonat/bikarbonat tamponu (pH:9,4) hazırlanmıştır.
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) hazırlanmıştır.
- 100 µg/ml VEGF stoğu hazırlanmıştır.
- Yıkama çözeltisi (0,05 % PBS-T): Ara stok olarak, 1x PBS içerisinde 10 % (v/v)'luk Tween-20 çözeltisi hazırlanmıştır. Ara stoktan 5 µl alarak 1 litre PBS ile karıştırılmıştır.
- Bloklama çözeltisi (5 % süt): 5 g yağsız süt 100 ml 1X PBS içerisinde çözülmüştür.

Not: Tüm solüsyonlar hazırlandıktan sonra 2-8 °C'de saklanmıştır. Deneye başlamadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.

BVZ referans standart hazırlanması:

Standart eğri oluşturulması için 25 mg/ml Avastin/Altuzan stoğundan seri seyreltme yapılmıştır. 500, 125, 62,5, 31,25, 15,7, 7,8, 3,9 ve 1,95 ng/ml konsantrasyonlardan en az 6 tanesini kapsayacak şekilde bir standart aralığı

oluşturulmuştur. Bu aralık, analizi yapılacak test örneğinde beklenen BVZ miktarına göre seçilmiştir. Seyreltme için bloklama solüsyonu kullanılmıştır.

Ön hazırlıklar:

- TMB substrat çözeltisi deney başlamadan önce oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Optimum test performansı için oda sıcaklığı $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ arasında tutulmuştur.

Deney Protokolü:

- Her kuyucuğa 100 µl seyreltilmiş VEGF çözeltisinden eklenmiş ve 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası kuyucukların içeri dökülmüştür. Sonrasında her bir kuyucuğa 200'şer µl 0,05 % PBST solüsyonu doldurulmuş ve hafifçe çalkalayıp dökülmüştür. Yıkama işlemi 4 kez tekrar edilmiştir. En sonunda plak kağıt bir havluya hafifçe vurularak kuyucuklarda kalan tüm yıkama solüsyonu uzaklaştırılmıştır.
- Her kuyucuğa 100 µl bloklama çözeltisi eklenerek oda sıcaklığına 1 saat boyunca 200 rpm'de çalkalanmıştır.
- Kuyucuklar 200 µl 0,05 % PBST ile 4 kez yıkanmıştır.
- Plak içerisine, hazırlanan standartlar, test örnekleri, kör örnek ve negatif kontrolden 100'er µl eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
- Kuyucuklar 200 µl 0,05 % PBST ile 4 kez yıkanmıştır.
- Seyreltilmiş Anti human fc-HRP sekonder antikor çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanacak toplam hacim, her kuyucuğa 100 µl eklenecek şekilde ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

Not: Sekonder antikor her kullanımdan önce taze hazırlanmalıdır.

- Kuyucuklar 200 µl 0,05 % PBST ile 4 kez yıkanmıştır.
- Her kuyucuğa 100 µl substrat çözeltisinden eklenmiştir. Plak alüminyum folyo ile sarılarak 15 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 15 dakikanın sonunda BVZ içeren referans ve test örneklerinde solüsyon maviye dönmüş olmalıdır.
- Her kuyucuğa durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Bu işlem sonucunda mavi renk sarıya dönmelidir.

- Spektrofotometrede 450 nm’de absorbands ölçümü yapılmıştır. Test örneğindeki BVZ miktarı, referans ürünle hazırlanan 4 parametrelili standart eğriye göre hesaplanmıştır.

Elisa Yöntemi Validasyonu

VEGF-Bevacizumab etkileşimine dayanarak oluşturulan ELISA metodunun, Bevacizumab miktarını belirleme amacıyla kullanımının uygunluğunu göstermek için validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Analiz uygunluğu aşağıdaki denklemler ile değerlendirilmiştir:

% RE : % Bağlı Hata ya da deney doğruluğu

% CV : Standart Sapma ya da deney kesinliği

$$\% RE: \frac{(\text{Ölçülen ortalama konsantrasyon} - \text{Nominal konsantrasyon}) \times 100}{\text{Nominal Konsantrasyon}}$$

$$\% CV: \frac{\text{Optik dansiteler arasındaki standart sapma} \times 100}{\text{Ortalama optik dansite}}$$

Çift tekrarlı ölçülen optik dansiteler arasındaki kesinlik (% CV) ve doğruluk (%RE) her konsantrasyon için sırasıyla $\leq 20\%$ ve $\leq \pm 20\%$ olmalıdır.

Doğrusallık

Metodun tekrar edilebilir şekilde doğrusal cevap verdiği konsantrasyon aralığını belirlemek için şu konsantrasyonlarda BVZ çözeltileri hazırlanmıştır: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,813, 3,906 ve 1,953 ng/ml. Seyreltme için Bloklama çözeltisi (5 % süt) kullanılmıştır. Doğrusallık testi için, yeni örnekler hazırlanarak, test 3 gün tekrarlanmıştır. Konsantrasyon-cevap ilişkisini en iyi tanımlayan eğrinin 4 parametrelili lojistik fit olduğu belirlenmiştir. Softmax Pro yazılımı ile oluşturulan standart eğriye 4 parametrelili lojistik fit eğri modeli uygulanmıştır. Regresyon katsayısının (R^2) 1’e yakın olması standart eğrinin uygun olduğunu göstermektedir.

Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Günler arası kesinlik çalışması için, testler 5 ayrı günde tekrarlanmıştır. Örnekler kalibrasyon standart aralığını kapsayacak şekilde her ölçümden önce seri seyreltme ile hazırlanmıştır. Tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesinde kalibrasyon standartlarının geri hesaplanmış konsantrasyonları ve optik densite değerleri baz alınmıştır. Her bir günde ölçülen ortalama değerler günler arası CV %'nin hesaplanmasında kullanılmıştır.

Deney İçi Tekrarlanabilirlik

Deney içi tekrarlanabilirlik çalışması için, örnekler aynı plaka üzerinde 5 veya 6 farklı kuyucuğa eklenmiştir. Kalibrasyon aralığındaki düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlara denk gelen 5 seviyede örnek hazırlanmıştır. Her deney için 1,95 ng/ml-500 ng/ml arasında standart eğri hazırlanmıştır. Ölçümler 3 ayrı günde tekrarlanmış ve hergün için kuyucuklarda ölçülen optik densite değerleri arasındaki % CV'ler hesaplanmıştır.

Doğruluk

Deney doğruluğunu göstermek için, 4 gün boyunca ölçümler alınmıştır. 4 günde yapılan ölçümlerde kalibrasyon standartlarının geri hesaplanmış konsantrasyonları ile nominal konsantrasyonlar arasındaki bağıl hata hesaplanmıştır. Bu çalışma için kabul edilen değer, sınır konsantrasyonları için bağıl hata $\pm 25 \%$, çalışma aralığı için $\pm 20 \%$ olarak belirlenmiştir.

3.5. Bevasizumab Ön Stabilite Çalışmaları

BVZ gibi antikor yapısındaki maddeler ile çalışılırken, bu maddenin etkinliğine etki edebilecek faktörler göz önüne alınarak ön stabilite testleri uygulanmalıdır. Nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemin hazırlanması aşamasında literatür araştırması sırasında elde edilen alternatif yöntemler değerlendirilirken, antikor yapısında olan etkin maddeye muhtemel etkileri araştırılmalıdır. Bu sebeple, nanotaşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla karşılaşılan pH, sıcaklık ve mekanik stres maruziyetlerinin BVZ

üzerine olası etkileri DLS yöntemi ile incelenmiş, nanotaşıyıcı sistemin hazırlanması yöntemine karar verilirken göz önünde bulundurulmuştur.

Sıcaklık Etkisi

Sıcaklığın BVZ stabilitesine olan etkisi Malvern Zetasizer Nano ZS instrument cihazı ile incelenmiştir. Oda sıcaklığındaki BVZ'nin hidrodinamik çap ölçümleri gerçekleştirilmiş ve daha sonra çeşitli sıcaklıklarda ölçümler yapılarak BVZ'nin agregasyon noktası ve Tonset noktası tayin edilmiştir. BVZ partikül büyüklüğü ölçüm parametreleri Tablo 3.1 ile gösterilmiştir. BVZ 25 mg/ml çözeltisinden 45 uL alınarak, ısıtma işlemi için uygun olan ölçüm küveti (quartz micro cuvette, ZEN2112 (Hellma Analytics, Germany) içerisine konmuştur. Her ölçüm öncesi ve sonrasında küvet, Altuzan® ortamı ile yıkanmıştır. Altuzan® ortamı; 51 mmol/L sodyum fosfat, 60 mg/ml trehaloz dihidrat, ve 0,4 mg/ml polysorbat 20 ile hazırlanmış, 0,22 µm filtreden geçirilmiştir. Çözeltinin pH'ı 6,2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamın vizkozitesi Ubbelohde vizkozimetre ile ve refraktif indeksi refraktometre ile ölçülmüştür.

Tablo 3.1. BVZ partikül büyüklüğü için ölçüm parametreleri (92)

| | |
|-----------------------------|--|
| Örnek Adı | BVZ 25 mg/ml |
| Küvet | ZEN2112 (Hellma Analytics, Almanya) |
| Örnek Hacmi | 45 µL |
| Materyal | Protein |
| Dispersiyon Ortamı | 51 mmol/L sodyum fosfat, pH 6,2, 60 mg/ml trehaloz dihidrat, and 0,4 mg/ml polisorbat 20. Vizkozite: 1,0178 mPa.s, Refraktif indeks : 1,342 |
| Ölçüm Sıcaklığı | 25 °C |
| Ölçüm Açısı | 173 °C |
| Ölçüm Sayısı | 11 |
| Ölçüm Tekrarı | 3 |
| Pozisyon Metodu | Optimum Pozisyon |
| Otomatik Attanüasyon | Evet |

BVZ'nin agregasyon onset noktasının tayin edilmesi amacıyla, ilk olarak sıcaklık 25 °C'ten 80 °C'ye 5 °C intervalde yükseltilmiştir. Öncül deneyler sonrasında analizler, 60 °C ve 70 °C arasında 1 °C intervalde gerçekleştirilmiştir. Vizkozite ve refraktif indeks, sıcaklıkla değiştiği için her bir sıcaklık için bu parametrelerin değiştirilmesi mümkün olmamıştır. Bu yüzden, Altuzan® ortamı ve su ile ölçümler yapılarak karşılaştırılmış ve iki ortamın partikül büyüklüğüne etkisinin 2 nm fark oluşturduğu görülmüştür. Bu yüzden analizlerde, Zetasizer Software v7.11.'in otomatik olarak vizkozite ve refraktif indeksi değiştirebilmesi için, dispersiyon ortamı olarak su kullanılmıştır. Deney ayrıntıları Tablo 3.2'de verilmiştir. BVZ'nin agregasyon noktasının belirlenmesi çalışmalarında, ortalama partikül büyüklüğü, PDI değeri ve sayım oranının türevi parametre olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.2. BVZ'in agregasyon noktası analizi için ölçüm parametreleri (92)

| | |
|----------------------------------|--|
| Örnek Adı | BVZ 25 mg/ml |
| Küvet | ZEN2112 (Hellma Analytics, Almanya) |
| Örnek Hacmi | 45 µL |
| Materyal | Protein. |
| Dispersiyon Ortamı | Değişken vizkozite ve refraktif indeks sebebi ile su olarak seçilmiştir. |
| Ölçüm Başlangıç Sıcaklığı | 60 °C |
| Ölçüm Bitiş Sıcaklığı | 70 °C |
| Sıcaklık İntervali | 1 °C |
| Dengelenme Süresi | 180 sn |
| Ölçüm Süresi | Otomatik |
| Ölçüm Sayısı | 1 |
| Pozisyon Metodu | Optimum Pozisyon |
| Otomatik Attanüasyon | Evet |

Mekanik Stres Etkisi

Nanopartikül hazırlama prosesinde, BVZ'nin maruz kalacağı fiziksel stres unsuru olan sonikasyon basamağı değerlendirilmiştir. BVZ'nin agregasyonu ya da yapısal değişimleri etkinliğinin kaybolmasına ya da immünojenizite gibi yan etkilere yol açabileceği için bu etkilerin değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Bunun için 25, 10 ve 0,1 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan BVZ çözeltileri (ortam içerisinde), Ultrasonik Prob (Bandelin) cihazı ile, %30 Genlik değerinde (~45 Watts) 10 saniye, 1 dakika ve 3 dakika sonike edilmiştir. Sonikasyonun termal etkisinin ortadan kaldırılması için tüm deney prosedürü buz banyosu ile gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için sonrasında DLS yöntemi ile partikül boyutu ve PDI ölçümü yapılmış ve karşılaştırılmıştır.

pH Etkisi

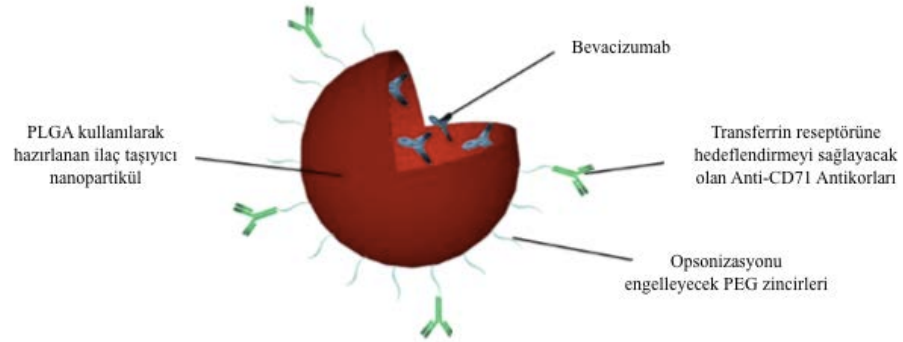
Aşağıdaki şekilde tasarlanan deneyler ile BVZ'nin partikül büyüklüğü, dolayısı ile agregasyonu ile ortam pH'ın arasındaki ilişki incelenmiştir.

- Farklı pH ortamlarının farklı konsantrasyondaki (25, 10, 0,1 mg/ml) BVZ çözeltileri üzerine olan etkisi incelenmiştir.
- Her konsantrasyon için, eşit hacimlerdeki Avastin ortamı ile 5'er adet pH ortamı (pH 3,5,7,9 ve 11) hazırlanmıştır.
- Her bir konsantrasyondaki BVZ Çözeltisinden 10'ar µl alınmış, her bir ortamda hafif pipetajlanarak 5 dk bekletilmiş, ve DLS yöntemi ile PB ve PDI ölçümü yapılmıştır.

3.6. İlaç Taşıyıcı Sistemin Tasarlanması

BVZ'nin beyne hedeflendirilebilmesi amacıyla, öncelikle BVZ'yi istenilen hedefe taşıyabilecek nanopartiküller hazırlanmış, Bu sistemlerin hazırlanmasında FDA tarafından kullanımı onaylanmış PLGA polimerlerinin, kanda kalış süresini artırılması için PEG ile konjuge edilmiş formları kullanılmıştır. Beyine hedeflendirme, kan-beyin endotelinde eksprese olduğu bilinen TfRler hedef alınarak, bu reseptöre spesifik antikörlerin nanopartiküllere konjugasyonu ile sağlanmıştır. Anti-CD71

antikorlarının PLGA-PEG nanopartiküllerine konjugasyonu ise, sentezlenen OCA molekülünün aracılığı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Tasarlanan ilaç taşıyıcı sistem: Anti-CD71 antikoruna konjug edilmiş PLGA-PEG Nanopartikülü

OCA molekülü ile nanopartiküllere konjuge edilecek olan hedefleyici ve kontrol antikorları, hücre kültürü çalışmalarında ve in vivo GBM modeli geliştirilirken kullanılacak olan hücre hatlarına spesifik seçilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında hem insan hem fare hücre hatları ile çalışılmıştır. Bu sebeple, nanopartiküller ile toplam 4 çeşit antikor; Anti-İnsan CD71 Antikoru, Anti-Fare CD71 antikoru ve bu antikora özel izotip kontrol antikorları nanopartiküllere konjuge edilmiştir. Aşağıda hücre hatları için ayrı ayrı hazırlanan hedeflendirilmiş ve kontrol antikoruna konjuge edilmiş nanopartiküllerin açıklamaları yer almaktadır. İzotip kontrol antikorları, Anti-CD71 antikoru ile aynı yapıda olup, reseptöre spesifik olmayan antikorlardır. Aşağıda yer alan 4 farklı nanopartikül çeşitinin hazırlanma metotları aynıdır. Her biri OCA molekülü aracılığı ile nanopartiküllere konjuge edilmiştir.

bEnd.3 hücreleri ile çalışılırken:

Hedeflendirilmiş nanopartiküller: Anti-Fare CD71 NP

İzotip kontrol antikoruna konjuge edilmiş nanopartiküller: Anti-Rat CD71 NP

hCMEC/D3 ve U87 insan hücreleri ile çalışılırken:

Hedeflendirilmiş nanopartiküller: Anti-İnsan CD71 NP

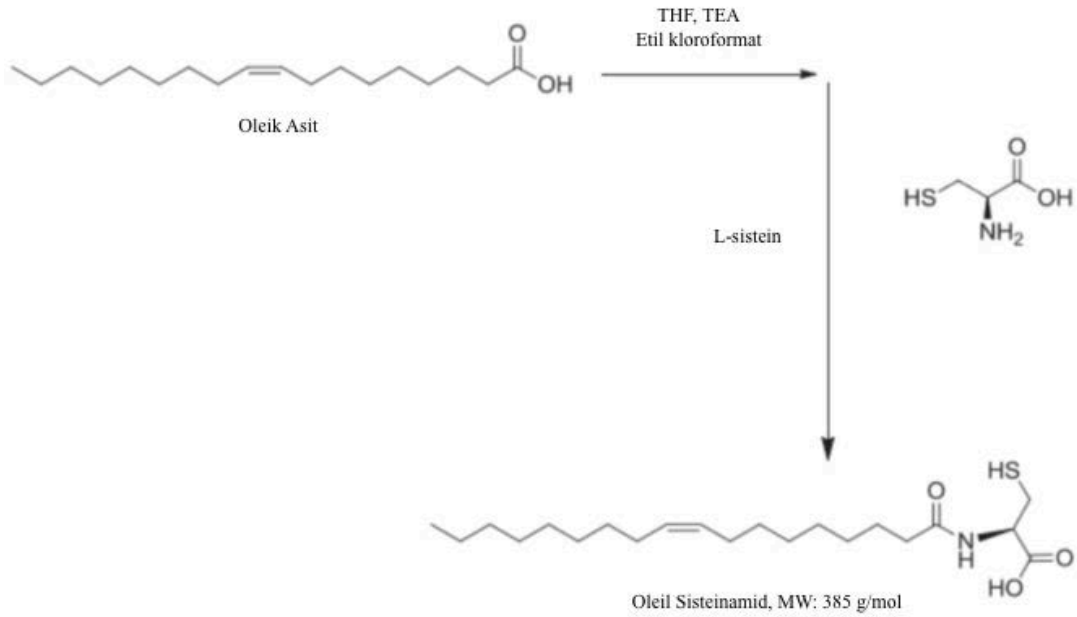
İzotip kontrol antikoru ile konjuge edilmiş nanopartiküller: Anti-Fare CD71 NP

Tez metninin devamında, bulguların daha anlaşılır kılınması için hedeflendirilmiş olan nanopartiküller "Anti-CD71 NP" ve izotip kontrol antikoru ile konjuge edilmiş nanopartiküller de "Kontrol NP" olarak ifade edilecektir. Bu ifadelerdeki Anti-CD71 antikoru ve izotip kontrol antikoru yukarıda belirtildiği gibi çalışılan hücre hattına göre seçilmiş ve konjuge edilmiştir ancak, bulgular kısmında daha yalın bir anlatım için, hedeflendirilmiş nanopartiküller "Anti-CD71 NP" ve izotip kontrol antikoru konjuge edilmiş nanopartiküller ise "Kontrol NP" olarak kodlanmıştır.

3.6.1. Oleil Sisteinamid Sentezi ve Analizleri

NHS-EDC bağına göre daha verimli sonuç verdiği bilinen, PLGA-PEG ile elde edilen nanopartiküllere OCA ile Anti-CD71 konjugasyonu yolu izlenmiştir. OCA, amfifilik bir bağlayıcı moleküldür. Lipofilik oleik asitin polar tiyol grupları ile fonksiyonelleştirilmesi ile elde edilir. Amfifilik özelliği sayesinde, lipofilik ucu polimerin matriksinde konumlanırken, polar (hidrofilik) grup ise PLGA nanopartikülün yüzeyine tutunur. Böylece PLGA nanopartikülün yüzeyinde tiyol uçlarının yerleşmesi sağlanır. Bu metotta, konjuge edilecek olan antikoru (Anti-CD71 ve kontrol antikoru Ig), maleimid içeren bir bileşik olan süksinimidil-4-(N-maleimidometil)sikloheksan-1-karboksi-(6- amidokaproat) (LC-SMCC) ile aktifleştirilmiş ve sentezlenen OCA aracılığı ile PLGA nanopartiküle bağlanmıştır [5]. İşlem basamakları aşağıda sıralanmıştır ve Şekil 3.4 ile sentez şematik olarak gösterilmiştir.

- Hazırlanan erlen içine azot akışı altında, 60 ml Tetrahidrofur, 0,5 ml Triethyl amine, 2 g oleik asit eklenmiş ve karıştırılmıştır. İç sıcaklığın -15°C olması gerekmektedir. Sıcaklık termometre ile kontrol edilmiş ve sistemin çevresine yerleştirilen kuru buz ile soğuma sağlanmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan erlene 0,87 ml etil klorofomat eklenmiş ve karışmaya bırakılmıştır.



Şekil 3.4. Oleil Sisteinamid sentezi

- Karıştırma devam ettikçe, iç sıcaklık 8-10^oC'ye yükselmiş ve beyaz katı çökelek gözlenmiştir. İç sıcaklık yeniden -15^oC'ye düşene kadar beklenmiştir.
- Azot gazı kapatılmış ve hazırlanan sistein çözeltisi (10 ml 5% Na₂CO₃ içerisinde 2 g sistein çözülmüştür), 10 dakika boyunca, manuel karıştırma altında, şırınga yardımıyla erlene eklenmiştir. İç sıcaklık 25^oC'ye yükselmiş ve kabarcıklanma gözlenmiştir. 30 dk karıştırmaya devam edilmiştir.
- Oda sıcaklığına alınan erlene, 100 ml THF eklenmiş ve 5 dk karıştırılmıştır. Tromp yardımıyla filtreden geçirilerek amonyak tuzları uzaklaştırılmıştır. Rotavapor yardımıyla da 100 ml THF uzaklaştırılmıştır. Üzerine 100 ml 1N HCl eklenerek asitlendirilmiştir.
- 100 ml etil asetat koyulmuş ayırma hunisi üzerine asitlendirilmiş çözelti eklenmiş, iyice karıştırılmış ve ayrılması için bekletildikten sonra organik faz bir erlene alınmıştır.
- Organik faz üzerine MgSO₄ eklenerek kurutulmuştur. Tromp yardımıyla süzülerek fazlalıklardan kurtulması sağlanmıştır.

- Rotavapor yardımıyla etil asetat uçurulmuş ve viskoz bir kalıntı elde edilmiştir. Bu kalıntı 5 ml etil asetat içinde çözülmüş ve önceden hazırlanan silika (25 g Merck 60 230-400 mesh) yüklü saflaştırma kolonu içine yüklenmiştir. Örneğin tamamı kolondan çıkana kadar sürekli mobil faz (Etilasetat:Hekzan (1:1))eklenmeye devam edilmiştir.

Oleil Sisteinamid analizleri

- Sentezlenen OCA molekülünün, doğru şekilde sentezlendiğinin gösterilmesi amacıyla, ODTÜ Merkezi Laboratuvarı'nda Ultra Performanslı Sıvı Kromatografi- Kütle Spektrometresi (UPLC-MS) ve H-NMR ile analizleri gerçekleştirilmiştir.
- UPLC-MS tekniğinde, yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. UPLC tekniği ile karışımlardaki bileşenleri ayırt etmek mümkün olurken, MS tekniği ile de ayrılan bileşenin yapısal özellikleri yüksek moleküler seçicilik ve deteksiyon duyarlılığı ile saptanmaktadır.
- H-NMR tekniği ise, kuvvetli bir manyetik alan içerisine yerleştirilen bir molekülde bulunan bazı atom çekirdeklerinin radyo frekansı alanındaki elektromanyetik ışınları absorblaması üzerine kurulmuş bir yapı aydınlatma tekniğidir. H-NMR spektroskopisinde absorpsiyon bantları "pik", absorpsiyon pikleri ile frekansların işaretlenmesi ile elde edilen grafik "NMR spektrumu" olarak adlandırılır. H-NMR tekniğini diğer spektroskopik yöntemlerden farklı kılan durum ise, elementel analizdeki gibi atom yüzde değerlerini değil, molekülün iskeleti hakkında bilgi vermesidir.
- Ayrıca bir sürfaktan olan OCA, belirli konsantrasyonlarda suyun yüzey gerilimini düşürmelidir. Bunu doğrulamak için 140, 120, 100, 80, 60, 20 ve 0 µM konsantrasyonlarında OCA çözeltileri hazırlanmış ve Yüzey Gerilimi Cihazı (Attensiyon) ile Wilhelmy Tablası ve Du Nouy Halkası yöntemleri kullanılarak çözeltilerin yüzey gerilimleri ölçülmüştür.

3.7. Nanopartiküllerin Hazırlanması

Protein yapılı maddelerin enkapsülasyonu için sıkça kullanılan metotlar araştırılmıştır. Bu metotlardan, en verimli ve protein yapılı ilaç enkapsülasyonuna en uygun yöntemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Nanopartikül hazırlama prosesleri, gerçekleştirilen önstabilite deneylerinin ışığında, antikor etkinliğine zarar vermeyecek şekilde modifiye edilmeye çalışılmıştır. Araştırılan 4 metot içerisinde, antikor stabilitesini koruyan metotlarda partikül büyüklüğünü azaltmaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

BVZ Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküller, Csaba ve arkadaşlarının kullandığı metot modifiye edilerek hazırlanmıştır (93). 62,5 mg polimer (PLGA - PEG (PEG Mn 5.000, PLGA Mn 10.000): PLGA (asit uçlu, Mw 7.000-17.000), 50:50), 62,5 mg Pluronik F-68 ve 0,416 mg OCA tartılmış ve 10 ml diklorometan (DCM) içerisinde çözülmüştür. Daha sonra bu organik karışıma, 50 uL 25 mg/ml BVZ çözeltisi eklenmiştir. Karışım 30 saniye vorktekslenmiştir. Karıştırıcı üzerinde bulunan 125 ml etanol üzerinde organik karışım eklenmiştir. Eklemekten sonra 10 dk daha karışmasına izin verilmiş, nanopartikül oluşumu gözlendikten sonra, süspansiyon üzerine 125 ml saf su eklenmiştir. Karışım 10 dk daha oda sıcaklığında uçurulduktan sonra 60 PSI'da rotavaporda 40 °C'de organik solvanlar uçurulmuştur. Ortamda nanopartiküller içerisine yüklenmeyen BVZ'nin uzaklaşması ancak ilaç yüklenmiş nanopartiküllerin filtre içerisinde kalması için, elde edilen son ürün Vivaspin (300 kDa) filtreli tüpler ile 6.000 rpm, 10 dk santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi 3 kere tekrar edilmiş ve kriyoprotektan eklenmiş olan nanopartiküller liyofilize edilerek saklanmıştır. Boş nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında 50 µl 25 mg/ml BVZ çözeltisi yerine 50 ml ultrasaf su kullanılmıştır.

Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Yüzeydeki Oleil Sisteinamid'in Doğrulanması

Yukarıdaki nanopartikül hazırlama metoduna göre, OCA içeren ve içermeyen nanopartiküller hazırlanmış ve yüzeydeki OCA aktivitesi yani sülfidril gruplarının tayin edilmesi için Ellman's Analizi kullanılmıştır.

Ellman's Analizi

- Reaksiyon tamponu; pH 8 0,1 M sodyum fosfat tamponu 1 mM Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Ellman reaktif çözeltisi ise 4 mg Ellman's reaktifi tartılması ve 1 ml reaksiyon tamponu içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.
- Sülfidril grupları ölçülecek numunelerin sayısına göre hazırlanacak reaksiyon tamponu ve ellman's tamponu miktarı hesaplanmıştır. Bu deney için; ölçüm yapılacak numuneler: OCA içeren nanopartiküller (OCANP) ve OCA içermeyen nanopartiküller (NP) olarak belirlenmiştir.
- Sistein HCl monohidrat (M.W. = 175,6), 1,5, 1,25, 1,0, 0,75, 0,5, 0,25 ve 0,0 (kör) mM konsantrasyonlarda olacak şekilde reaksiyon tamponu ile seyreltilmiş ve standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan test tüplerine 50 µl Ellman's reaktif çözeltisi ve 2,5 ml reaksiyon tamponu konmuştur. Test tüplerine her bir standart ya da numunedan 250 µl eklenmiştir.
- Kontrol falkonuna da 250 µl reaksiyon tamponu konmuştur.
- Bu falkonlar karıştırılmış, 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve UV visible spektrometresi ile 412 nm'de absorbansları okunmuştur.

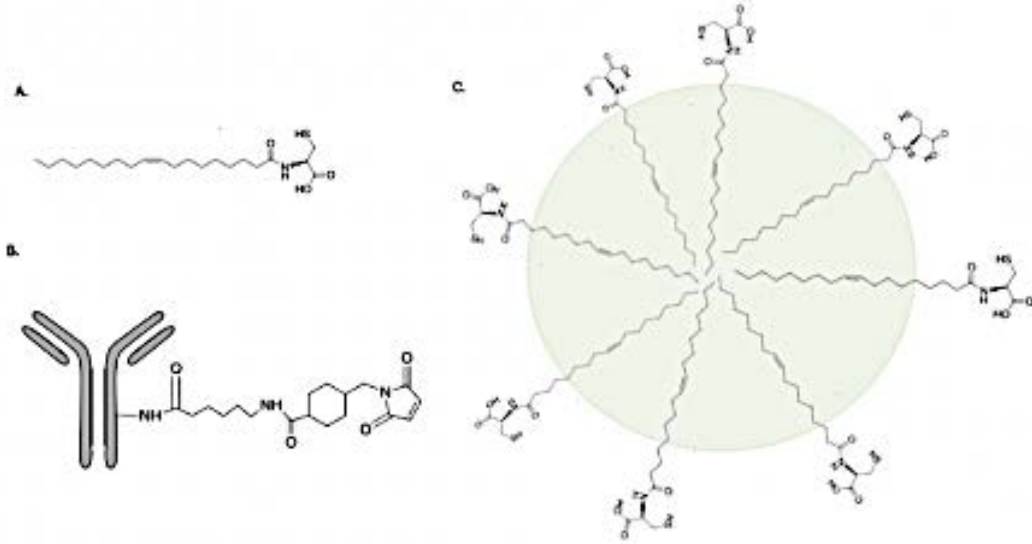
Dinamik Işık Saçılımı yöntemi

Nanopartiküller, OCA içerecek ve içermeyecek şekilde hazırlanmış ve partikül büyüklükleri ile zeta potansiyelleri ölçülerek karşılaştırılmıştır.

Nanopartiküllerin Aktif Hedeflendirilmesi: Anti-CD71 Konjuge

Nanopartiküllerin Hazırlanması

Hazırlanan nanopartiküllere, antikorların konjuge edilebilmesi için, antikorların maleimid aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Aktifleşen antikorların nanopartiküle bağlanması şematik olarak Şekil 3.5 ile gösterilmiştir.



Şekil 3.5. A) Oleil Sisteinamid, B) Maleimid ile aktifleştirilmiş mAb, C) Yüzeyine Oleil Sisteinamid molekülleri yerleşmiş olan PLGA Nanopartikülü (94).

PLGA:PEG polimerleri ve OCA, nanopartiküllerin hazırlanma aşamasında, polimerlerin çözüldüğü organik faza (DCM) eklenmiş ve çözündürülmüştür. Daha önce ifade edilen şekilde nanopartiküller hazırlanmış ve liyofilize edilmiştir.

- Konjuge edilecek olan her bir antikor (Anti-CD71 ve κ Isotype Kontrol Antikor), bir manyetik karıştırıcı üzerinde, +4 °C pH 7,4'teki PBS'e karşı diyaliz edilerek formülasyonlarındaki tuzlar ve koruyucular uzaklaştırılmıştır.
- 1 mg nanopartikül için 0,1 mg mAb konjugasyonu hedeflenmiştir. 0,5 mg LC-SMCC 1 ml mAb çözeltisinde çözülmüştür. Bu çözelti, +4 °C'de 2 saat boyunca karışmaya bırakılmıştır, böylece mAb'ın maleimid aktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

- Bu sürenin sonunda çözeltideki fazla LC-SMCC'den kurtulmak için, pH 7'deki PBS tamponuna karşı 30 kDa vivaspin ile santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. (10 dk 6.000 rpm)
- NP süspansiyonunun pH'ı 6,8'e ayarlanmış ve 0,1 mg maleimid aktive mAb ile, 1 mg NP gece boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
- Gece boyu karışan karışım, 300 kDa vivaspin ile santrifüj edilmiştir (10 dk 6.000 rpm).
- Bu aşamada aynı zamanda OCA ile aktive edilmemiş NP ile maleimid aktive edilmemiş antikor da gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş, bu iki deney sonucunda elde edilen ürünler santrifüj edilerek süpernatantlardaki antikor miktarı Bicinchoninic asit (BCA) Analiz kiti ile ölçülerek karşılaştırılmıştır.

BCA Protein Analizi Kiti ile konjugasyonun doğrulanması

Anti-CD71 ve kontrol antikorların nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olmadığının, konjuge edildiğinin gösterilmesi için BCA analizi gerçekleştirilmiştir. Aktive edilmiş ve aktive edilmemiş antikorlar ile nanopartiküller inkübe edilmiş ve 24 saat sonrasında santrifüj edilerek süpernatantlardaki antikor miktarları ölçülmüştür.

BCA Analizi Kit Kalibrasyonu: 1.000, 500, 250, 125, 50, 25, 5 ve 2,5 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan Albumin Standart çözeltileri ile 562 nm'de ELISA okuyucu kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

BCA analizi prosedürü:

- Her bir standart ya da bilinmeyen örnekten, 96 kuyucuklu plak içerisinde n=6 olacak şekilde 25 uL eklenmiştir.
- Her bir kuyucuğa 200 uL çalışma reaktifi (working reagent (WR)) eklenmiş ve plak 30 saniye nazikçe sallanmıştır.
- Plak 37 °C derecede, üzeri kapatılmış olarak 30 dakika inkübe edilmiş ve yeniden oda sıcaklığına getirilerek 562 nm'de plak okuyucu ile absorbanları okunmuştur.

3.8. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.8.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri, Zetasizer Nanoseries-ZS cihazında yapılmıştır. Bu cihaz; foton koralasyon spektroskopisi ve lazer doppler anemometri esasına göre partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçmektedir. Her formülasyon için art arda üç ölçüm yapılmış ve ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25 °C, ışık saçılım açısı 173 °C olacak şekilde ayarlanmıştır.

Partikül büyüklüğü ölçümleri sonuçları, yoğunluk (intensity) bazlı büyüklüğe göre ortalama partikül büyüklüğü olarak ifade edilmiştir. DLS yönteminde, hidrodinamik çap (Z-ortalama), Stokes-Einstein eşitliğine göre belirlenmiştir (Denklem 1). Zeta potansiyel değerleri ise, Smoluchowski eşitliğine (Denklem 2.) dayanan, elektroforetik hareketliliğinin (μ)s ölçülmesi ile elde edilmiştir.

$$Dh = \frac{KT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Denklem 1})$$

Eşitlikte Dh; hidrodinamik çapı, K; Boltzman sabitini, T; sıcaklığı, η ; vizkositeyi ve D; difüzyon katsayısı olarak gösterilmiştir.

$$\zeta = \frac{\mu\eta}{\epsilon} \quad (\text{Denklem 2})$$

Eşitlikte, ζ ; zeta potansiyel, μ ; elektroforetik hareketlilik, η ; ortamın viskozitesi ve ϵ ; dielektrik sabiti olarak ifade edilmiştir.

3.8.2. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi

Hazırlanan PLGA – OCA nanopartiküller ve antikor konjugasyonu tamamlanmış Anti-CD71 Nanopartiküllerin morfolojilerinin incelenmesi amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.8.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarı, direkt olmayan yöntem ile tayin edilmiştir. Etkin madde yüklenen nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında, 300 kDa por genişliğine sahip filtreli santrifüj tüpleri ile, 10 dk 6.000 rpm'de nanopartiküllerden ayrılan serbest BVZ, alt kompartmandan toplanarak miktar tayini yapılmış ve enkapsülasyon etkinliği (EE) aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır.

$$\% EE = [(Eklene ilaç miktarı - serbest ilaç miktarı) / Eklene ilaç miktarı] * 100$$

3.8.4. In Vitro Salım Deneylei

BVZ yüklü nanopartiküllerin in vitro ortamdaki salım profilinin incelenebilmesi için, salım deneylei gerçekleştirilmiştir. Boş ve etkin madde yüklü nanopartiküllerde salım deneylei, 37 °C'de ve yatay çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı olarak pH 6, pH 7,4 ve pH 10'da PBS kullanılmış, her bir ortamada sink koşulu sağlayacak şekilde, eşit miktarda nanopartikül redisperse edilmiştir. 0, 2, 8, 12, 24 ve 48.saat örnekleri alınmış belirtilen tayin yöntemiyle miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

3.8.5. Stabilite alışmaları

İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Fiziksel Stabilite alışmaları

BVZ yüklü Anti-CD71 antikoru ile hedeflendirilmiş nanopartiküllerin zamana bağlı kısa süreli fiziksel stabilite çalışması için, hazırlanan nanopartikül formülasyonları sulu dispersiyon olarak saklanmış ve belirli zaman aralıklarında (0., 1., 7., 14. ve 30. günlerde) örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri ilgili başlık altında açıklandığı şekilde tayin edilmiştir. Kısa süreli stabilite çalışmaları süresince örnekler +4°C'de ve ışıktan etkilenmeyecek şekilde saklanmıştır.

Hücre kültürü ortamında stabilite çalışmaları

Hazırlanan nanopartiküllerin hücre kültürü çalışmaları sırasında stabilitelerini koruduğunun gösterilmesi amacıyla, hücre kültürü besiyeri ortamında bekletilen nanopartiküllerin 24 saat boyunca belirli aralıklarla DLS yöntemi ile partikül büyüklükleri ölçülmüştür.

3.9. İn Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

3.9.1. Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin Hücreler Üzerine Sitotoksitelerinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin sitotoksite çalışmaları MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) uygulanarak incelenmiştir. bEnd.3, hCMEC/D3 ve U87-luc hücreleri boş ve ilaç yüklü nanopartiküller ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 25 µL 5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisi eklenmiştir. 96 kuyucuklu plaklar inkübatörde 37 °C'de (%5 CO₂) 4 saat süreyle bekletildikten 80 µL SDS-DMF (45:55 dimetilformamid:su içinde çözünmüş 200 g sodyum dodesil sülfat) çözeltisi eklenerek gece boyu bekletildikten sonra plakalar mikroparka okuyucularda 570 nm'de absorbanların okunması için analiz edilmiştir. Hücre canlılığı elde edilen absorban değerleri ile doğru orantılı olacak şekilde yorumlanmıştır. Hücre kültürü ortamının ilave edildiği kuyucuklar, kontrol grubu olarak belirlenmiş olup, bu grubun hücre canlılığı % 100 olarak değerlendirilmiştir. Kültür ortamındaki her bir grup için besiyeri ve partiküllerden gelebilecek otofloresan değeri çıkarılmıştır.

3.9.2. Nanopartiküllerin Hücre İçerisine Alım Çalışmaları

bEnd.3 hücreleri ile gerçekleştirilen hücre içine alım çalışmaları için, hücreler tripsinize edilerek kaldırıldıktan sonra kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre plaklarına ekilip, 24 saat süresince 37°C'de 5% CO₂ varlığında inkübatörde bekletilmiştir. Bu süre sonunda hücreler üzerindeki ortam alınarak PBS

içerisinde dağıtılmış olan Anti-CD71 NP ve Kontrol NP grupları üzerine uygulanarak farklı süreler sonunda hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılıp tripsine edilerek hücreler santrifüjlenerek toplanmış ve akım sitometri ile floresan olarak işaretli hücre yüzdesi ve bu hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) ölçülmüştür.

hCMEC/D3 hücreleri ile gerçekleştirilen hücre içine alım çalışmaları için, hücreler kuyucuk başına 120.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre plakalarına ekilip, 24 saat süresince 37°C'de 5% CO₂ varlığında inkübatörde bekletilmiştir. Bu süre sonunda hücreler üzerindeki ortam alınarak PBS içerisinde dağıtılmış olan Anti-CD71 NP ve Kontrol NP grupları hücreler üzerine uygulanarak farklı süreler sonunda hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılıp tripsine edilerek hücreler santrifüjlenerek toplanmış ve akım sitometri ile floresan olarak işaretli hücre yüzdesi ve bu hücrelerin MFI'si ölçülmüştür. Bu çalışmalarda kullanılan tüm nanopartiküller Nil kırmızısı yüklü nanopartiküller kullanılarak hazırlanmıştır. Nil kırmızısı, nanopartikül hazırlama basamağında, sulu faza eklenmiştir.

Floresans mikroskopu çalışmalarında hücreler 12 kuyucuklu hücre plakalarına ekilip 24 saat süresince 37°C'de 5% CO₂ varlığında inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra hücreler üzerindeki ortam alınarak PBS içerisinde dağıtılmış Florosein İzosiyanat (FITC) yüklü Anti-CD71 NP ve FITC yüklü Kontrol NP grupları hücreler üzerine uygulanarak 2 saat süreyle bekletilmiştir. 2 saat sonunda formülasyonlar kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve hücreler 3 defa PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuk için ayrı ayrı floresans mikroskopundaki görüntüleri alınmıştır.

3.9.3. Antikor-Reseptör Bağlanma Testleri

bEnd.3 Hücrelerine Anti-CD71 Antikoru Bağlanma Testi:

Geliştirilen taşıyıcı sistemlerin değerlendirilmesi amacıyla in vivo fare deneylerine geçmeden önce fare beyin hücre hatlarıyla nanopartiküllerin etkileşimlerini görmek hedeflenmiştir. Bu nedenle bEnd.3 hücreleri üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü ortamı olarak DMEM (FBS, %10) ve

penisilin G (50 U/ml) kullanılmıştır. Hücrelerin 75 cm²'lik flasklar içinde % 5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörün içine alınarak çoğalmaları sağlanmıştır.

Nanopartiküllere konjuge edilen Anti-CD71 antikorunun çalışılan hücre hattı olan bEnd.3 hücrelerine olan afinitesinin incelenmesi ve reseptör aracılı endositozun gösterilmesi amacıyla, hedefleyici ve kontrol antikorların sekonder antikor ile işaretlenmesi sağlanarak flow sitometri cihazında analiz edilmiştir.

- CD71 mouse antikor
- Rat IgG2a, κ Isotip kontrol antikor
- Maleimid aktivasyonu yapılmış CD71 mouse antikor ile konjuge edilmiş PLGA nanopartiküller (Anti-CD71 NP)
- Maleimid aktivasyonu yapılmış Rat IgG2a, κ Isotip kontrol antikor ile konjuge edilmiş PLGA nanopartiküller (Kontrol NP)

Antikorlar primer antikor olarak kullanılmıştır (25 µg/ml test başına). 25 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 5 dakika 1.800 rpm de PBS ile yıkanmışlardır. Çalışmada kullanılan hedefleyici ve kontrol antikorlar sıçanda (rat) üretildiği için sekonder antikor olarak Phycoerythrin (PE) konjuge anti-rat antikor seçilmiştir. 25 dakika sekonder antikorla oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyon yapıldıktan sonra 5 dakika 1.800 rpm de PBS ile yıkanmıştır. FACS Aria II cihazında sonuçlar alınmıştır. FACS Diva programında analizleri yapılmıştır.

CMEC ve U87 Hücrelerine Anti-CD71 Antikoru Bağlanma Testi:

Nanopartiküllere konjuge edilen CD71 antikorunun çalışılan hücre hattı olan CMEC ve U87 hücrelerine olan afinitesinin incelenmesi ve reseptör aracılı endositozun gösterilmesi amacıyla, hedefleyici ve kontrol antikorların sekonder antikor ile işaretlenmesi sağlanarak flow sitometri cihazında analiz edilmiştir.

- CD71 human antikor
- Mouse IgG2a, κ Isotip kontrol antikor
- Maleimid aktivasyonu yapılmış CD71 mouse antikor ile konjuge edilmiş PLGA nanopartiküller (Anti-CD71 NP)

- Maleimid aktivasyonu yapılmış Rat IgG2a, κ Isotip kontrol antikoru ile konjuge edilmiş PLGA nanopartiküller (Kontrol NP)

Antikorlar primer antikor olarak kullanılmıştır (25 $\mu\text{g/ml}$ test başına). 25 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 5 dakika 1.800 rpm de PBS ile yıkanmışlardır. Çalışmada kullanılan hedefleyici ve kontrol antikorlar farede (mouse) üretildiği için sekonder antikor olarak APC boyası (Biolegend) ile konjuge anti-mouse antikoru seçilmiştir. 25 dakika sekonder antikorla oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyon yapıldıktan sonra 5 dakika 1.800 rpm de PBS ile yıkanmıştır. FACS Aria II cihazında sonuçlar alınmıştır. FACS Diva programında analizleri yapılmıştır.

3.9.4. Oluşturulan İn Vitro Kan Beyin Engeli Modelinden Nanopartiküllerin Transitozunun Değerlendirilmesi

Transitoz Çalışmaları

bEnd.3 hücreleri, 37°C, 5% CO₂ koşullarında penisilin içeren DMEM+10% FBS besiyeri içerisinde büyütülmüş ve 24 mm polyester-kaplı transwell (Corning) içerisine 344.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. bEnd.3 hücrelerinin besiyeri, her 2-3 günde bir değiştirilmiştir. İnsertlerin içerisindeki bEnd.3 hücrelerinin bütünlüğü, her seferinde insert kısmının 4 tarafından TEER ölçümleri yapılarak ve ortalama değer alınarak takip edilmiştir. Literatürde bEnd.3 hücreleri ile gerçekleştirilen monokültür çalışmalarında ortalama TEER değerinin 100-140 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ olduğu görülmüştür (95, 96). 10 gün süren ölçümler sonrasında, TEER değeri 100-140 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ değerlerine ulaşmış, üst üste günlerdeki ölçümlerde aynı değeri verdiği, transwellin apikal bölgesinden, her biri 8,3 μg BVZ içeren nanopartikül grupları (BVZ yüklü Anti-CD71 NP ve BVZ yüklü Kontrol NP grupları), 1,5 ml besiyerinde disperse edilerek uygulanmıştır. Bazolateral kısımdan alınan örnekler Elisa metodu ile analiz edilerek transitozun değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

hCMEC/D3 hücreleri, 37°C, 5% CO₂ koşullarında Endogro Complete Medium besiyeri içerisinde ve 24 mm polyester-kaplı transwell (Corning) içerisine 30.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. hCMEC/D3 hücrelerinin besiyeri, her 2-3 günde bir değiştirilmiştir. İnsertlerin içerisindeki hücrelerinin bütünlüğü, her

seferinde insert kısmının 4 tarafından TEER ölçümleri yapılarak ve ortalama değer alınarak takip edilmiştir. Literatürde hCMEC/D3 hücreleri ile gerçekleştirilen monokültür çalışmalarında ortalama TEER değerinin 30-50 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ olduğu görülmüştür. 10 gün süren ölçümler sonrasında, TEER değeri 30-50 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ değerlerine ulaşmış, üst üste günlerdeki ölçümlerde aynı değeri verdiği, her biri 8,3 μg BVZ içeren nanopartikül grupları (BVZ yüklü Anti-CD71 NP ve BVZ yüklü Kontrol NP grupları), 1,5 ml besiyerinde disperse edilerek, apikal kısımdan uygulanmıştır. 24 saatin sonunda transwell'in basolateral kısmından alınan örnekler, ve BVZ için de ELISA metodu ile kantitatif olarak ölçülmüştür.

3.10. İn vivo Çalışmalar

İN vivo deneyler Kobay DHL A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 24.05.2016 onay tarihli 180 onay numaralı etik kurul iznine istinaden gerçekleştirilmiştir (EK-1). Hayvanların 25°C sabit sıcaklık, %50 nem, steril talaş, su ve filtreli hava verilen koşullarda bakımı sağlanmış, 3R ilkesine ve etik kurallara uygun şekilde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemin KBB'yi in vivo ortamda geçtiğinin gösterilmesi amacıyla 9 adet ,erkek, 6-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 20-25 g olan CD1 fareler ile çalışılmıştır. İn vivo GBM modelinin oluşturulması için ise 10 adet, erkek, 6-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 20-25 g olan nude fareler ile çalışılmıştır. İn vivo GBM modelinde ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğinin gösterilmesi çalışmasında da 9 adet, erkek, 6-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 20-25 g olan nude fareler ile çalışılmıştır.

3.10.1. Nanopartiküllerin in vivo Kan Beyin Bariyerini Geçişinin Gösterilmesi

İN vivo testlerle formülasyonun kan beyin engelini geçişinin gösterilmesi

Newton Vilber in vivo görüntüleme cihazında Newton fx 7 Edge programı kullanılarak, 580 nm dalgaboyunda yapılan görüntüleme çalışmasında, BVZ yüklü olmayan ancak bu cihazda görüldüğü bilinen bir boya olan nil kırmızısı yüklü nanopartiküller kullanılmıştır. Anti-CD71 NP ve Kontrol Nanopartiküllere nil kırmızısı

yüklenmiş, bu partiküller öncelikle cihazda, ependorf içerisinde iken görünür oldukları doğrulanmış ve sonrasında uyuşturulmuş (ketamin/ksilazin ile) CD1 farelere 150'şer µl kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Kuyruk veninin görünür hale gelmesi için farelerin kuyrukları 37 °C su içerisinde bekletilmiştir. 16 saat sonunda fareler etik kurul kurallarına uygun sakrifiye edilerek, perfüzyon sonrası direkt olarak optik koherens tomografisine alınarak, -80 °C'de saklanmıştır. Daha sonra fare beyinlerinden 5 mikron kalınlığında kesitler alındıktan sonra DAPI ile boyanmış görüntüleri alınıp düzenlenmiştir. (n=3)

3.10.2. In vivo Glioblastoma Multiforme Modelinin Geliştirilmesi

10 adet nude fare cerrahi işlem öncesinde, % 4 izofloran inhalasyonu ile uyutulmuştur. Daha sonra fareler stereotaksik frame'e yerleştirilmiş ve anestezinin idamesi için cerrahi işlem süresince izofloran dozu %1-2 arasında tutulmuştur. Homeotermik battaniyeye bağlı olan rektal ısı probu sayesinde işlem boyunca, farelerin vücut sıcaklıkları 37 °C'de tutulmuştur. Tümör hücrelerinin enjeksiyonu intrakranial olarak gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon öncesinde bregmadan 1 mm anterior, 2 mm lateralde drill ile burnholl açılmış ve lusiferazlı U87 hücrelerinin enjeksiyonu otomatize enjeksiyon pompası ile 10 dakikada 2 ul (2×10^5 hücre/µl) olacak şekilde 2,2 mm derinliğe yapılmıştır (n=3). Deney ayrıntıları aşağıda yer almaktadır:

| | |
|------------------------------|-----------------|
| Anestezi ve Oksijen makinesi | AMS-Minor 612 |
| Stereotaksi | WPI |
| Elektrikli battaniye | Kent Scientific |
| Stereomikroskop | Nikon SMZ 745T |
| Otomatize enjeksiyon pompası | WPI |

Histolojik Değerlendirme

Tümör gelişimleri in vivo görüntüleme cihazı ve haftalık olarak iv lusiferin uygulaması ile takip edilen fareler, etik ilkeler dahilinde sağlık durumlarının bozulmaya başlamasına kadar takip edilmiştir. Sağlık durumlarının bozulması ve beyin

tümörü sinyallerinin artması durumunda fareler etik ilkelere uygun şekilde sakrifiye edilmişlerdir ve beyinleri çıkarılarak % 10 formol çözeltisi içerisinde alınmışlardır. Formol çözeltisi içerisindeki beyinler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'na transfer edilmiş ve ortak çalışma gerçekleştirilmiştir. Organlardan elde edilen doku örneklerine ait tümör odaklarının ve invazyonun değerlendirilmesinde Prof. Dr. Ayşe Figen Söylemezoğlu tarafından çalışmamıza bilimsel katkı sağlanmıştır. Daha sonra beyinlerden 2 mm'lik kesitler alınmış ve parafin içerisinde bekletilmiştir. 6µm kalınlığında kısımlara ayrılan dokular hematoksilin ve eozin ile boyanmış ve 5x, 20x, 40x ya da 100x büyütme ile ışık mikroskopunda incelenmiştir.

3.10.3. İn vivo Glioma Modeli Geliştirilmiş Farelerde İlaç Taşıyıcı Sistemin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

GBM modeli geliştirilmiş 9 adet nude farede, hücre ekiminden 5 gün sonra tedaviye başlanmıştır. Hayvanlar 3 gruba ayrılmıştır:

* 5 mg/kg Avastin (BVZ çözeltisi) (n=3)

*5 mg/kg BVZ içeren Anti-CD71 antikoru ile hedeflendirilmiş nanopartiküller (n=3)

* 5 mg/kg BVZ içeren Kontrol antikoru ile konjuge edilmiş nanopartiküller (n=3)

Fareler ilaç gruplarına göre gruplandırıldıktan sonra, beyne U87-Luc hücrelerinin ekilmesinden 1 hafta sonra iv yol ile ilaç ve kontrol grupları uygulanmaya başlanmıştır. 3 günde 1 defa iv olarak 100'er uL ilaç çözeltisi, BVZ yüklü Anti-CD71 NP ve BVZ yüklü Kontrol Nanopartiküller verilmiştir. 3 günde 1 kere olacak şekilde ilaç gruplarının verilmesi 5 hafta boyunca devam ettirilmiştir. 4 hafta süre ile farelerin tümörleri, haftalık iv lusiferin uygulaması ile in vivo görüntüleme cihazında takip edilmiştir. Fare ölümlerinin başlaması ve davranışsal değişiklikler üzerine, sinyal izlenmesi durdurulmuş ancak ilaç uygulamasına devam edilmiştir. Deney süresince farelerin hayatta kalma ve ağırlık değişimleri takip edilmiştir. Tedavinin etkinliği deney grupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

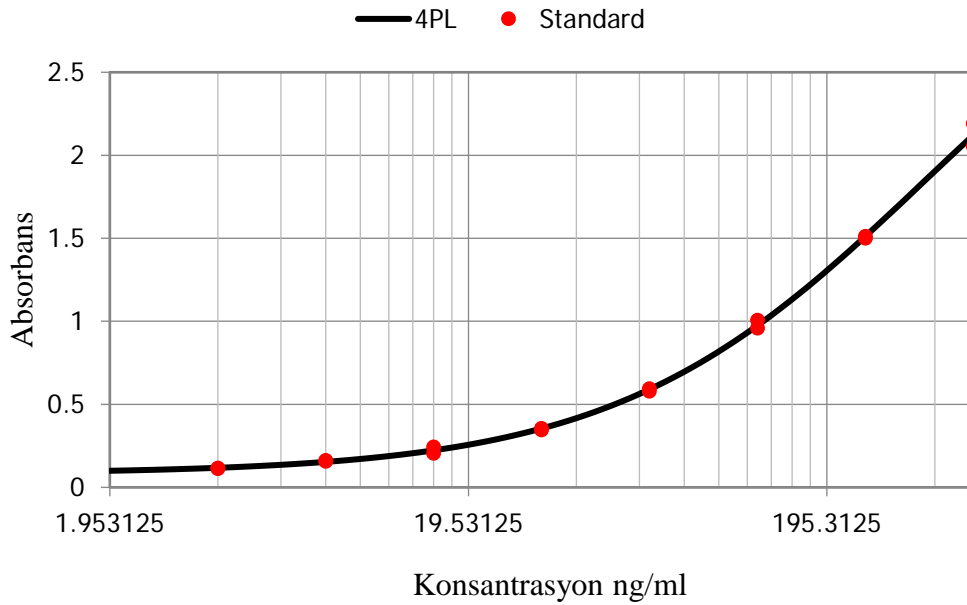
3.11. İstatistiksel Analiz

Aksi belirtilmedikçe tüm deneyler üçer kez tekrarlanmış ve istatistiksel olarak aşağıda tarif edildiği gibi değerlendirilmiştir. \pm ifadesi standart sapmayı yansıtmaktadır. İki grubun karşılaştırılmasında t testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ANOVA'yı takiben Tukey's post hoc testi Minitab®16 programı ile gerçekleştirilmiştir. P değerinin 0,05 den düşük olduğu sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. BVZ için Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

BVZ miktar tayini için valide edilmiş ELISA yöntemi kullanılmıştır. 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,813, 3,906 ve 1,953 ng/ml konsantrasyonlarında hazırlanan standart çözeltiler ile bunların en az 6 tanesini kapsayan bir standart aralığı oluşturulmuş ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Yöntem bölümünde ifade edildiği şekilde gerçekleştirilen çalışmalar sonrasında standart çözeltiler için elde edilen absorbans değerleri, myassays.com internet sitesinin sağlamış olduğu, 4 parametrelili lojistik eğri matematiksel hesabı ile eğri haline getirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bevasizumab ELISA kalibrasyon eğrisi

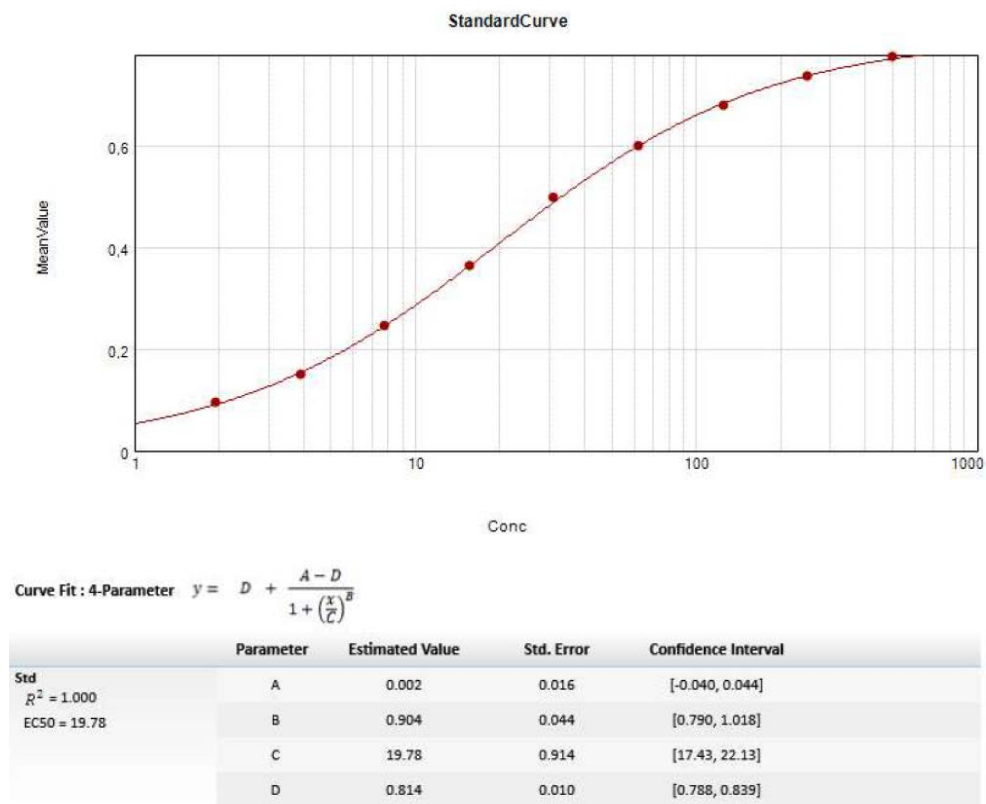
Elde edilen eğrinin R^2 değeri 0,998 olarak bulunmuş ve eğri denklemi aşağıda verilmiştir:

$$y = \frac{(0,08205 - 3,605)}{(1 + (x/364,9)^{1,009})} + 3,605$$

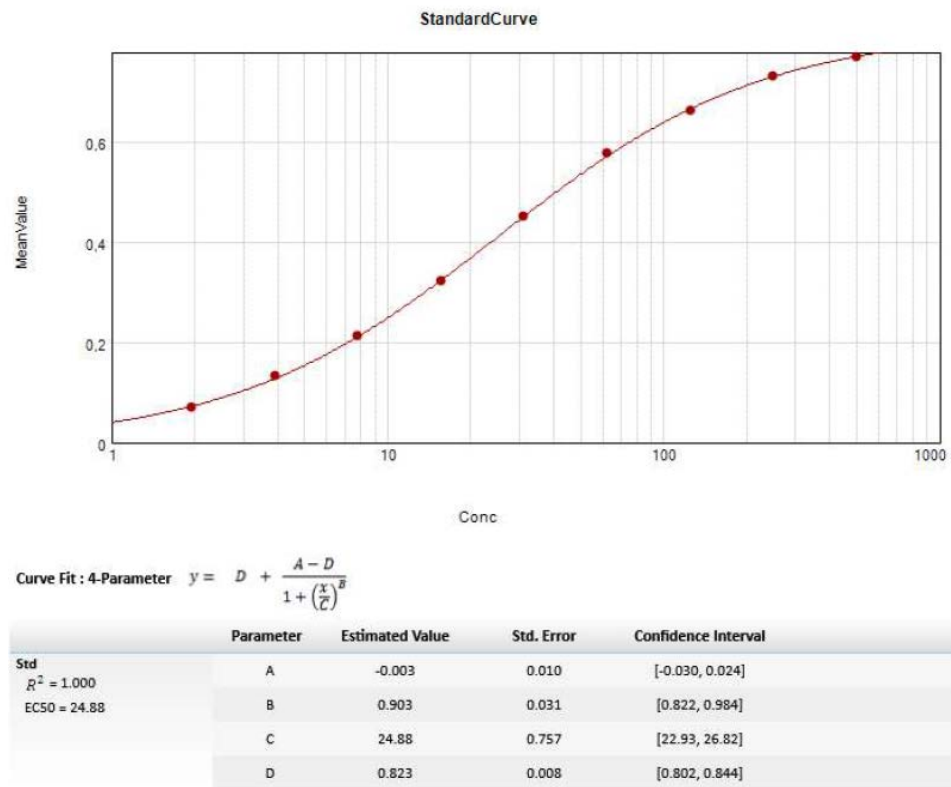
ELISA Yöntem Validasyonu

Doğrusallık

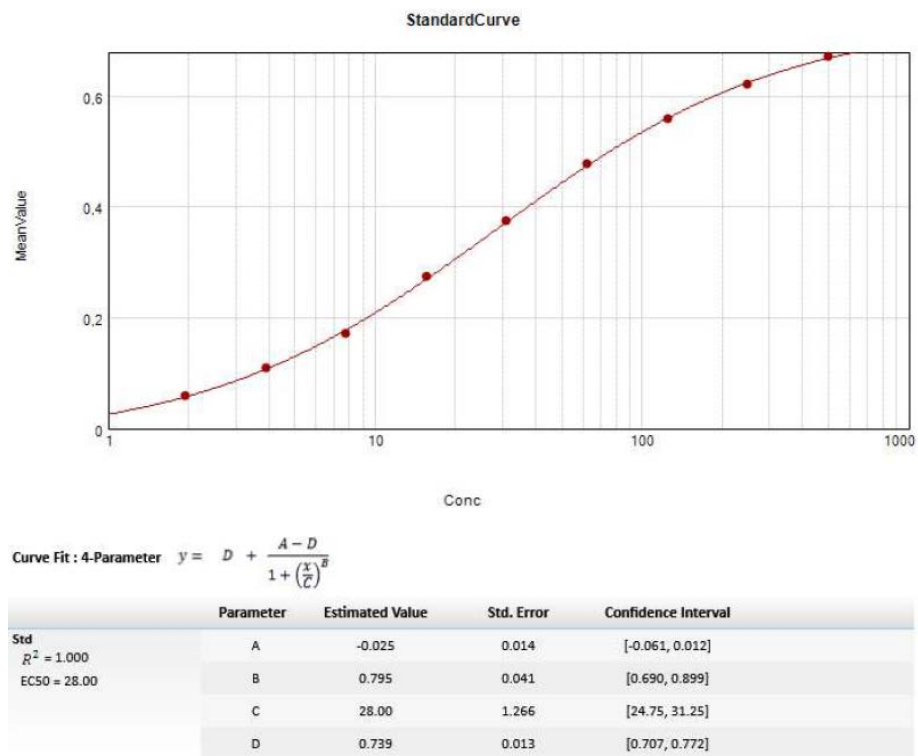
Konsantrasyon-cevap ilişkisinin, 1,95 ng/ml-500 ng/ml aralığında 4 parametrelili standart eğriye uygun olduğu üç ayrı günde yapılan ölçümlerle gösterilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4). Regresyon katsayısının (R^2) 1'e yakın olması standart eğrinin uygun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.2. Bevasizumab ELISA Doğruluk çalışması, 1. Gün verileri



Şekil 4.3. Bevasizumab ELISA Doğruluk çalışması, 2. Gün verileri



Şekil 4.4. Bevasizumab ELISA Doğruluk çalışması, 3. Gün verileri

Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında, optik dansiteler arasındaki %CV'nin, geri hesaplanan konsantrasyonlar arasındaki %CV'ye göre daha büyük olduğu belirlenmiştir. Bu durumda, her deneyde hazırlanan standartlar ve kullanılan malzemeler arasındaki değişimlerin, standart eğriye göre hesaplanan konsantrasyonlara yansımadağı sonucuna varılmıştır. 1,95 ng/ml – 500 ng/ml arasındaki konsantrasyonlar ile gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasında, 5 günlük ölçümlerde kuyucuklar arası yüksek varyasyona rastlanmıştır (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9). Buna göre, ölçümü yapılacak her örnek için, aynı deneyde bir standart eğri hazırlanmalıdır.

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Optik Densite/Optical Density | | | | SD | CV % |
|--|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|-------|
| | Kuyucuk 1 Well 1 | Kuyucuk 2 Well 2 | Kuyucuk 3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 0,67 | 0,642 | 0,646 | 0,65 | 0,02 | 2,32 |
| 250 | 0,599 | 0,628 | 0,599 | 0,61 | 0,02 | 2,75 |
| 125 | 0,532 | 0,518 | 0,512 | 0,52 | 0,01 | 1,97 |
| 62,5 | 0,45 | 0,424 | 0,41 | 0,43 | 0,02 | 4,74 |
| 31,25 | 0,314 | 0,308 | 0,313 | 0,31 | 0,00 | 1,03 |
| 15,7 | 0,201 | 0,204 | 0,202 | 0,20 | 0,00 | 0,75 |
| 7,8 | 0,114 | 0,122 | 0,132 | 0,12 | 0,01 | 7,35 |
| 3,9 | 0,063 | 0,068 | 0,078 | 0,07 | 0,01 | 10,96 |
| 1,95 | 0,039 | 0,037 | 0,04 | 0,04 | 0,00 | 3,95 |

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Geri-hesaplanan konsantrasyon Back calculated concentration (ng/ml) | | | | SD | CV % |
|--|--|---------------------|---------------------|---------------------|--------|-------|
| | Kuyucuk 1 Well 1 | Kuyucuk 2 Well 2 | Kuyucuk 3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 700 | 412 | 438 | 516,67 | 159,30 | 30,83 |
| 250 | 236 | 333 | 235 | 268,00 | 56,29 | 21,01 |
| 125 | 129 | 116 | 111 | 118,67 | 9,29 | 7,83 |
| 62,5 | 73,36 | 62,14 | 57,18 | 64,23 | 8,29 | 12,91 |
| 31,25 | 32,03 | 31 | 31,86 | 31,63 | 0,55 | 1,75 |
| 15,7 | 15,25 | 15,65 | 15,44 | 15,45 | 0,20 | 1,30 |
| 7,8 | 7,04 | 7,7 | 8,5 | 7,75 | 0,73 | 9,44 |
| 3,9 | 3,4 | 3,7 | 4,4 | 3,83 | 0,51 | 13,39 |
| 1,95 | 1,98 | 1,92 | 2,06 | 1,99 | 0,07 | 3,54 |

Şekil 4.5. Bevasizumab ELISA Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması, 1. Gün verileri

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Optik Densite/Optical Density | | | | SD | CV % |
|--|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|-------|
| | Kuyucuk 1 Well 1 | Kuyucuk 2 Well 2 | Kuyucuk 3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 0,518 | 0,547 | 0,537 | 0,53 | 0,01 | 2,76 |
| 250 | 0,478 | 0,515 | 0,512 | 0,50 | 0,02 | 4,10 |
| 125 | 0,474 | 0,46 | 0,461 | 0,47 | 0,01 | 1,68 |
| 62,5 | 0,403 | 0,425 | 0,417 | 0,42 | 0,01 | 2,68 |
| 31,25 | 0,342 | 0,351 | 0,348 | 0,35 | 0,00 | 1,32 |
| 15,7 | 0,269 | 0,269 | 0,262 | 0,27 | 0,00 | 1,52 |
| 7,8 | 0,178 | 0,2 | 0,213 | 0,20 | 0,02 | 8,98 |
| 3,9 | 0,154 | 0,168 | 0,189 | 0,17 | 0,02 | 10,34 |
| 1,95 | 0,066 | 0,095 | 0,067 | 0,08 | 0,02 | 21,66 |

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Geri-hesaplanan konsantrasyon Back calculated concentration (ng/ml) | | | | SD | CV % |
|--|--|---------------------|---------------------|---------------------|--------|-------|
| | Kuyucuk 1 Well 1 | Kuyucuk 2 Well 2 | Kuyucuk 3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 333 | 681 | 518 | 510,67 | 174,12 | 34,10 |
| 250 | 160 | 309 | 293 | 254,00 | 81,80 | 32,20 |
| 125 | 149 | 121 | 123 | 131,00 | 15,62 | 11,92 |
| 62,5 | 58,12 | 76,34 | 69,25 | 67,90 | 9,18 | 13,53 |
| 31,25 | 30,01 | 32,85 | 32,07 | 31,64 | 1,47 | 4,64 |
| 15,7 | 14,37 | 14,45 | 13,48 | 14,10 | 0,54 | 3,82 |
| 7,8 | 5,71 | 7,21 | 8,25 | 7,06 | 1,28 | 18,10 |
| 3,9 | 4,43 | 5,12 | 6,41 | 5,32 | 1,01 | 18,89 |
| 1,95 | 1,41 | 2,14 | 1,41 | 1,65 | 0,42 | 25,49 |

Şekil 4.6. Bevasizumab ELISA Günlere arası tekrarlanabilirlik çalışması, 2. Gün verileri

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Optik Densite/Optical Density | | | | SD | CV % |
|--|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------|------|
| | Kuyucuk1 Well 1 | Kuyucuk2 Well 2 | Kuyucuk3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 0,772 | 0,791 | 0,766 | 0,78 | 0,01 | 1,68 |
| 250 | 0,734 | 0,732 | 0,747 | 0,74 | 0,01 | 1,10 |
| 125 | 0,676 | 0,677 | 0,683 | 0,68 | 0,00 | 0,56 |
| 62,5 | 0,604 | 0,604 | 0,591 | 0,60 | 0,01 | 1,25 |
| 31,25 | 0,508 | 0,492 | 0,496 | 0,50 | 0,01 | 1,67 |
| 15,7 | 0,366 | 0,364 | 0,361 | 0,36 | 0,00 | 0,69 |
| 7,8 | 0,25 | 0,244 | 0,242 | 0,25 | 0,00 | 1,70 |
| 3,9 | 0,149 | 0,151 | 0,148 | 0,15 | 0,00 | 1,02 |
| 1,95 | 0,097 | 0,097 | 0,092 | 0,10 | 0,00 | 3,03 |

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Geri-hesaplanan konsantrasyon Back calculated concentration (ng/ml) | | | | SD | CV % |
|--|--|---------------------|---------------------|---------------------|--------|-------|
| | Kuyucuk 1 Well 1 | Kuyucuk 2 Well 2 | Kuyucuk 3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 502 | 1009 | 421 | 644,00 | 318,68 | 49,48 |
| 250 | 231 | 224 | 286 | 247,00 | 33,96 | 13,75 |
| 125 | 115 | 115 | 123 | 117,67 | 4,62 | 3,93 |
| 62,5 | 63,35 | 63,67 | 57,86 | 61,63 | 3,27 | 5,30 |
| 31,25 | 34,49 | 31,54 | 32,3 | 32,78 | 1,53 | 4,67 |
| 15,7 | 15,71 | 15,53 | 15,28 | 15,51 | 0,22 | 1,39 |
| 7,8 | 7,97 | 7,65 | 7,58 | 7,73 | 0,21 | 2,69 |
| 3,9 | 3,72 | 3,77 | 3,7 | 3,73 | 0,04 | 0,97 |
| 1,95 | 2,099 | 2,107 | 1,972 | 2,06 | 0,08 | 3,68 |

Şekil 4.7. Bevasizumab ELISA Günlere arası tekrarlanabilirlik çalışması, 3. Gün verileri

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Optik Densite/Optical Density | | | | SD | CV % |
|--|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------|------|
| | Kuyucuk1 Well 1 | Kuyucuk2 Well 2 | Kuyucuk3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 0,778 | 0,767 | 0,767 | 0,77 | 0,01 | 0,82 |
| 250 | 0,742 | 0,744 | 0,714 | 0,73 | 0,02 | 2,29 |
| 125 | 0,66 | 0,668 | 0,665 | 0,66 | 0,00 | 0,61 |
| 62,5 | 0,581 | 0,577 | 0,575 | 0,58 | 0,00 | 0,53 |
| 31,25 | 0,461 | 0,444 | 0,447 | 0,45 | 0,01 | 2,01 |
| 15,7 | 0,321 | 0,322 | 0,324 | 0,32 | 0,00 | 0,47 |
| 7,8 | 0,207 | 0,213 | 0,216 | 0,21 | 0,00 | 2,16 |
| 3,9 | 0,145 | 0,128 | 0,128 | 0,13 | 0,01 | 7,34 |
| 1,95 | 0,069 | 0,07 | 0,069 | 0,07 | 0,00 | 0,83 |

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Geri-hesaplanan konsantrasyon Back calculated concentration (ng/ml) | | | | SD | CV % |
|--|--|---------------------|---------------------|---------------------|-------|-------|
| | Kuyucuk 1 Well 1 | Kuyucuk 2 Well 2 | Kuyucuk 3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 581 | 454 | 453 | 496,00 | 73,61 | 14,84 |
| 250 | 287 | 300 | 199 | 262,00 | 54,95 | 20,97 |
| 125 | 117 | 125 | 122 | 121,33 | 4,04 | 3,33 |
| 62,5 | 66,03 | 64,1 | 63,29 | 64,47 | 1,41 | 2,18 |
| 31,25 | 32,75 | 29,77 | 30,32 | 30,95 | 1,59 | 5,12 |
| 15,7 | 15,28 | 15,33 | 15,52 | 15,38 | 0,13 | 0,82 |
| 7,8 | 7,51 | 7,84 | 7,99 | 7,78 | 0,25 | 3,16 |
| 3,9 | 4,6 | 3,9 | 3,88 | 4,13 | 0,41 | 9,94 |
| 1,95 | 1,82 | 1,86 | 1,83 | 1,84 | 0,02 | 1,13 |

Şekil 4.8. Bevasizumab ELISA Günlük arası tekrarlanabilirlik çalışması, 4. Gün verileri

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Optik Densite/Optical Density | | | | SD | CV % |
|--|-------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|------|-------|
| | Kuyucuk1 Well 1 | Kuyucuk 2 Well 2 | Kuyucuk3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 0,676 | 0,676 | 0,655 | 0,67 | 0,01 | 1,81 |
| 250 | 0,616 | 0,622 | 0,625 | 0,62 | 0,00 | 0,74 |
| 125 | 0,556 | 0,561 | 0,562 | 0,56 | 0,00 | 0,57 |
| 62,5 | 0,478 | 0,48 | 0,474 | 0,48 | 0,00 | 0,64 |
| 31,25 | 0,374 | 0,376 | 0,373 | 0,37 | 0,00 | 0,41 |
| 15,7 | 0,268 | 0,271 | 0,284 | 0,27 | 0,01 | 3,10 |
| 7,8 | 0,173 | 0,172 | 0,169 | 0,17 | 0,00 | 1,21 |
| 3,9 | 0,133 | 0,099 | 0,097 | 0,11 | 0,02 | 18,45 |
| 1,95 | 0,056 | 0,056 | 0,063 | 0,06 | 0,00 | 6,93 |

| Konsantrasyon Concentration (ng/ml) | Geri-hesaplanan konsantrasyon Back calculated concentration (ng/ml) | | | | SD | CV % |
|--|--|---------------------|---------------------|---------------------|-------|-------|
| | Kuyucuk 1 Well 1 | Kuyucuk 2 Well 2 | Kuyucuk 3 Well 3 | Ortalama Average | | |
| 500 | 577 | 572 | 464 | 537,67 | 63,85 | 11,87 |
| 250 | 223 | 239 | 249 | 237,00 | 13,11 | 5,53 |
| 125 | 119 | 124 | 125 | 122,67 | 3,21 | 2,62 |
| 62,5 | 63,95 | 64,47 | 61,71 | 63,38 | 1,47 | 2,31 |
| 31,25 | 31,23 | 31,56 | 31,02 | 31,27 | 0,27 | 0,87 |
| 15,7 | 15,41 | 15,69 | 17,21 | 16,10 | 0,97 | 6,01 |
| 7,8 | 7,47 | 7,35 | 7,16 | 7,33 | 0,16 | 2,13 |
| 3,9 | 5,13 | 3,54 | 3,44 | 4,04 | 0,95 | 23,49 |
| 1,95 | 1,9 | 1,89 | 2,12 | 1,97 | 0,13 | 6,60 |

Şekil 4.9. Bevasizumab ELISA Günlük arası tekrarlanabilirlik çalışması, 5. Gün verileri

Deney içi tekrarlanabilirlik

Doğrusal aralıktaki 5 konsantrasyonla aynı plakadaki 6 kuyucukta yapılan ölçümlerde 250 ng/ml-1.95 ng/ml aralığında uygun CV % değerleri yakalanmıştır (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12).

| Konsantrasyon (ng/ml) | Optik Densite | | | | | Ort | SD | CV % |
|--------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|------|------|
| | Kuyucuk 1 | Kuyucuk 2 | Kuyucuk 3 | Kuyucuk 4 | Kuyucuk 5 | | | |
| 500 | 0,811 | 0,791 | 0,795 | 0,785 | 0,798 | 0,80 | 0,01 | 1,22 |
| 250 | 0,757 | 0,738 | 0,747 | 0,752 | 0,755 | 0,75 | 0,01 | 1,01 |
| 31,25 | 0,5 | 0,498 | 0,493 | 0,493 | 0,486 | 0,49 | 0,01 | 1,10 |
| 3,90 | 0,145 | 0,15 | 0,151 | 0,147 | 0,155 | 0,15 | 0,00 | 2,57 |
| 1,95 | 0,086 | 0,084 | 0,089 | 0,082 | 0,087 | 0,09 | 0,00 | 3,16 |

| Konsantrasyon (ng/ml) | Geri-hesaplanan konsantrasyon/ (ng/ml) | | | | | Ort | SD | CV % |
|--------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|--------|
| | Kuyucuk 1 | Kuyucuk 2 | Kuyucuk 3 | Kuyucuk 4 | Kuyucuk 5 | | | |
| 500 | 12129,80 | 989,52 | 1283,44 | 785,83 | 1549,37 | 3347,59 | 4917,94 | 146,91 |
| 250 | 346,21 | 243,75 | 284,56 | 315,47 | 330,21 | 304,04 | 40,65 | 13,37 |
| 31,25 | 32,96 | 32,53 | 31,76 | 31,65 | 30,43 | 31,86 | 0,97 | 3,04 |
| 3,9 | 3,59 | 3,77 | 3,80 | 3,66 | 3,94 | 3,75 | 0,14 | 3,65 |
| 1,95 | 1,80 | 1,75 | 1,89 | 1,71 | 1,82 | 1,79 | 0,07 | 3,77 |

Şekil 4.10. Bevasizumab ELISA Deney içi tekrarlanabilirlik çalışması, 1.deney verileri

| Konsantrasyon (ng/ml) | Optik Densite | | | | | | Ort | SD | CV % |
|--------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|------|------|
| | Kuyucuk 1 | Kuyucuk 2 | Kuyucuk 3 | Kuyucuk 4 | Kuyucuk 5 | Kuyucuk 6 | | | |
| 500 | 0,746 | 0,749 | 0,749 | 0,76 | 0,747 | 0,743 | 0,75 | 0,01 | 0,78 |
| 250 | 0,712 | 0,721 | 0,725 | 0,721 | 0,734 | 0,724 | 0,72 | 0,01 | 0,99 |
| 31,25 | 0,433 | 0,44 | 0,45 | 0,439 | 0,454 | 0,452 | 0,44 | 0,01 | 1,91 |
| 3,90 | 0,127 | 0,13 | 0,133 | 0,13 | 0,134 | 0,137 | 0,13 | 0,00 | 2,69 |
| 1,95 | 0,066 | 0,072 | 0,073 | 0,072 | 0,07 | 0,076 | 0,07 | 0,00 | 4,66 |

| Konsantrasyon (ng/ml) | Geri-hesaplanan konsantrasyon/ (ng/ml) | | | | | | Ort | SD | CV % |
|--------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|-------|-------|
| | Kuyucuk 1 | Kuyucuk 2 | Kuyucuk 3 | Kuyucuk 4 | Kuyucuk 5 | Kuyucuk 6 | | | |
| 500 | 307 | 325 | 320 | 392 | 314 | 295 | 325,50 | 34,23 | 10,52 |
| 250 | 194 | 218 | 227 | 216 | 256 | 225 | 222,67 | 20,12 | 9,03 |
| 31,25 | 28,13 | 29,12 | 30,88 | 29,09 | 31,48 | 31,1 | 29,97 | 1,36 | 4,54 |
| 3,90 | 3,84 | 3,99 | 4,08 | 3,96 | 4,14 | 4,25 | 4,04 | 0,14 | 3,58 |
| 1,95 | 1,72 | 1,93 | 1,95 | 1,91 | 1,87 | 2,06 | 1,91 | 0,11 | 5,85 |

Şekil 4.11. Bevasizumab ELISA Deney içi tekrarlanabilirlik çalışması, 2.deney verileri

| Konsantrasyon (ng/ml) | Optik Densite | | | | | | Ort | SD | CV % |
|--------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|------|------|
| | Kuyucuk 1 | Kuyucuk 2 | Kuyucuk 3 | Kuyucuk 4 | Kuyucuk 5 | Kuyucuk 6 | | | |
| 500 | 0,652 | 0,65 | 0,648 | 0,655 | 0,674 | 0,643 | 0,65 | 0,01 | 1,64 |
| 250 | 0,609 | 0,617 | 0,619 | 0,615 | 0,621 | 0,612 | 0,62 | 0,00 | 0,72 |
| 31,25 | 0,376 | 0,374 | 0,379 | 0,365 | 0,376 | 0,334 | 0,37 | 0,02 | 4,63 |
| 3,90 | 0,094 | 0,095 | 0,095 | 0,096 | 0,095 | 0,091 | 0,09 | 0,00 | 1,86 |
| 1,95 | 0,056 | 0,055 | 0,055 | 0,053 | 0,057 | 0,059 | 0,06 | 0,00 | 3,66 |

| Konsantrasyon (ng/ml) | Geri-hesaplanan konsantrasyon/ (ng/ml) | | | | | | Ort | SD | CV % |
|--------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|-------|-------|
| | Kuyucuk 1 | Kuyucuk 2 | Kuyucuk 3 | Kuyucuk 4 | Kuyucuk 5 | Kuyucuk 6 | | | |
| 500 | 366 | 358 | 344 | 388 | 548 | 319 | 325,50 | 34,23 | 10,52 |
| 250 | 205 | 226 | 230 | 220 | 235 | 212 | 222,67 | 20,12 | 9,03 |
| 31,25 | 31,75 | 31,23 | 32,25 | 29,52 | 31,7 | 24 | 29,97 | 1,36 | 4,54 |
| 3,90 | 3,32 | 3,35 | 3,37 | 3,38 | 3,36 | 3,18 | 4,04 | 0,14 | 3,58 |
| 1,95 | 1,89 | 1,87 | 1,857 | 1,808 | 1,926 | 2 | 1,91 | 0,11 | 5,85 |

Şekil 4.12. Bevasizumab ELISA Deney içi tekrarlanabilirlik çalışması, 3.deney verileri

Doğruluk

1,95 ng/ml-250 ng/ml aralığının, miktar belirlemede doğru sonuç verdiği görülmüştür (Şekil 4.13).

| Konsantrasyon (ng/ml) | Deney 1 | | Deney 2 | | Deney 3 | | Deney 4 | |
|--------------------------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
| | Ort | RE % | Ort | RE % | Ort | RE % | Ort | RE % |
| 500 | 516,67 | 3,33 | 644,00 | 28,80 | 496,00 | -0,80 | 537,67 | 7,53 |
| 250 | 268,00 | 7,20 | 247,00 | -1,20 | 262,00 | 4,80 | 237,00 | -5,20 |
| 125 | 118,67 | -5,07 | 117,67 | -5,87 | 121,33 | -2,93 | 122,67 | -1,87 |
| 62,5 | 64,23 | 2,76 | 61,63 | -1,40 | 64,47 | 3,16 | 63,38 | 1,40 |
| 31,25 | 31,63 | 1,22 | 32,78 | 4,89 | 30,95 | -0,97 | 31,27 | 0,06 |
| 15,7 | 15,45 | -1,61 | 15,51 | -1,23 | 15,38 | -2,06 | 16,10 | 2,57 |
| 7,8 | 7,75 | -0,68 | 7,73 | -0,85 | 7,78 | -0,26 | 7,33 | -6,07 |
| 3,9 | 3,83 | -1,71 | 3,73 | -4,36 | 4,13 | 5,81 | 4,04 | 3,50 |
| 1,95 | 1,99 | 1,88 | 2,06 | 5,61 | 1,84 | -5,81 | 1,97 | 1,03 |

Şekil 4.13. Bevasizumab ELISA Doğruluk çalışması verileri

4.2. BVZ Ön Stabilite Çalışmaları

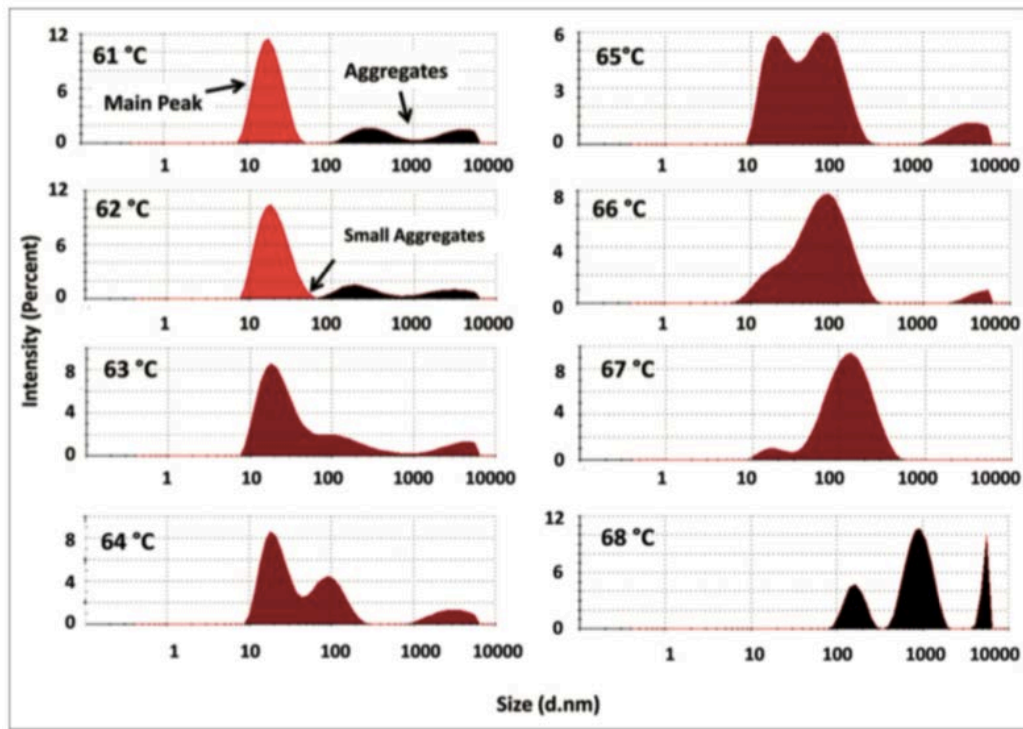
4.2.1. Bevasizumab Üzerinde Sıcaklık Etkisinin Değerlendirilmesi

Sıcaklık etkisi

BVZ'nin sıcaklık etkisi ile agregasyonu DLS yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada, BVZ'nin hidrodinamik çapı değişen sıcaklıklara karşı ölçülmüş ve agreg

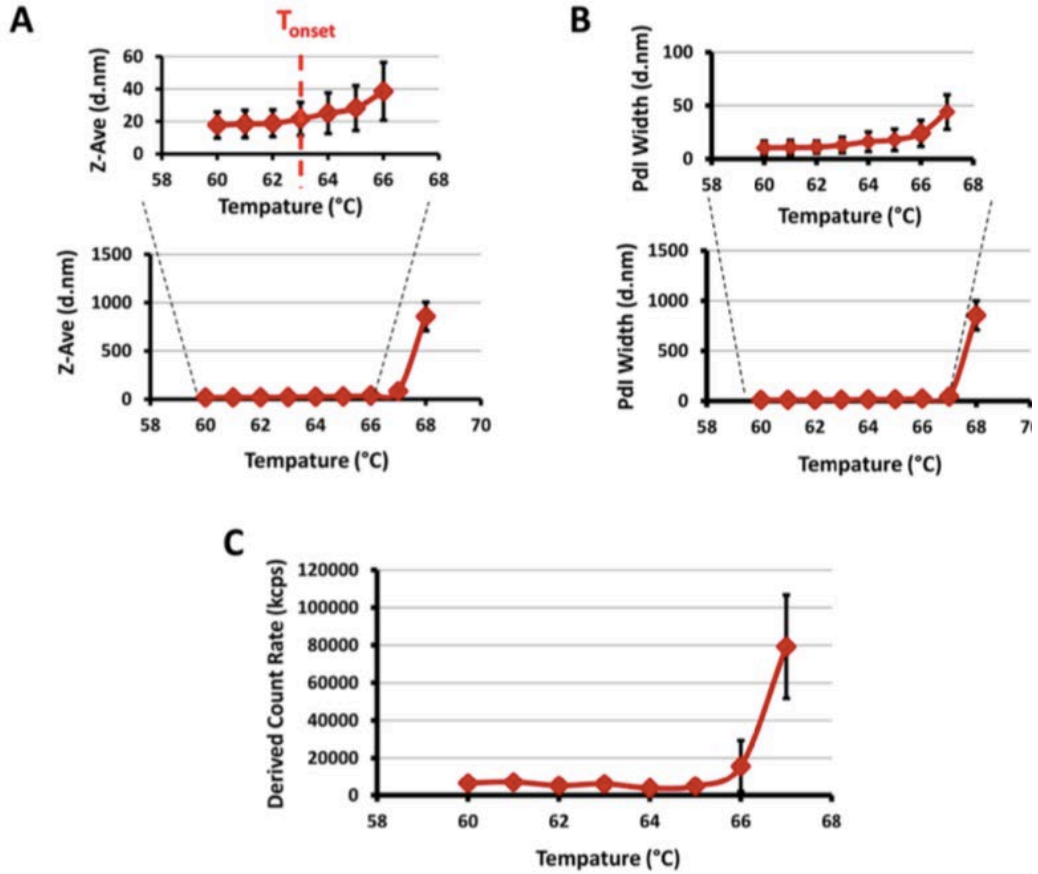
olduğu sıcaklık noktası (agregasyon onset) belirlenmiştir. Bu çalışma ile BVZ ile çalışma aşamasında nanoenkapsülasyon prosesinin sıcaklık sınırı belirlenmiştir.

Şekil 4.14'te , yoğunluk bazlı olarak gösterilen ölçümlerde, 61 °C ve 62 °C'deki BVZ ana piki gözlenebilmektedir. 63 °C sıcaklık uygulamasından sonra ise, BVZ ana piki ile agregatlarının pikleri birbiri ile karışmaya başlamakta, 67 °C 'de ise artık tekdüze olmayan bir dağılım göstermektedir. 68 °C 'de ise, BVZ'nin ana piki tamamen ortadan kaybolmuştur.



Şekil 4.14. Bevasizumab'ın yoğunluk olarak agregasyon T_{onset} analizleri, (n=6) (92)

Şekil 4.15'te görüldüğü gibi, BVZ 62 °C ile 64 °C arasında degrade olmaya başlamıştır. Sıcaklığın yükselmesi ile birlikte, 64 °C 'de PDI genişliği yükselmeye başlamış ve 66 °C 'da dramatik olarak artmıştır . 4C'de gösterildiği üzere, sıcaklık ve count rate (sayım oranı) arasındaki ilişkiyi gösteren grafikte, sıcaklığın 66 °C 'yı geçmesi ile birlikte kcps, derived count rate = ölçülen sayım oranı/atenüasyon faktörü) anormal olarak yükselmektedir.



Şekil 4.15. Bevasizumab'ın T_{onset} noktasının belirlenmesi, (n=6) (92)

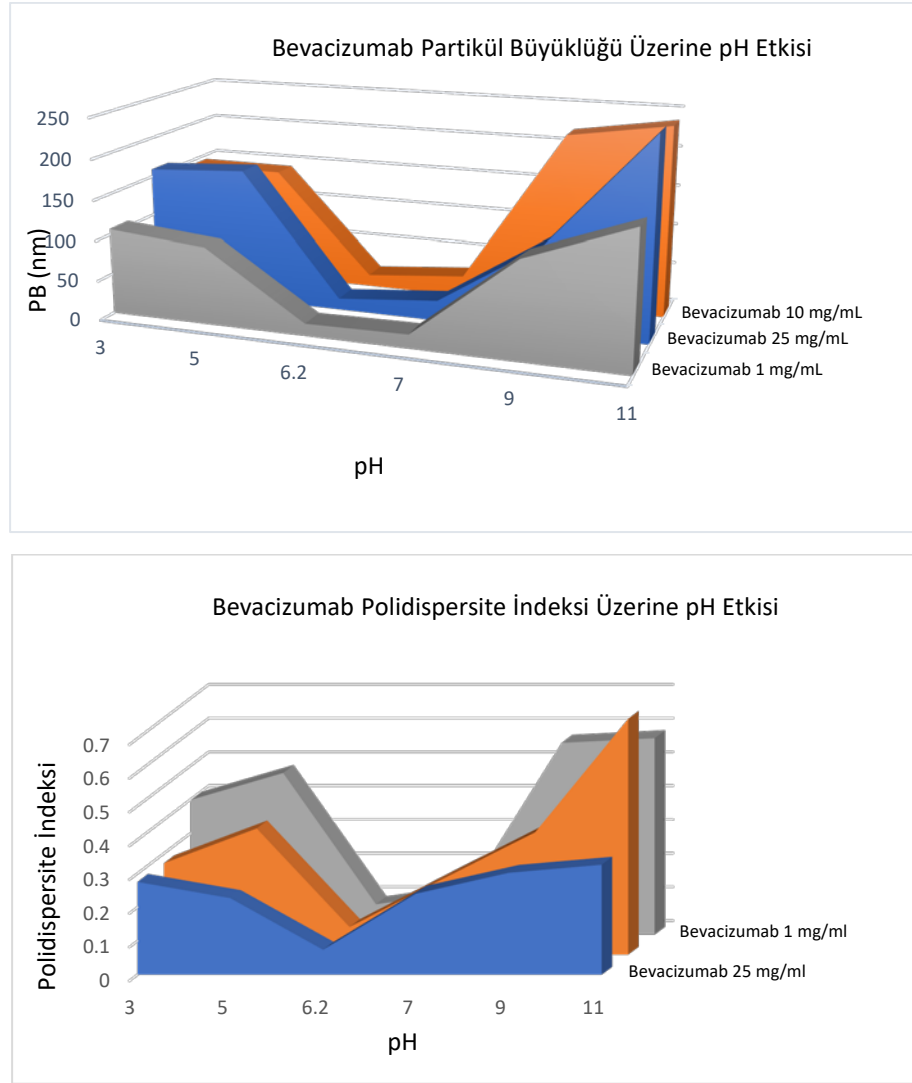
BVZ'nin Tonset noktasının belirlenmesinde de DLS yöntemi kullanılmış ve DSC yöntemine göre DLS yöntemi ile daha hızlı, pratik ve güvenilir sonuçlara erişebileceği görülmüştür.

4.2.2. Bevasizumab Üzerine pH Etkisinin Değerlendirilmesi

Antikorların etkinliklerini koruyabilmeleri için doğal (native) yapıda ve monomerik durumda kalmaları gerekmektedir. Agregasyona yol açabilecek tüm faktörlerin, antikorlar ile çalışırken minimize edilmesi, antikor stabilitesi ve fonksiyonelliğinin korunabilmesi için gereklidir. Bilindiği üzere, asit maruziyeti antikorların konformasyonlarında değişimlere yol açmaktadır (97). Bu sebeple, antikorlar ile gerçekleştirilen formülasyon çalışmalarında sıcaklık gibi, ekstrem pH değerlerinin de değerlendirilmesi ve çalışılan antikora özel olarak test edilmesi

gerekmektedir. Böylece formülasyon prosesi bu stabilite deneylerine göre modifiye edilmelidir.

pH etkisinin incelendiği çalışmada farklı konsantrasyonlarda ve farklı pH ortamlarında ölçülen antikora ait partikül büyüklüğü, pH 6,2 – 7 arasında neredeyse değişime uğramazken, pH 3 gibi ya da pH 11 gibi ekstrem asidik ve bazik ortamlarda agregasyon gözlenmiştir (Şekil 4.16). Bu bilgiler ışığında nanopartiküllere BVZ'nin enkapsülasyonu sırasında, proses boyunca pH değişimi kontrol edilmiş ve pH 6-7 arasında sabit tutulmuştur.

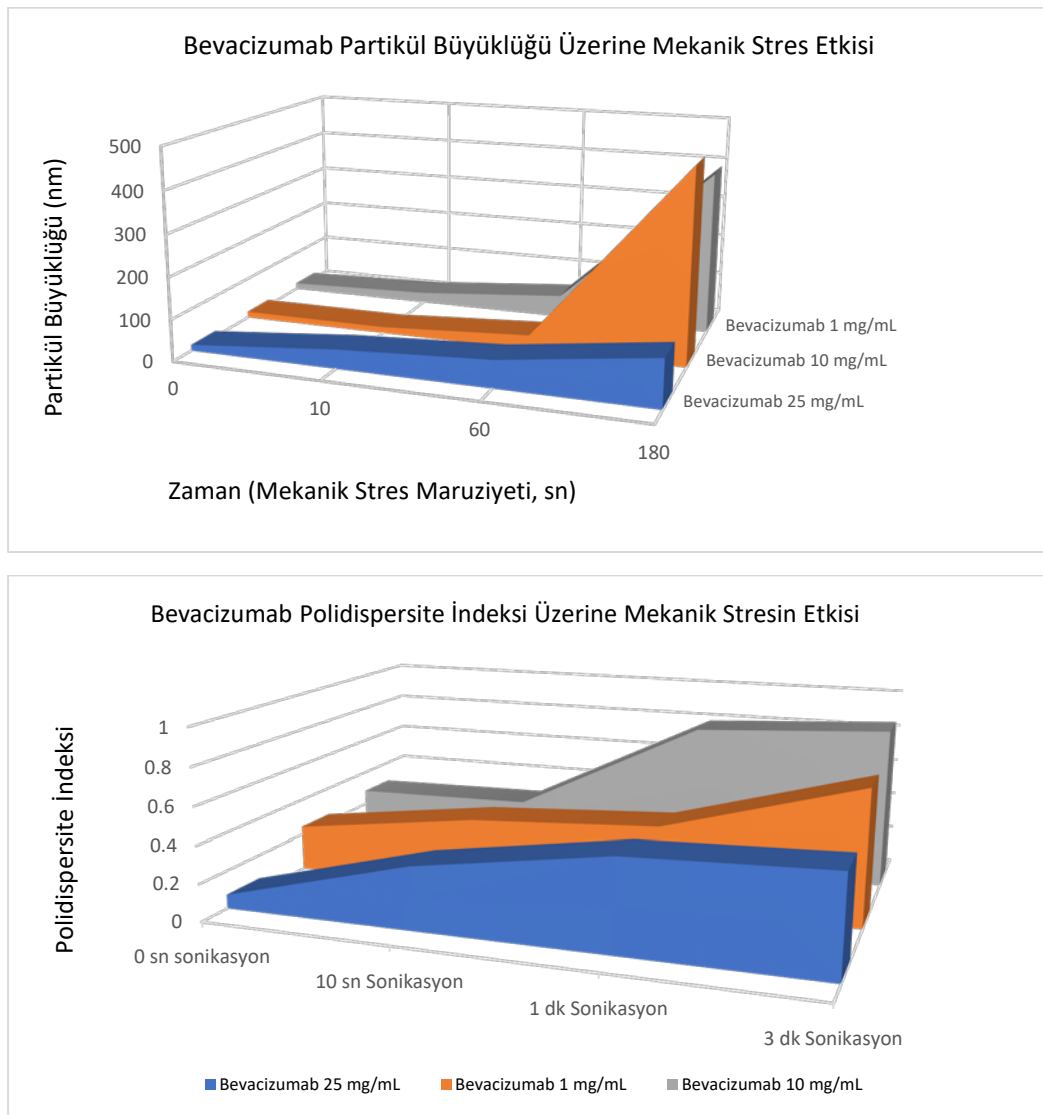


Şekil 4.16. Bevasizumab partikül büyüklüğü üzerine pH etkisinin, DLS yöntemi ile incelenmesi, (n=6)

4.2.3. Bevasizumab Üzerine Mekanik Stres Etkisinin Değerlendirilmesi

Protein agregasyonunun bir başka önemli nedeni de mekanik stres koşullarıdır. Antikorların üretilmesi, formülasyonu ya da nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemlerin içerisinde yüklenmesi aşamalarında da mekanik stres oluşturabilecek birçok faktör bulunmaktadır. Karıştırma, sonikasyon, vorteks bu stres kaynaklarına örnek olarak verilebilir. Her bir basamakta antikorun agregasyonu mümkün olabilmektedir. Bu sebeple, özellikle de nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler ile biyoteknolojik ürünlerin bir arada kullanıldığı çalışmalarda işlem basamaklarının gözden geçirilerek modifiye edilmesi gerekmektedir (98).

Eppler ve arkadaşlarının çalışmalarında, 150 rpm, 200 rpm ve 250 rpm’de sallanmaya (shaking) karşı çeşitli antikorların agregasyonunu incelemişlerdir. Mekanik stresin agregasyona neden olduğunu birçok yöntem ile doğrulamışlardır (99). Tez kapsamında gerçekleştirilen ön stabilite deneylerinde, nanopartiküllerin hazırlanma aşamasında sıklıkla kullanılan sonikasyon basamağı değerlendirilmiştir. Şekil 4.17 ’de görüldüğü gibi, 10 saniye sonikasyon bile antikorlarda agregasyona neden olmakta ve partikül büyüklüğü ile polidispersite indeksinde artışa neden olmaktadır.



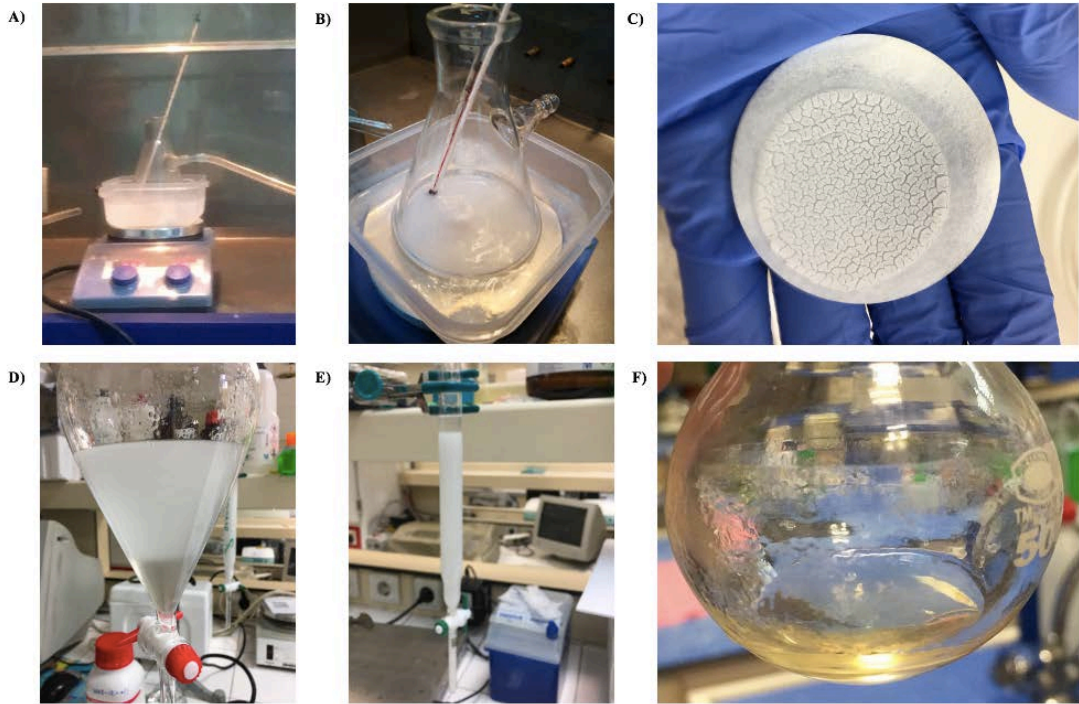
Şekil 4. 17. Bevasizumab partikül büyüklüğü üzerine mekanik stresin etkisi, DLS yöntemi ile incelenmesi, (n=6)

Bu yüzden de nanopartiküllere BVZ enkapsülasyonu prosesinde sonikasyon kullanılmayan bir metot seçilerek, antikorun stabilitesi dolayısı ile etkinliği korunmuştur.

4.3. İlaç Taşıyıcı Sistemin Tasarlanması

4.3.1. Oleil Sisteinamid Analizleri

Metot bölümünde belirtildiği üzere, oleil sisteinamid sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez basamakları Şekil 4.18'de gösterilmiştir. OCA sentezi çeşitli yöntemlerle doğrulanmıştır.



Şekil 4.18. Oleil Sisteinamid sentezi deney görüntüleri.

Şekil 4.18 ile gösterilen OCA sentezi deney düzeneğindeki görüntüler aşağıdaki deney basamakları yer almaktadır:

- A) Azot akışı altında buz banyosu ile hazırlanan deney düzeneği,
- B) Reaksiyon ürünü olan beyaz çökelek,

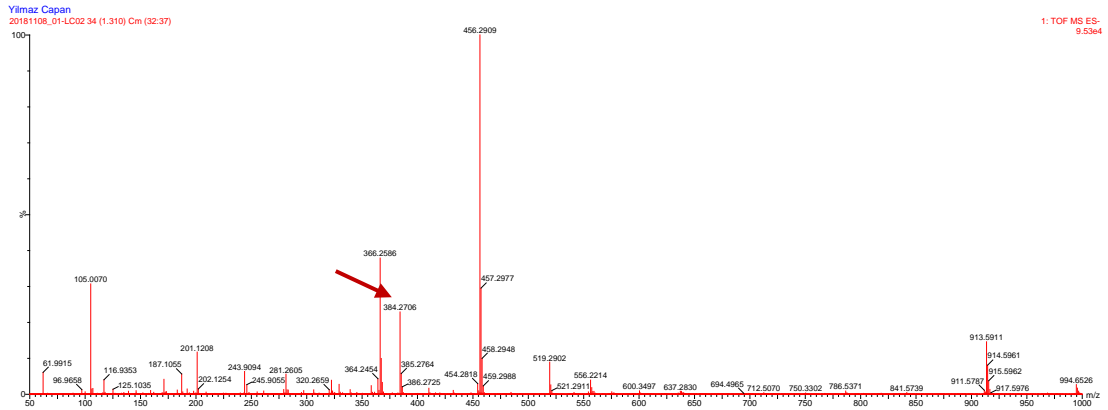
C) Tromp yardımı ile filtre edilen beyaz çökelekten uzaklaştırılan amonyak tuzları,

D) Etil asetat ile ayırma hunisi işlemi,

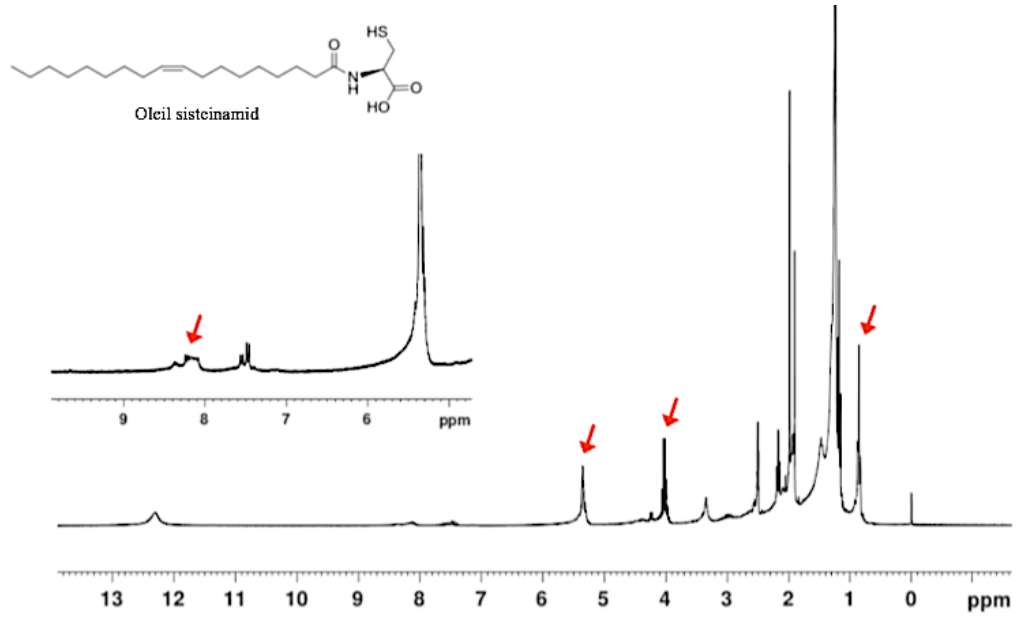
E) Silika yüklü saflaştırma kolonu,

F) Elde edilen saf Oleil Sisteinamid

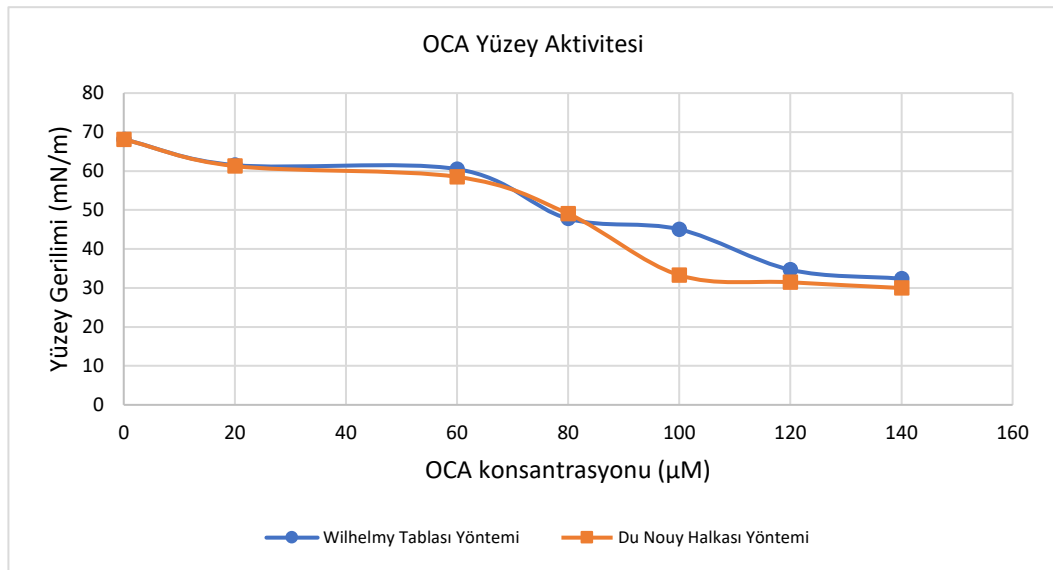
OCA sentezi, UPLC-MS ve HNMR analizleri sonrasında elde edilen spektrumların literatür verileri ile karşılaştırılması ile doğrulanmıştır (Şekil 4.19, Şekil 4.20) (94). Sonrasında OCA molekülünün bir yüzey aktif madde olması dolayısıyla hazırlanan farklı konsantrasyonlarının yüzey gerilimine etkisi, Wilhelmy Tablası ve Du Nouy Halkası yöntemleri ile incelenmiştir (Şekil 4. 21). Artan konsantrasyonlarda OCA çözeltileri, su-hava arayüzeyindeki gerilimi konsantrasyona bağlı olarak düşürmeye devam etmiştir. Bu durum, OCA molekülünün sentezinin doğru şekilde gerçekleştiğini ve nanopartiküllerin hazırlanması basamağında, bu molekülün, nanopartiküllerin yüzeyine yerleşeceğini göstermektedir.



Şekil 4.19. Asetonitrilde çözülmüş, sentezlenen Oleil Sisteinamid (MW= 385 g mol⁻¹)'nın Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (UPLC-MS) Analizi Sonucu



Şekil 4. 20. DMSO'da çözülmüş olan Oleil Sisteinamid'in HNMR spektrumu. Oklar ilgili proton kimyasal değişimlerini göstermektedir. (400 MHz, DMSO-d, δ): 5,32 (m; 2H; CH=CH); 8,04 (s-broad, 1H, NH amide); 4,38 (t, 1H, CH1-C(=O)O); 0,85 (m; 3H,CH₃, 1 beta C-R)

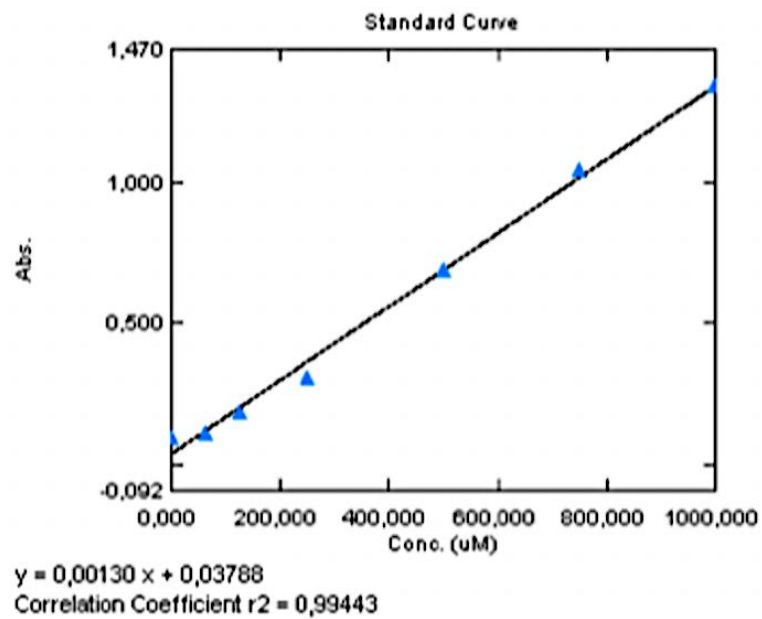


Şekil 4. 11. Yüze Gerilimi (Atensiyon) cihazı iki farklı yöntem ile Oleil Sisteinamid yüze aktivitesinin ölçülmesi, (n=3)

4.4. Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküllerin Aktif Hedeflendirilme Yönteminin Doğrulanması

Nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında, OCA molekülünün hazırlanışa eklenmesi ile, OCA molekülünün nanopartikül yüzeyine bağlanması sağlanmıştır. Bu bağlanma işlemi Ellman's analizi ile doğrulanmıştır. Ellman's analizi sülfidril gruplarının kantitatif tayininde kullanılmaktadır. Şekil 4.22'de Ellman's analizi için hazırlanan kalibrasyon eğrisi görülmektedir.



Şekil 4.22. Ellman's Analizi UV Visible Spektrometresi Kalibrasyon Eğrisi ve kalibrasyon denklemi, (n=6)

Nanopartiküllerin hazırlanması basamağında, OCA molekülünün hazırlanışa dahil edildiği ve edilmediği yöntemler sonucu elde edilen nanopartiküller, Ellman's analizi ve DLS yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. OCA molekülünün hazırlanış basamağına eklendiği nanopartiküllerin yüzeyindeki sülfidril konsantrasyonu, OCA molekülünün sülfidril uçlarının nanopartikül yüzeyinde konumlanması dolayısı ile 192,408 µM/ml olarak hesaplanırken, OCA molekülünün hazırlanışta kullanılmadığı nanopartiküllerin yüzeyindeki sülfidril konsantrasyonu 2,954 µM/ml olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Elde edilen verilere göre, OCA molekülü nanopartiküllerin

hazırlanış basamağında organik faza eklendiğinde, nanopartiküllerin yüzeyine kovalent olarak bağlanmakta ve yüzeyde sülfidril gruplarının oluşmasını sağlamaktadır.

Tablo 4.1. OCA-PLGA ve PLGA N'lerin Ellman's Assay sonucunda hesaplanan yüzey sülfidril konsantrasyonu.

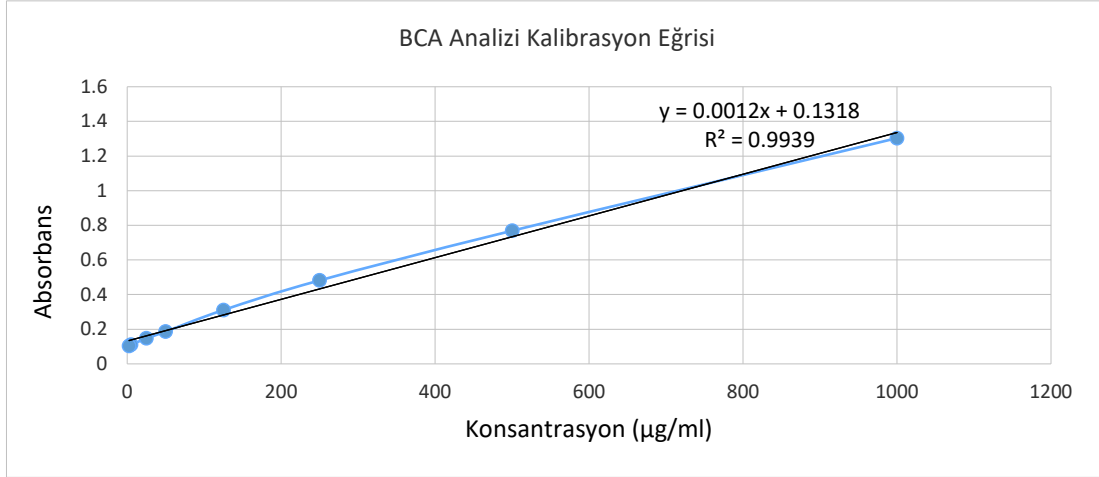
| | Sülfidril Konsantrasyonu |
|-------------|---------------------------------|
| OANP | 192,408 μ M/ml |
| NP | 2, 954 μ M/ml |

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, nanopartiküllerin yüzeyindeki negatif yüklü sülfidril gruplarının artması ile OCA ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyeli OCA ile hazırlanmayan partiküllerin zeta potansiyeline göre daha negatif olarak ölçülmektedir. OCA ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde ise dikkate değer bir değişiklik görülmemektedir.

Tablo 4. 2. OCA-PLGA ve PLGA nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri, (n=6)

| | NP | OCA-NP |
|------------|--------------------|--------------------|
| PB | 130 \pm 4,1 nm | 147,5 \pm 6,8 nm |
| PDI | 0,078 \pm 0,006 | 0,084 \pm 0,008 |
| ZP | -16,8 \pm 3,9 mV | -24,7 \pm 2,5 mV |

OCA ile hazırlanan nanopartiküllere, maleimid aktivasyonu işlemi gerçekleştirilmiş antikoların konjuge edilmesi, aktif hedeflendirme stratejisinin doğrulanması için en önemli basamaklardan birisidir. Aktive edilmiş antikoların, nanopartiküllerin yüzeyine bağlandığını göstermek için gerçekleştirilen BCA analizine ait kalibrasyon doğrusu Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.23. BCA Analizi kalibrasyon eğrisi, (n=6)

BCA analizi ile, aktive edilmiş antikorların ve aktive edilmemiş antikorların nanopartikül yüzeyine bağlanma yüzdeleri araştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada, konjugasyon için gerekli süre boyunca karışmaya bırakılan antikorlar ve nanopartiküller santrifüj edilerek, süpernatantlarındaki antikor miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, maleimid aktivasyonu yapılmadan, nanopartikül yüzeyine konjuge olmayan antikor yüzdesi % 90,96 iken, maleimid aktivasyonu işlemi gerçekleştirilmiş olan antikorların nanopartikül yüzeyine konjuge olmayan yüzdesi ise % 23,22 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3). Bu durumda, maleimid aktivasyonu sayesinde antikorlar nanopartikül yüzeyine çok daha fazla oranda tutunmuş ve aktif hedeflendirme sağlanmıştır.

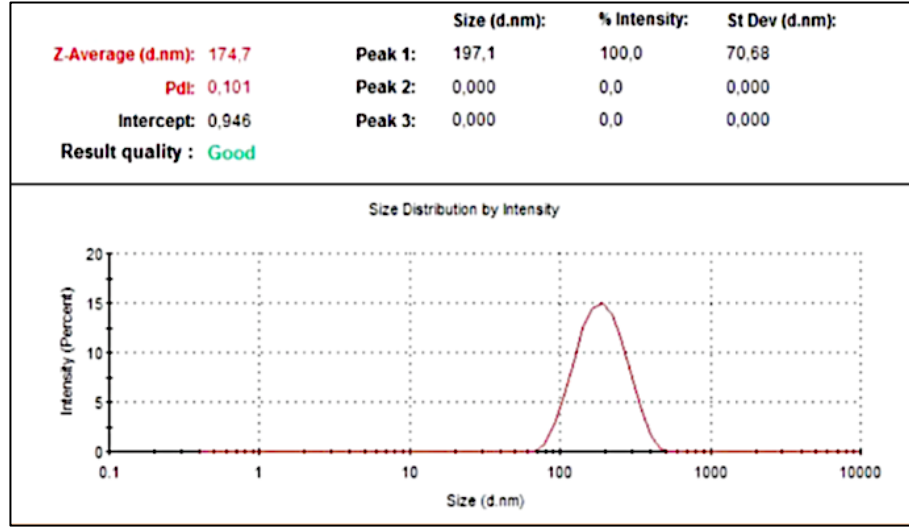
Tablo 4.3. BCA Analizi verileri, (n=6)

| BCA Analizi | Absorbans | Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) | Süpernatant hacmi (ml) | Süpernatanttan tayin edilen mAb miktarı (%) |
|---|-----------|---------------------------------------|------------------------------|--|
| Aktive edilmiş Anti - CD71 fare antikoruna ile inkübe edilmiş OCA- NP süpernatantı | 0,58 | 374,63 | 0,31 | 23,22 |
| Aktive edilmemiş CD71 fare antikoruna ile inkübe edilmiş OCA- NP süpernatantı | 1,24 | 928,18 | 0,49 | 90,96 |

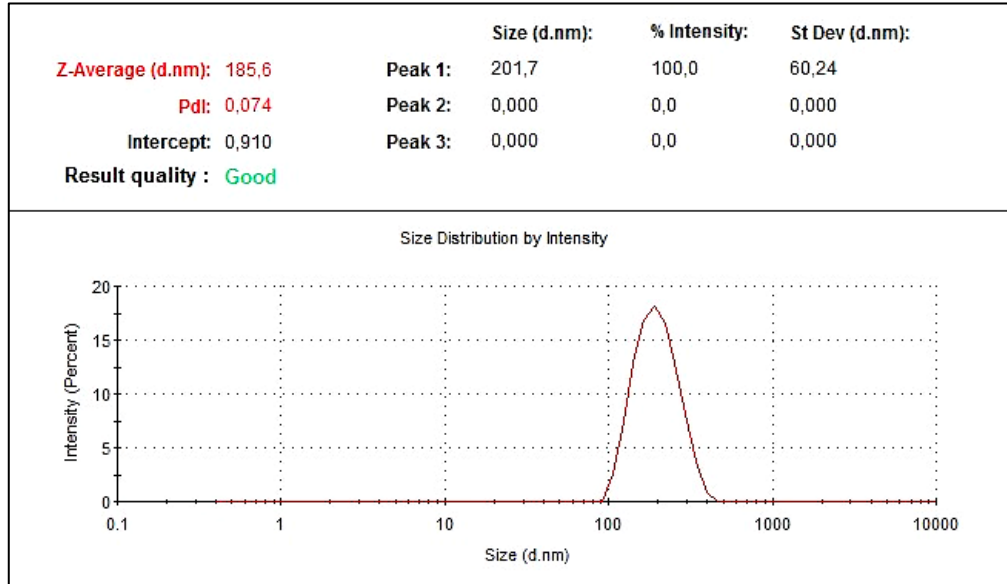
4.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.5.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri DLS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.24 ve Şekil 4.25’de görüldüğü gibi, BVZ yüklü Anti-CD71 NPLerin ve BVZ yüklü Kontrol NPLerin ortalama partikül büyüklükleri 200 nm’nin altındadır ve partikül büyüklüğü dağılımları homojendir.



Şekil 4.24. Bevasizumab yüklü Anti-CD71 NPLerin DLS yöntemi ile ölçülmüş partikül büyüklüğü dağılımı



Şekil 4.25. Bevasizumab yüklü Kontrol NPLerin DLS yöntemi ile ölçülmüş partikül büyüklüğü dağılımı

Tablo 4.4 ile gösterildiği gibi; OCA ile hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklükleri $130,7 \pm 5,8$ nm ve PDI değerleri $0,114 \pm 0,034$ olarak tespit edilmiştir. Zeta potansiyelleri ise $-18,1 \pm 3,5$ mV olarak ölçülmüştür. Bu partiküllere BVZ yüklendiğinde, partikül büyüklükleri $160,7 \pm 7,0$ nm ve PDI değerleri $0,191 \pm 0,012$ olurken, zeta potansiyelleri $-26,4 \pm 7,1$ mV olarak değişmiştir. BVZ yüklü ve

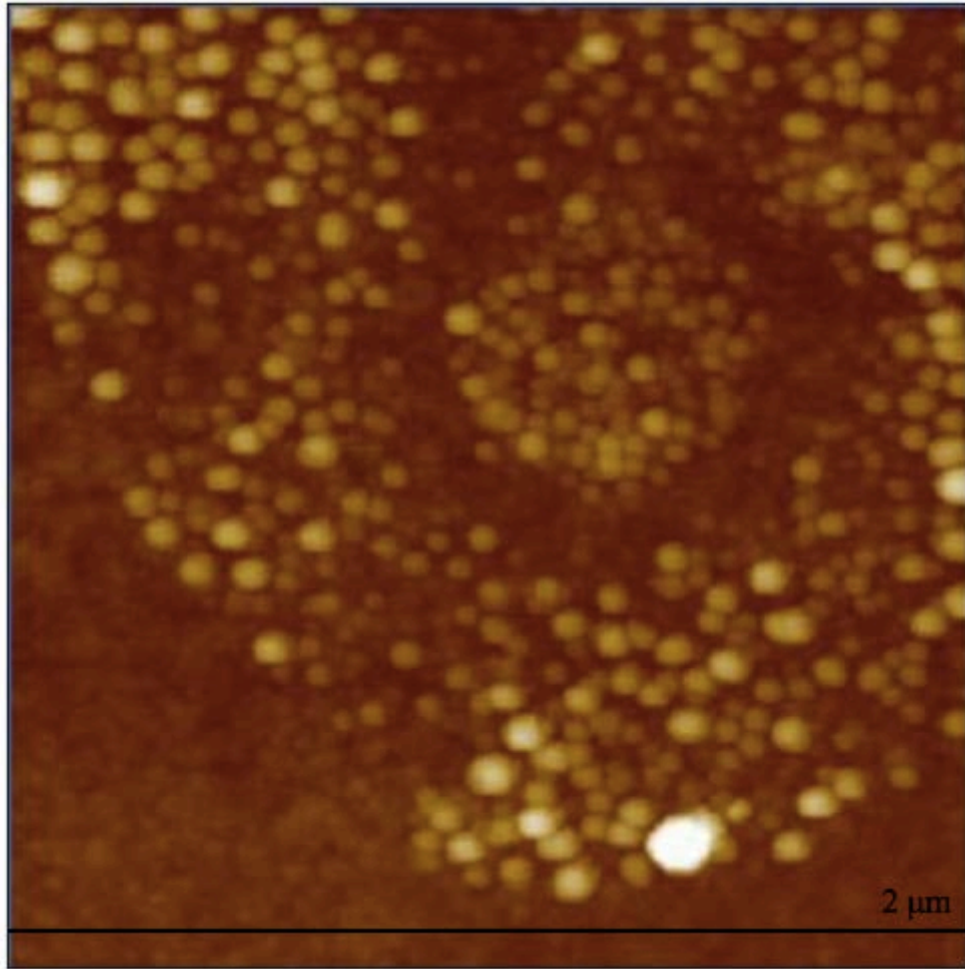
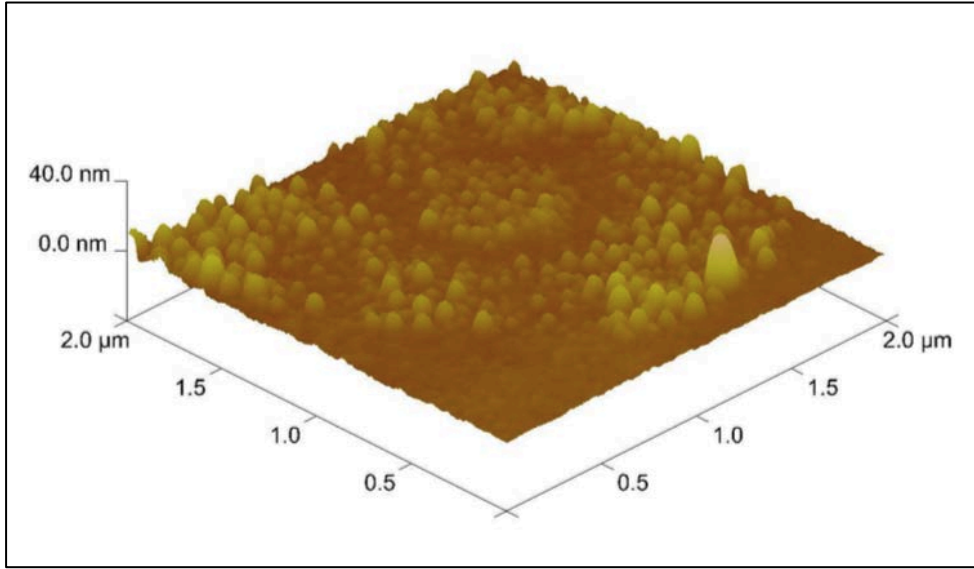
aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin ise ortalama partikül büyüklüğü $174,7 \pm 2,9$ nm ve PDI değeri $0,101 \pm 0,03$ olarak ölçülürken, zeta potansiyelleri $-19,1 \pm 9,4$ olarak bulunmuştur.

Tablo 4.4. Hazırlanan nanopartiküllerin DLS ölçüm verileri, (n=6)

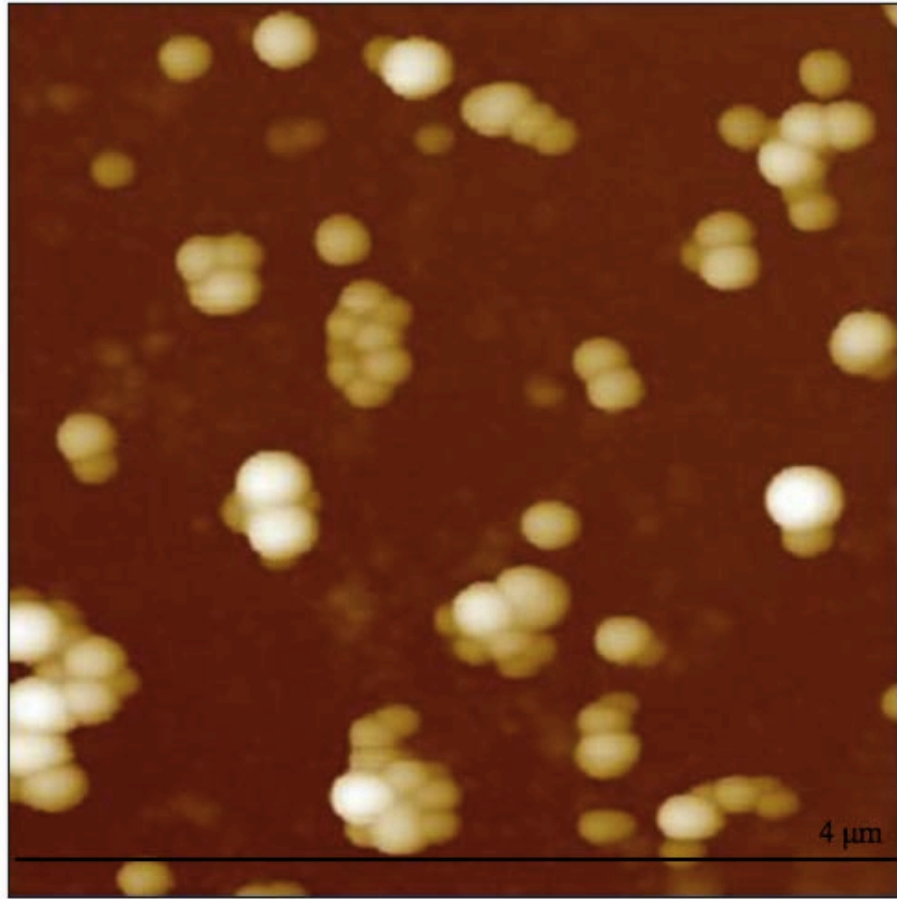
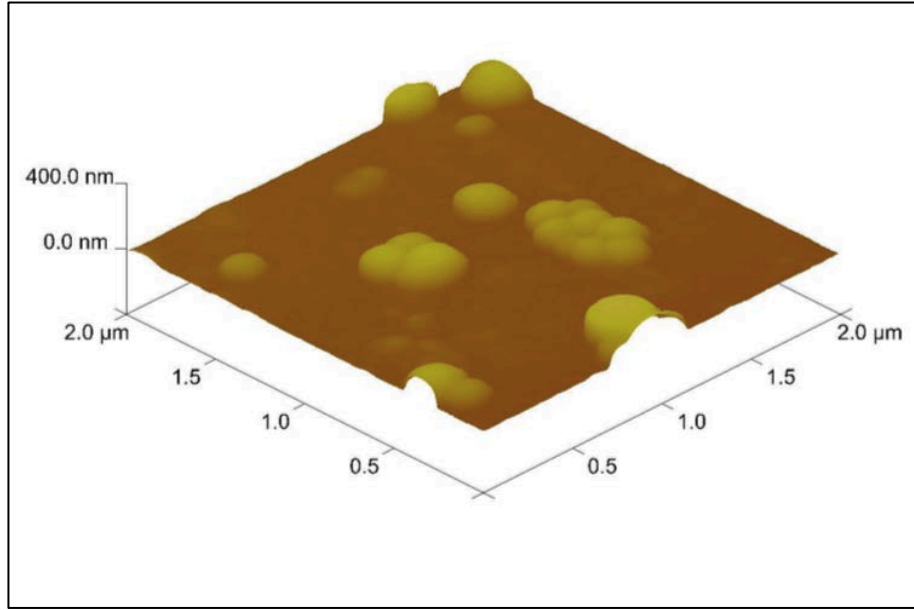
| Nanopartikül | Partikül Büyüküğü (nm) | PDI değeri | Zeta Potansiyeli (mV) |
|---------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|
| OCA-PLGA NP | $130,7 \pm 5,8$ | $0,114 \pm 0,034$ | $-18,1 \pm 3,5$ |
| BVZ-OCA-PLGA NP | $160,7 \pm 7,0$ | $0,191 \pm 0,012$ | $-26,4 \pm 7,1$ |
| BVZ-Anti-CD71-OCA-PLGA NP | $174,7 \pm 2,9$ | $0,101 \pm 0,03$ | $-19,1 \pm 9,4$ |

4.5.2. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi

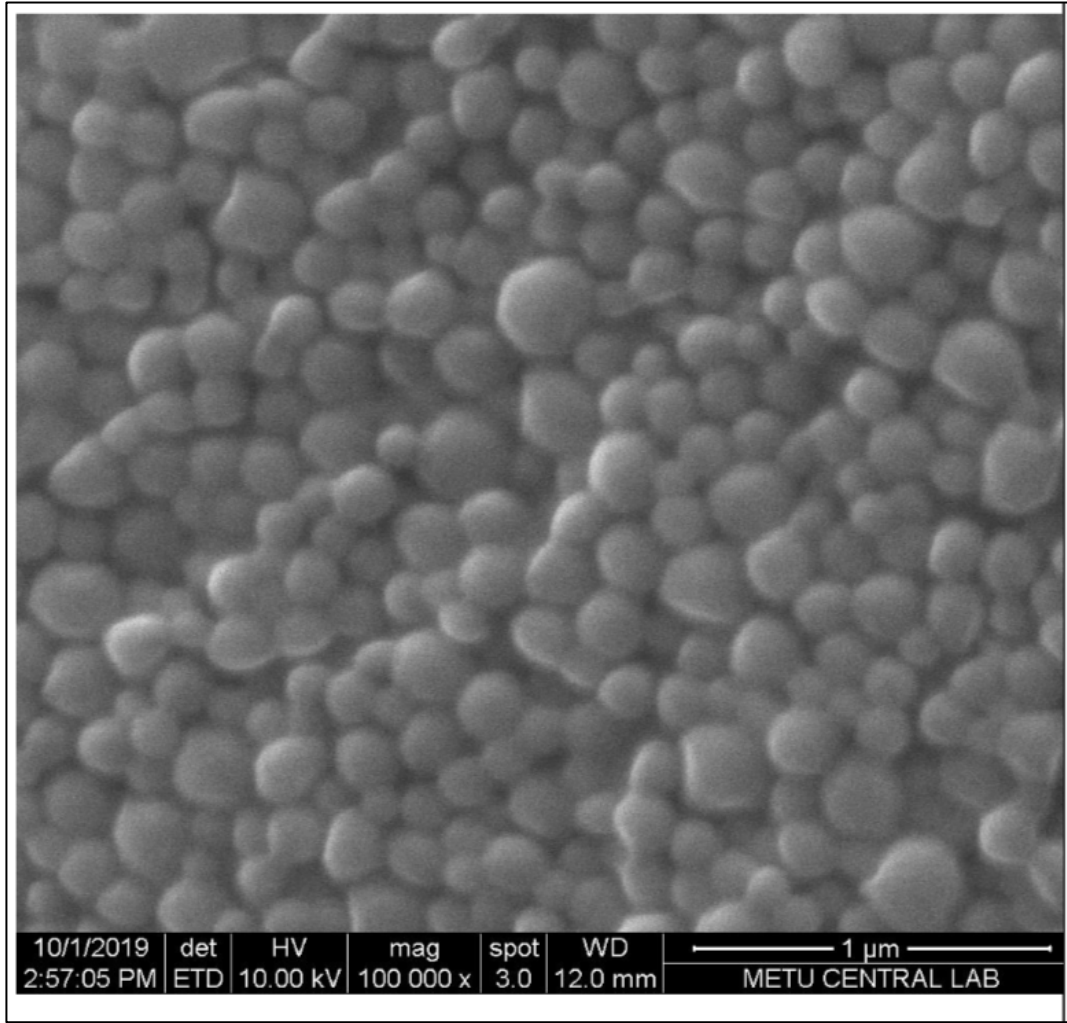
AFM ve SEM analizleri, DLS yöntemi ile elde edilen partikül büyüklüğü verilerini doğrulamaktadır. Hedeflendirilmiş ve hedeflendirme işlemi gerçekleştirilmemiş olan PLGA nanopartiküllerin AFM ve SEM analizlerinde, homojen partikül büyüklüğü dağılımı $1 \mu\text{m}$ skalasında açıkça gösterilmiştir (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29). Nanopartiküllerin hazırlama metodunun başarı ile çalıştığı ve homojen partikül büyüklüğü dağılımına sahip, tümör hücrelerine penetre olabilecek boyutlarda partiküllerin hazırlanabildiği gösterilmiştir. Hedeflendirici antikor olan anti-CD71 antikorunun konjugasyonu sırasında yükselen partikül büyüklüğü yine de yaklaşık 200 nm civarında kalmış ve homojen dağılımını korumuştur.



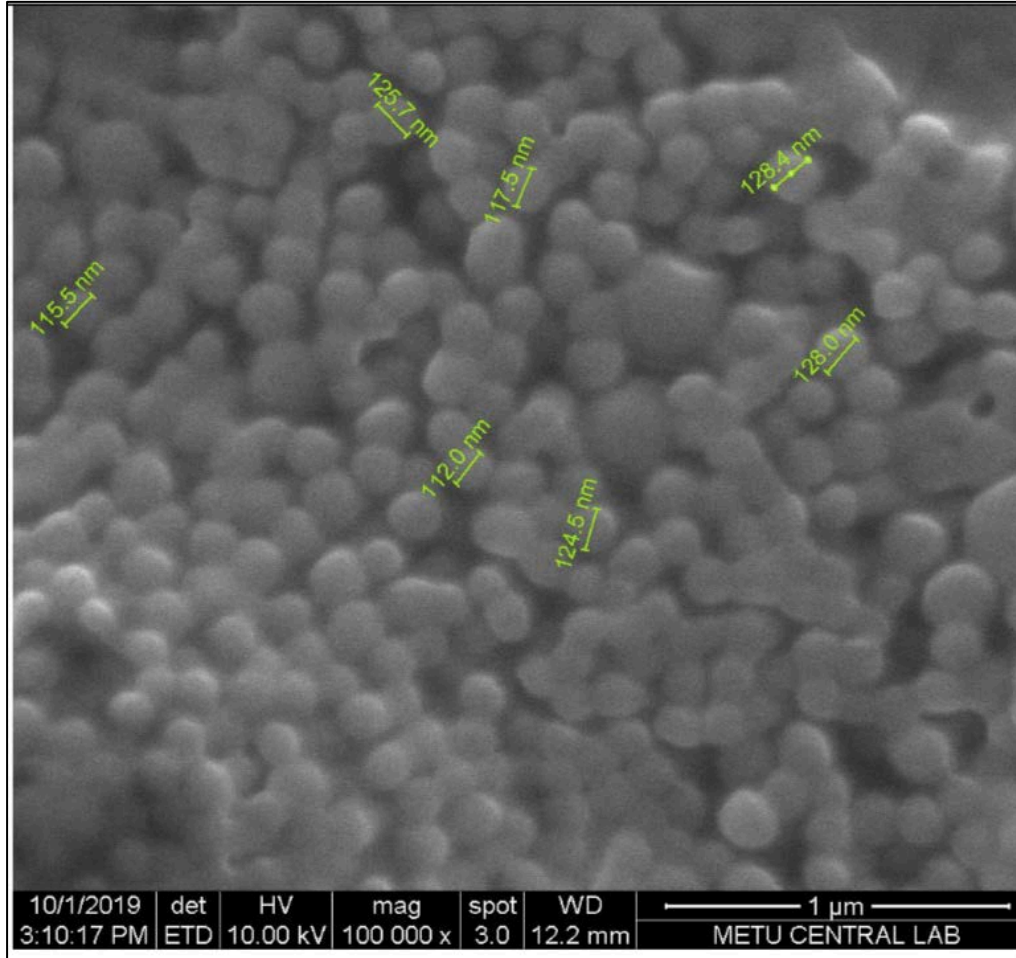
Şekil 4.26. Bevasizumab yüklü Kontrol NPLerin 3D ve 2D AFM görüntüleri



Şekil 4.27. Bevasizumab yüklü Anti-CD71 NPlerin 3D ve 2D AFM görüntüleri



Şekil 4.28. Bevasizumab yüklü Anti-CD71 NPlerin SEM görüntüleri



Şekil 4.29. Bevasizumab yüklü Kontrol NPLerin SEM görüntüleri

4.5.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

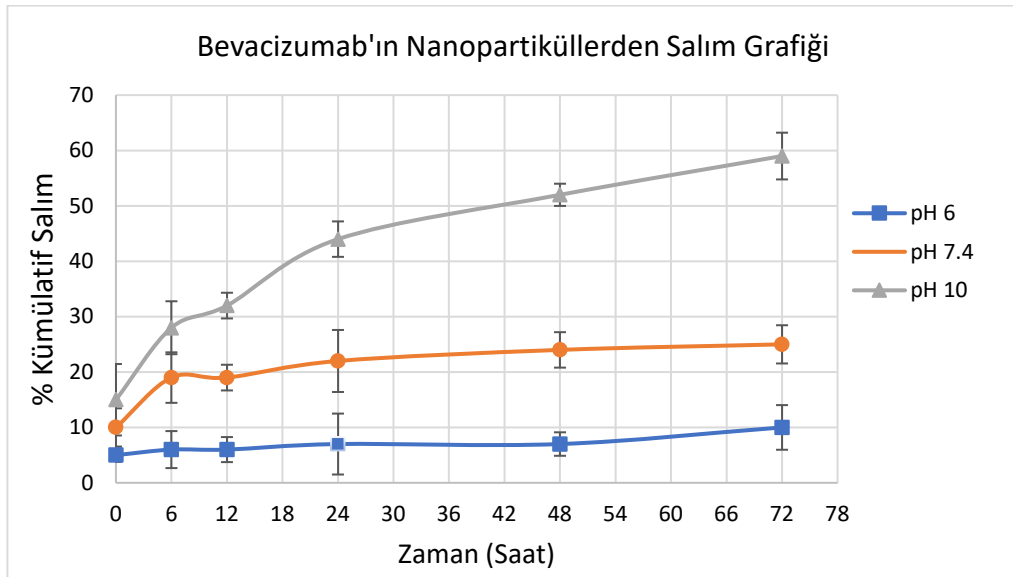
BVZ'nin nanopartikül içerisine enkapsüle edilebilmesi, enkapsülasyon etkinliğinin yüksek olması, hem in vitro hem de in vivo deneylerde kullanılacak olan ilaç yüklü nanopartiküllerin konsantrasyonu açısından önem taşımaktadır. BVZ'nin nanopartikül içerisine hapsedilerek hem stabilitesinin daha uzun süre sağlanması hem de kan dolaşımında daha uzun süre kalarak kontrollü salımının sağlanması amaçlanmıştır.

Bu sebeple, aşağıdaki formül ile enkapsülasyon etkinliği hesaplanmış ve %EE=%81 olarak ölçülmüştür.

$$\%EE = [(Eklene\tilde{n}en\ ila\tilde{c}\ miktar\ i - serbest\ ila\tilde{c}\ miktar\ i) / Eklene\tilde{n}en\ ila\tilde{c}\ miktar\ i] * 100$$

4.5.4. İn Vitro Salım DeneYleri

In vitro salım çalışması sonucunda elde edilen verilerin literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.30). Sousa ve arkadaşlarının çalışmasında BVZ'nin PLGA nanopartiküllerden in vitro salım profili incelenmiş ve salımın pH bağımlı olduğu sonucuna varılmıştır. BVZ'nin PLGA nanopartiküllerden salımı, polimerin degradasyonu, mAbın PLGA nanopartiküllerden difüzyonu, mAbın molekül büyüklüğü ve izoelektrik noktası gibi birçok faktöre bağlıdır. BVZ'nin izoelektrik noktası 8,3'tür ve bu değerin altındaki bir pH'da BVZ pozitif yüklenmektedir. PLGA nanopartiküller de negatif yüklü oldukları için, 8,3'ün altındaki pH değerlerinde BVZ ile nanopartikül arasında güçlü bir elektrostatik etkileşim olmakta ve bu durum, salım hızını düşürmektedir [13].

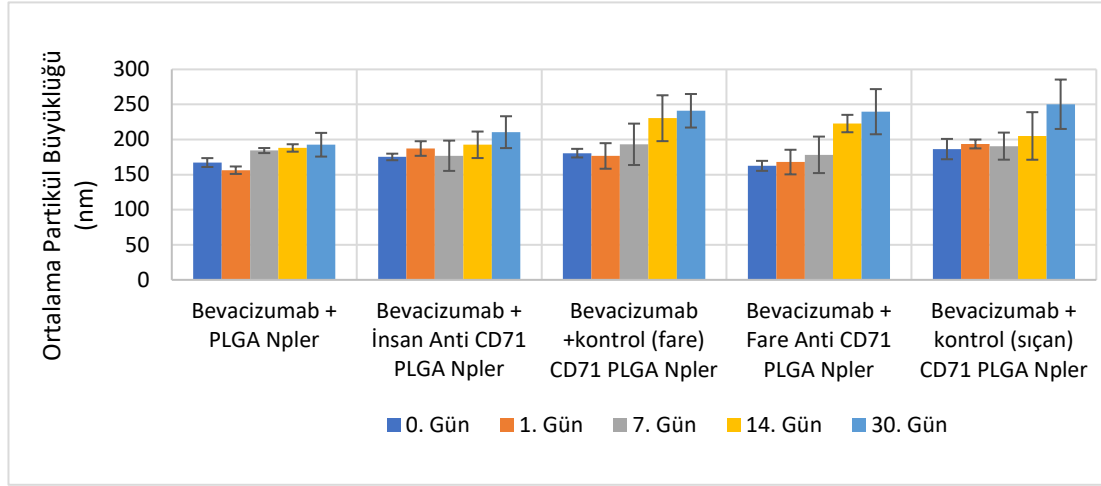


Şekil 4.30. Bevasizumab'ın nanopartiküllerden farklı pH'larda in vitro salım grafiği, (n=6)

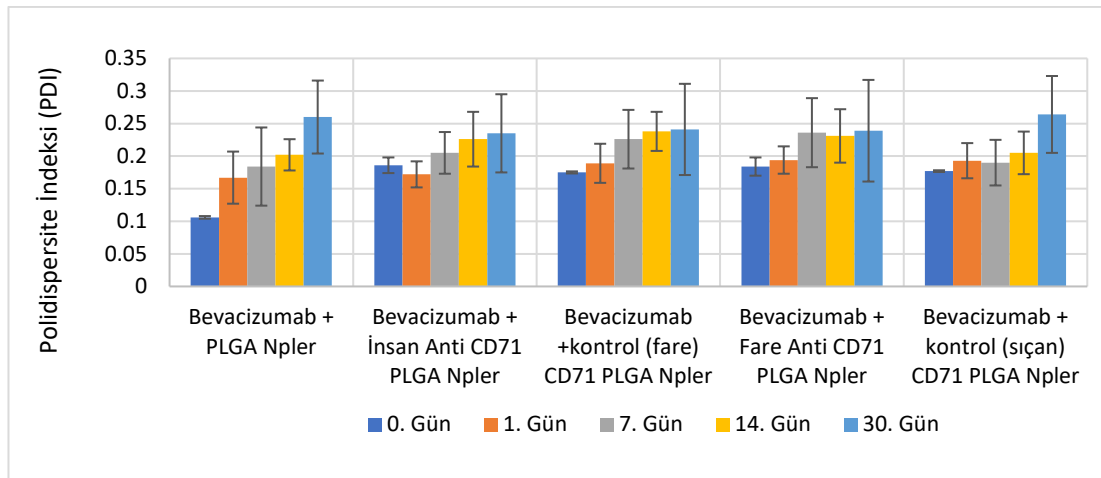
4.5.5. Stabilite Çalışmaları

BVZ yüklü PLGA partiküllerin, hedeflendirilmemiş, kontrol antikor ile konjuge edilmiş ve Anti-CD71 antikor ile konjuge edilmiş gruplarının sulu dispersiyonları +4°C'de ışıktan korunarak, 1 ay süresince partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi parametreleri dikkate alınarak DLS yöntemi ile analiz edilmiştir. Ölçümlere ilişkin sonuçlar Şekil 4.31, Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'te verilmiştir. Kısa süreli

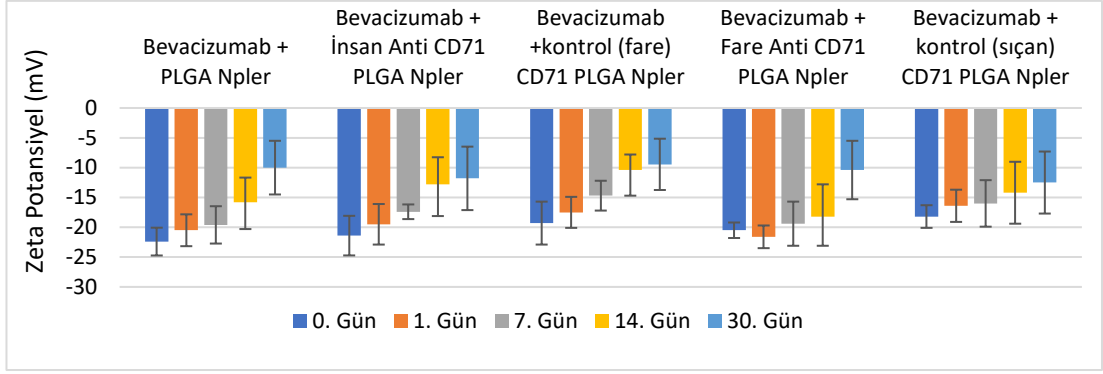
stabilite çalışmaları kapsamında, belirli günlerde (0., 1., 7., 14. ve 30.) örnekler alınarak nanopartiküllerin analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.31. Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüklerindeki değişimler (n=3, ±SS).



Şekil 4.32. Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin polidispersite indekslerindeki değişimler (n=3, ±SS).

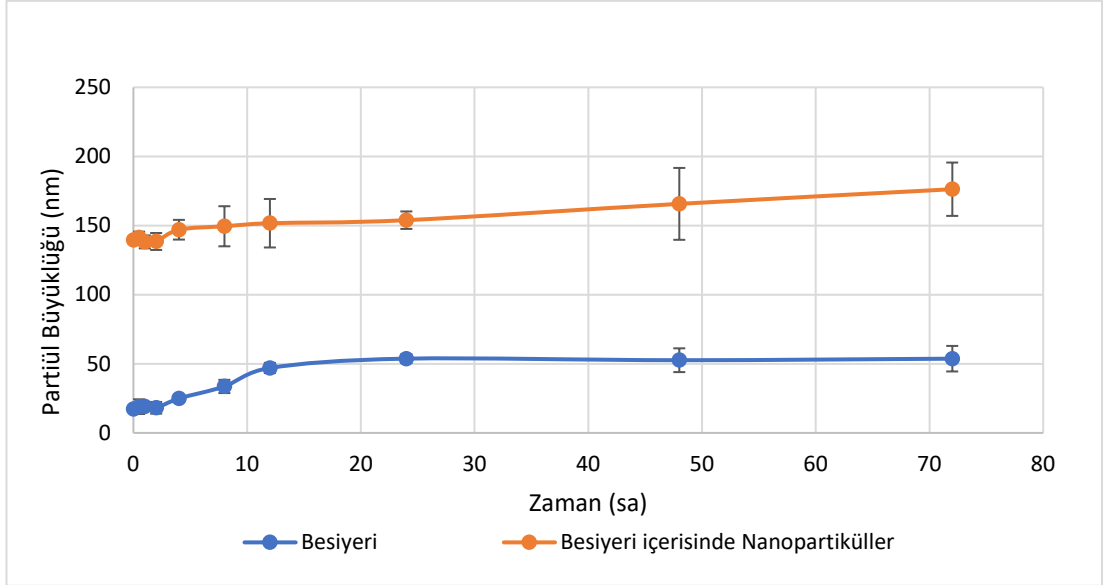


Şekil 4.33. Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerindeki değişimler (n=3, ±SS).

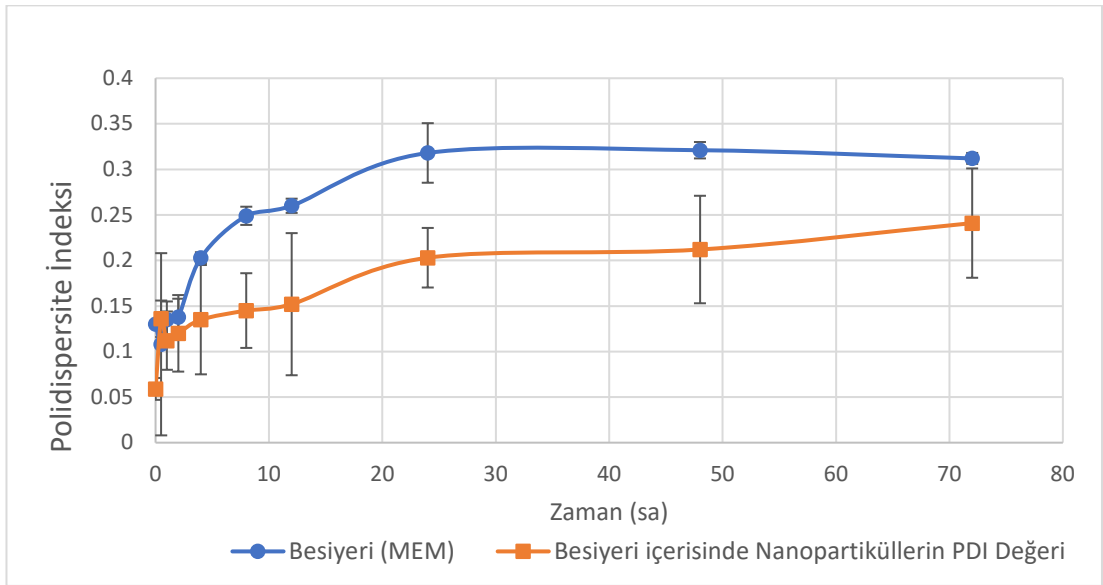
Kısa süreli stabilite çalışmaları değerlendirildiğinde, başlangıç değerlerine (0.) göre partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri arasında 1., 7. ve 14. günlerde anlamlı bir fark yokken 30. günde anlamlı farklılık ($p < 0,05$) tespit edilmiştir.

Hücre Kültürü Ortamında Partiküllerin Stabilesinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan aktif hedeflendirilmiş ve ilaç yüklü nanopartiküllerin, gerçekleştirecek in vitro çalışmalarda stabiliteyi korumaları, çalışmanın devamlılığı açısından önem taşımaktadır. Bu sebeple besiyeri içerisindeki partikül büyüklükleri ve PDI değerleri 72 saat boyunca incelenmiştir (Şekil 4.34, Şekil 4.35). 72 saat boyunca, partiküllerin partikül büyüklükleri arasında anlamlı bir fark bulunamazken, PDI değerleri arasında 24.saatten itibaren anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



Şekil 4.34. 37 °C'de MEM besiyeri içerisinde nanopartiküllerin ve MEM ortamının DLS yöntemi ile ölçülen partikül büyüklükleri (n=6)

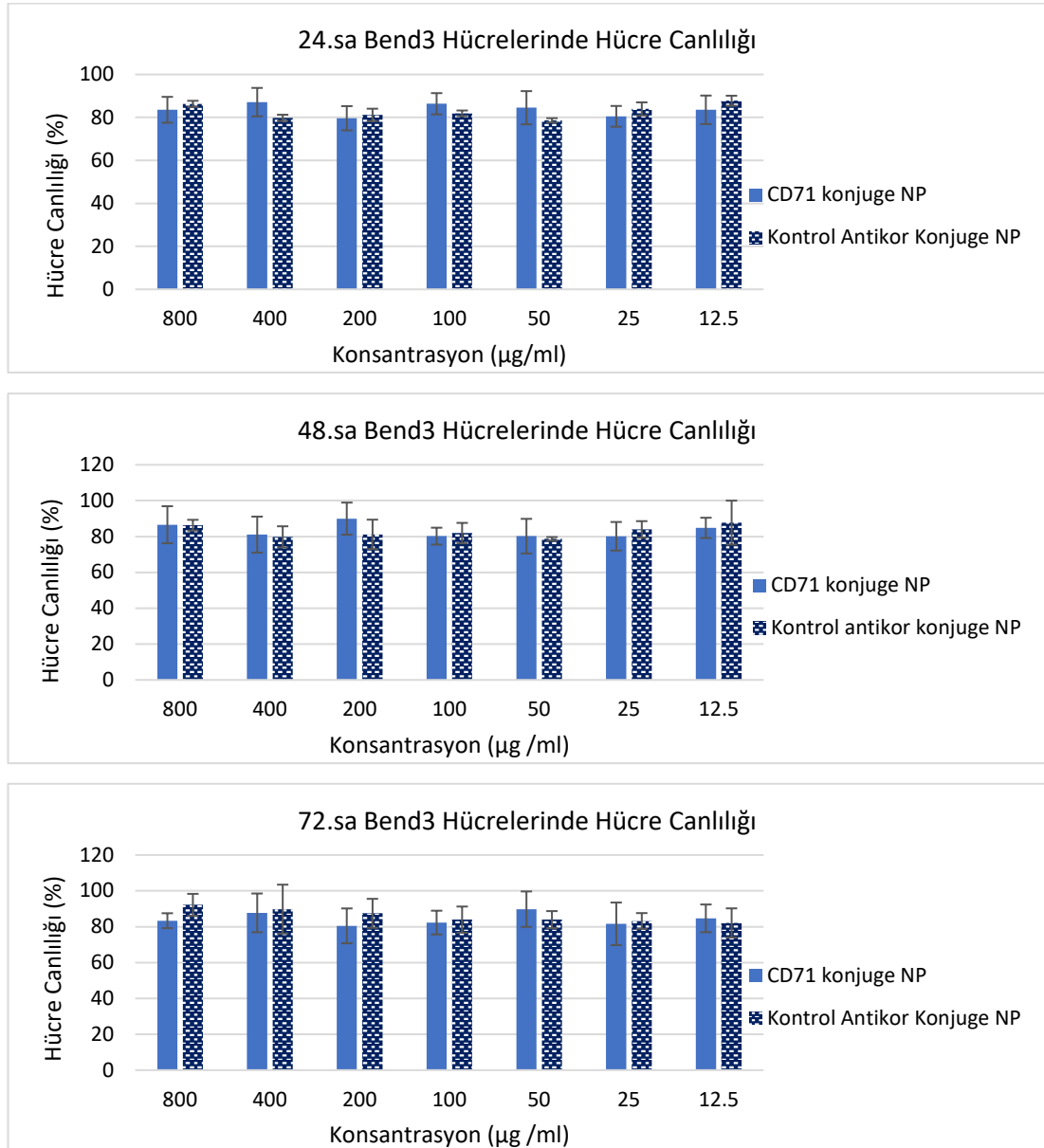


Şekil 4.35. 37 °C'de MEM besiyeri içerisinde nanopartiküllerin ve MEM ortamının DLS yöntemi ile ölçülen polidispersite indeksleri (n=6)

4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

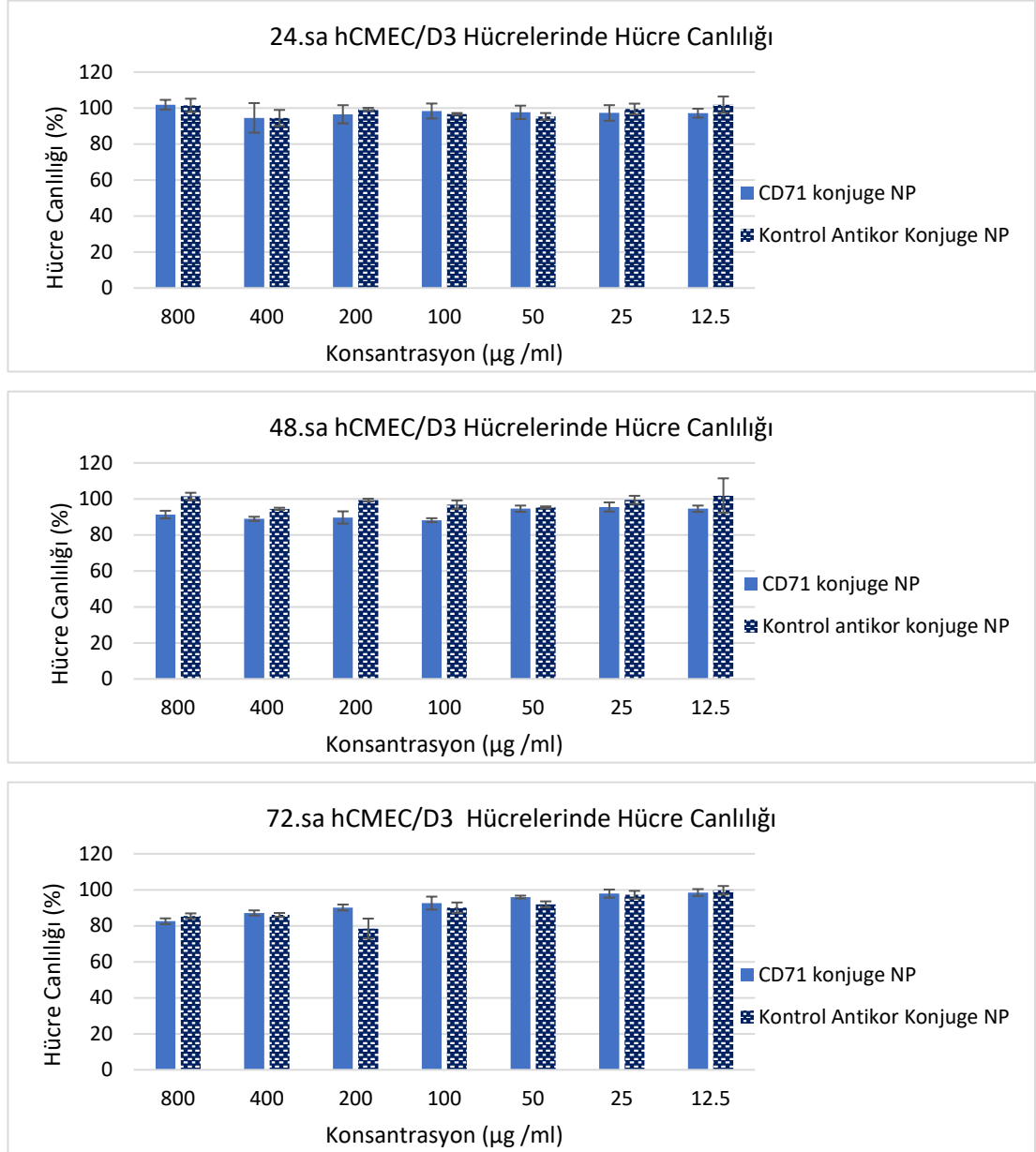
4.6.1. Güvenlilik Çalışmaları; Boş Nanopartiküllerin bEnd.3, hCMEC/D3 ve U87 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması

BVZ yüklenmemiş aktif hedeflendirilmiş ve kontrol antikorunu konjuge edilmiş nanopartiküllerin bEnd.3 hücreleri üzerindeki sitotoksitesini araştırılmış ve % hücre canlılığının 24, 48 ve 72.saatlerde %80'in üzerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.36).



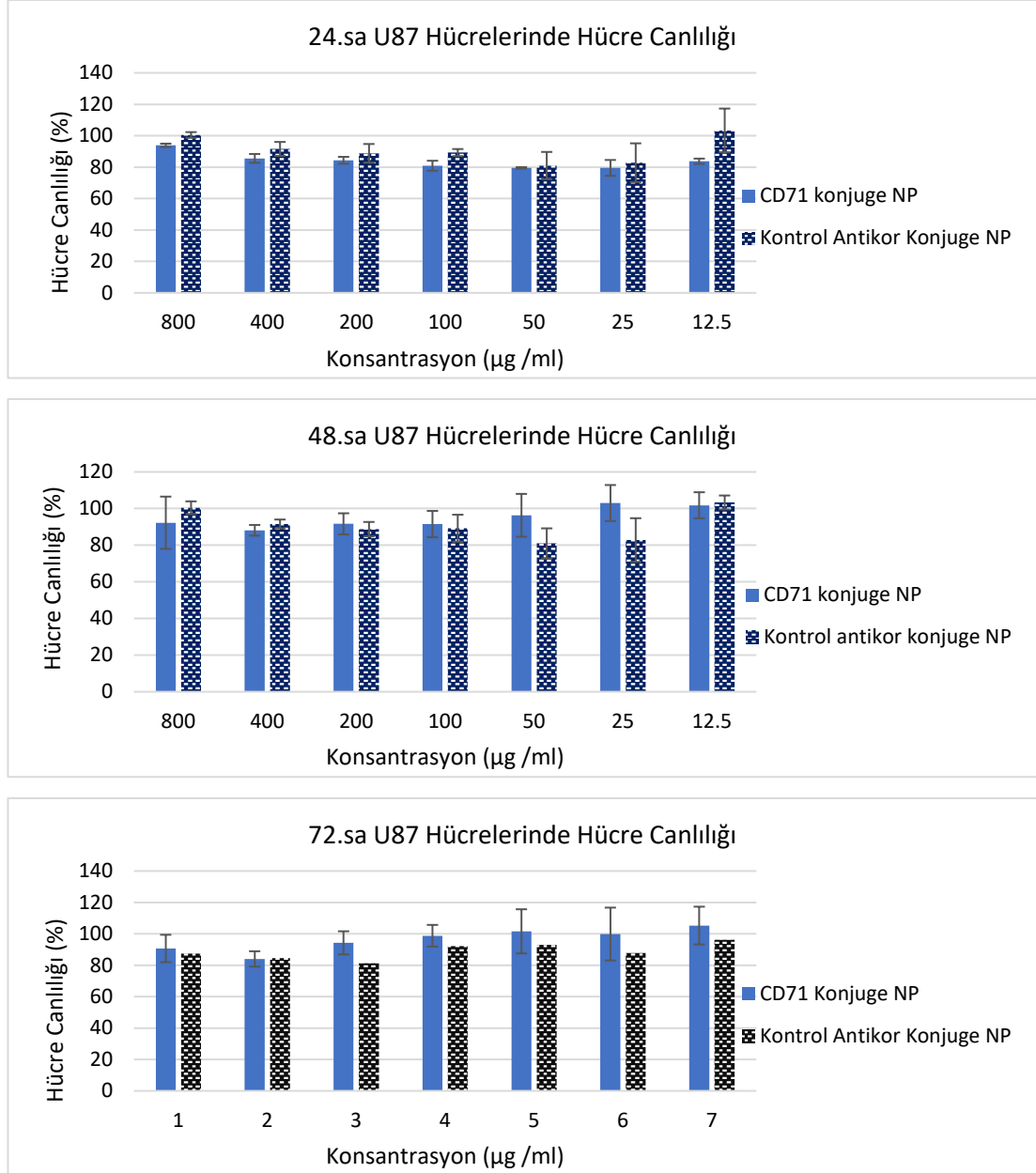
Şekil 4.36. bEnd.3 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine nanopartiküllerin etkisi, (n=6)

BVZ yüklenmemiş aktif hedeflendirilmiş ve kontrol antikorunu konjuge edilmiş nanopartiküllerin hCMEC/D3 hücreleri üzerindeki sitotoksiteleri araştırılmış ve % hücre canlılığının 24, 48 ve 72. saatlerde %80'in üzerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.37).



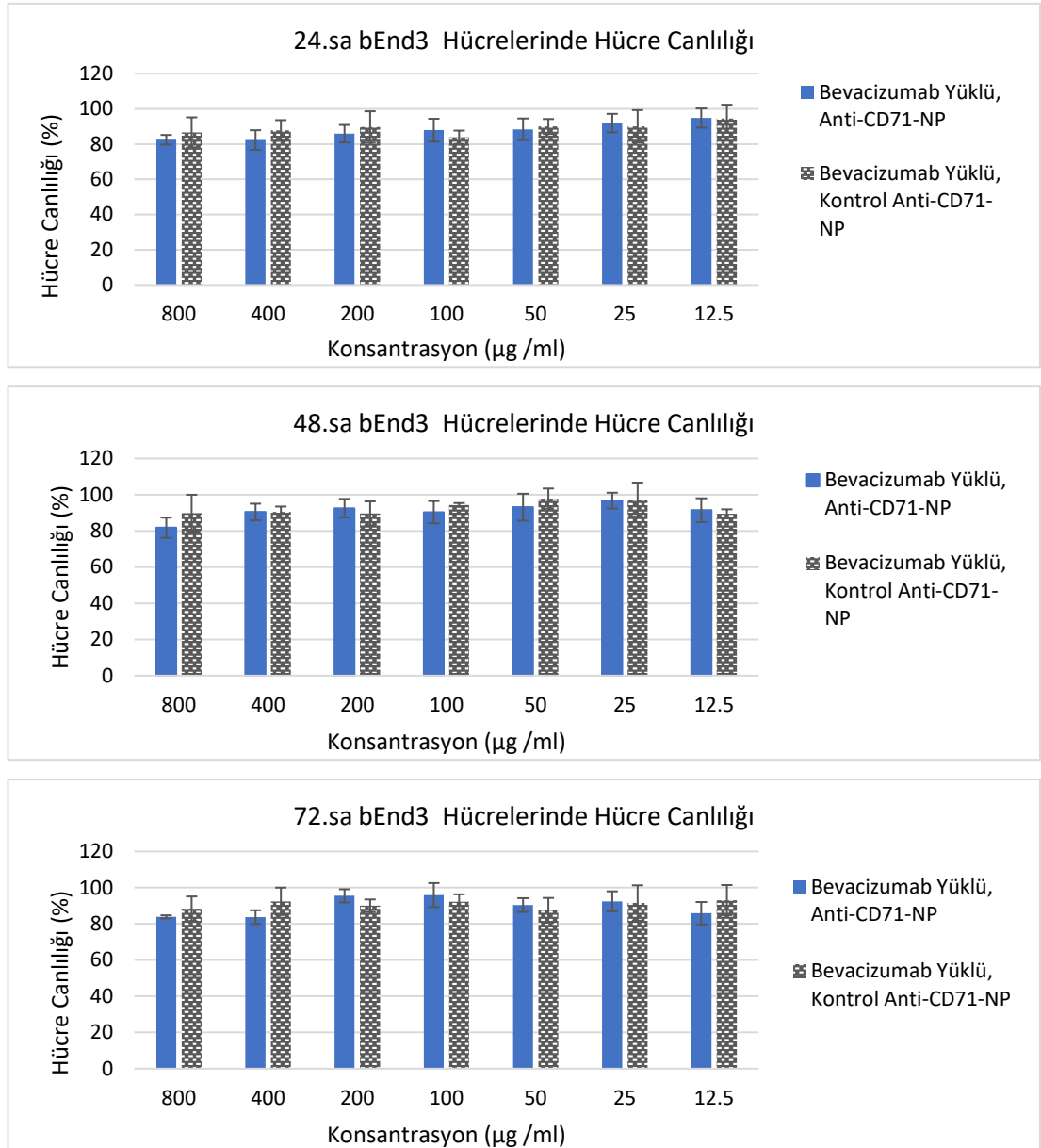
Şekil 4.37. hCMEC/D3 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine nanopartiküllerin etkisi, (n=6)

BVZ yüklenmemiş aktif hedeflendirilmiş ve kontrol antikorunu konjuge edilmiş nanopartiküllerin U87 hücreleri üzerindeki sitotoksiteleri araştırılmış ve % hücre canlılığının 24, 48 ve 72. saatlerde %80'in üzerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.38).

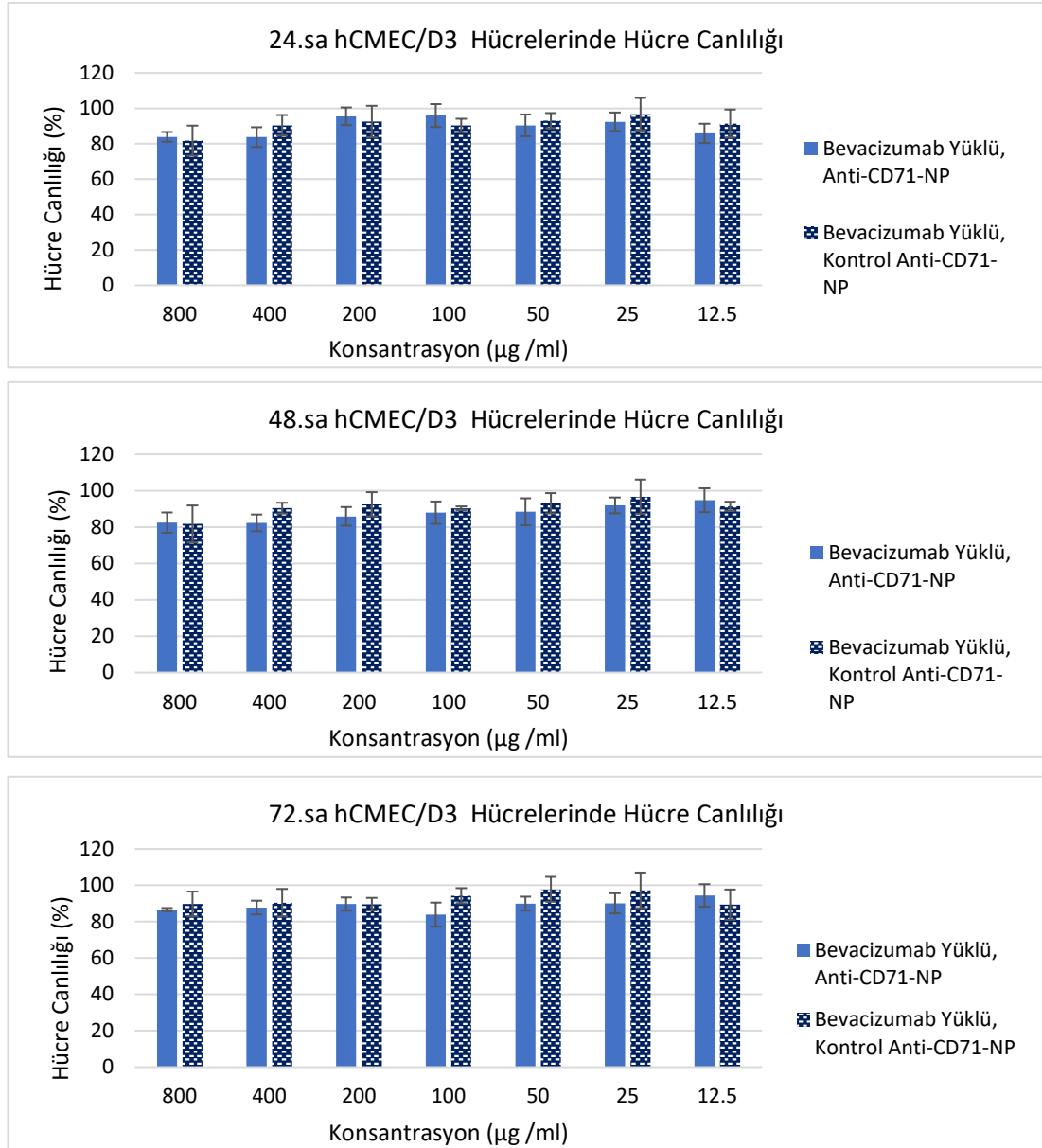


Şekil 4.38. U87 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine nanopartiküllerin etkisi, (n=6)

BVZ yüklü ve yüklü olmayan nanopartiküllerin bEnd.3 ve hCMEC/D3 hücreleri üzerine sitotoksiteleri değerlendirildiğinde, 24, 48 ve 72. saatlerde, denenen konsantrasyonlarda, hücre canlılığının %80'in altına düşmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.39, Şekil 4.40). PLGA nanopartiküllerinin sitotoksite verileriyle uyumlu olduğu yapılan ek modifikasyonların beyin endotel hücrelerine ek bir toksisite göstermediği belirlenmiştir [102, 103].



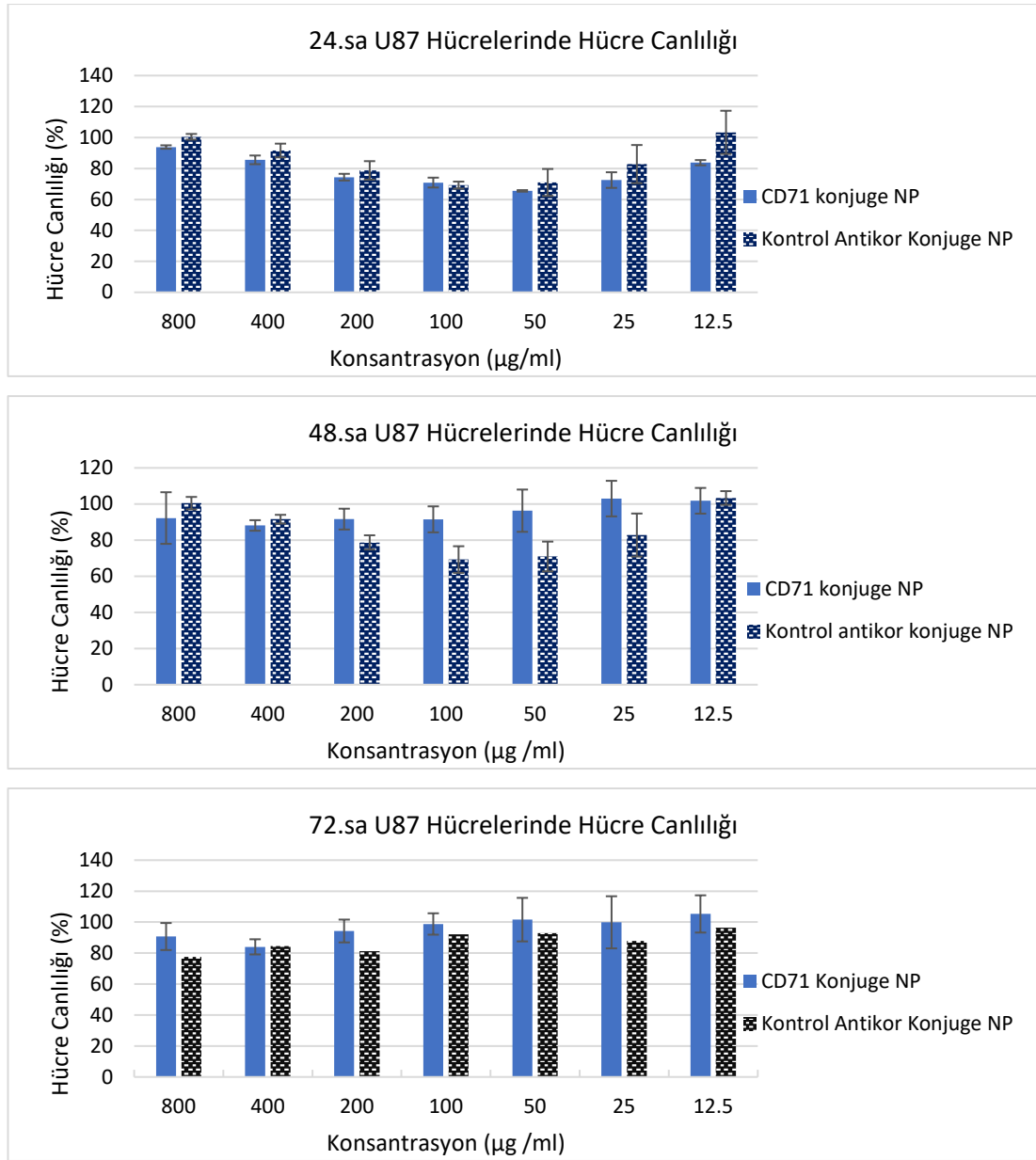
Şekil 4.39. bEnd.3 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine, Bevasizumab yüklü nanopartiküllerin etkisi, (n=6)



Şekil 4.40. hCMEC/D3 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine, Bevasizumab yüklü nanopartiküllerin etkisi, (n=6)

BVZ yüklü nanopartiküllerin, U87 hücrelerinin % hücre canlılığı üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, 24.saatte 200, 100, 50 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında % hücre canlılığı % 80'in altına düşmüştür (Şekil 4.41). 48.saatte yalnızca kontrol antikör konjuge nanopartikül gruplarında % hücre canlılığı % 80'in altında düşerken, 72.saatte ise yalnızca 800 µg/ml kontrol antikör konjuge nanopartikül grubunda hücre canlılığı % 80'in altındadır. Ancak, konsantrasyonlar ile

% hücre canlılığı arasındaki ilişki istatistiksel olarak incelenmiş ve anlamlı bulunmamıştır ($P > 0,05$).

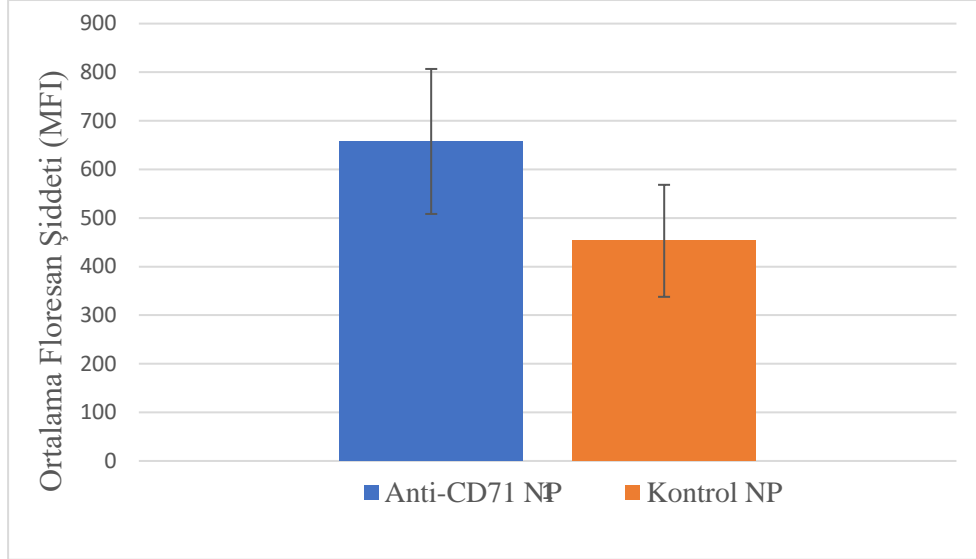


Şekil 4.41. U87 hücrelerinin hücre canlılığı üzerine, Bevasizumab yüklü nanopartiküllerin etkisi, (n=6)

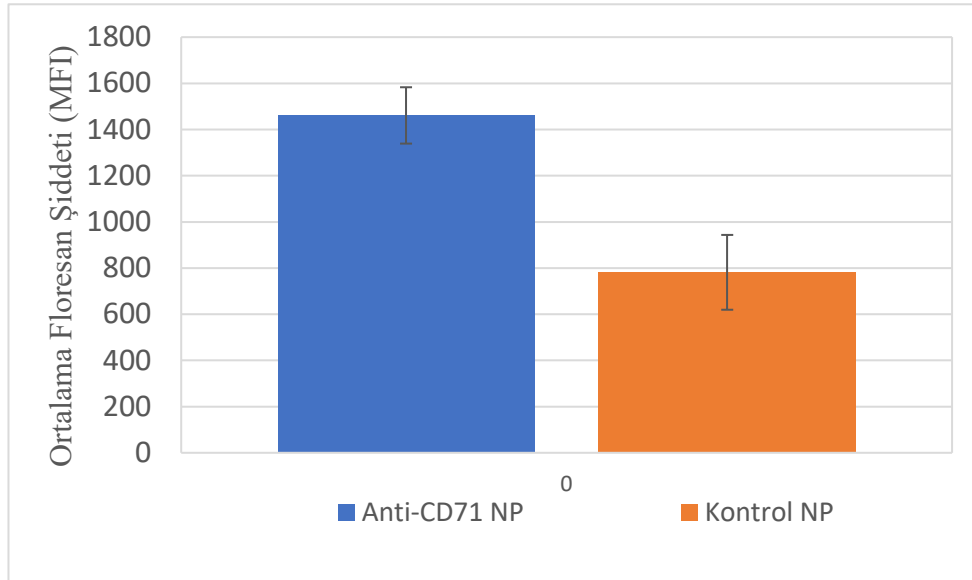
4.6.2. Hücre İçine Alım Çalışmaları

Hücre içersine alım çalışmalarında bEnd.3 ve hCMC/D3 hücreleri ile çalışılmıştır. Boya yüklenmiş Anti-CD71 NP ve Kontrol NPLerin, MFI değerleri, akım sitometri yöntemi ile karşılaştırılmıştır. hCMC/D3 ve bEND.3 hücreleri üzerinde Anti-

CD71 NP ve Kontrol NP ile gerçekleştirilen hücre içine alım çalışmalarının sonucu Şekil 4.42 ve Şekil 4.43'te gösterilmiştir. Ortalama floresan şiddeti ölçümlerine göre, hedeflendirilmiş olan nanopartiküller hücre içerisine daha fazla girmiştir.

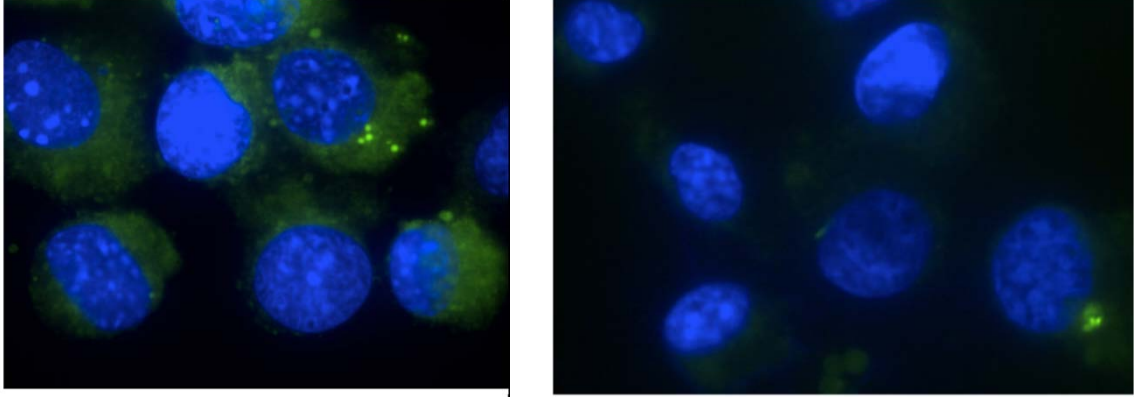


Şekil 4.42. Hazırlanan floresan işaretli Anti-CD71 NP ve Kontrol NPlerin bEnd.3 hücrelerine uygulanmasının ardından belirlenen pozitif hücrelerin floresan yoğunluklarının karşılaştırılması ($P < 0,05$), ($n=6$).



Şekil 4.43. Hazırlanan floresan işaretli Anti-CD71 NP ve Kontrol NPlerin hCMEC/D3 hücrelerine uygulanmasının ardından belirlenen pozitif hücrelerin floresan intensitelerinin karşılaştırılması ($P < 0,05$), ($n=6$).

Hücre içine alım çalışmalarında floresan mikroskobu ile gerçekleştirilen çalışmada, mavi ile gösterilen hücre çekirdeklerinin etrafında, hücre içerisine girmiş olarak görülen FITC işaretli nanopartiküller görülmektedir. Kontrol grubunda ise, FITC ışması hücrelerin içerisinde ya da etrafında gözlenmemektedir (Şekil 4.44).



Şekil 4. 44. Anti-CD71 NP (solda) ve Kontrol NPLerin (sağda) bEnd.3 hücrelerinde hücre içine alımlarının floresan mikroskobu görüntüsü (Mavi= DAPI ile işaretlenmiş hücre çekirdeği, Sarı=Anti-CD71 ile hedeflendirilmiş nanopartiküller) (n=6).

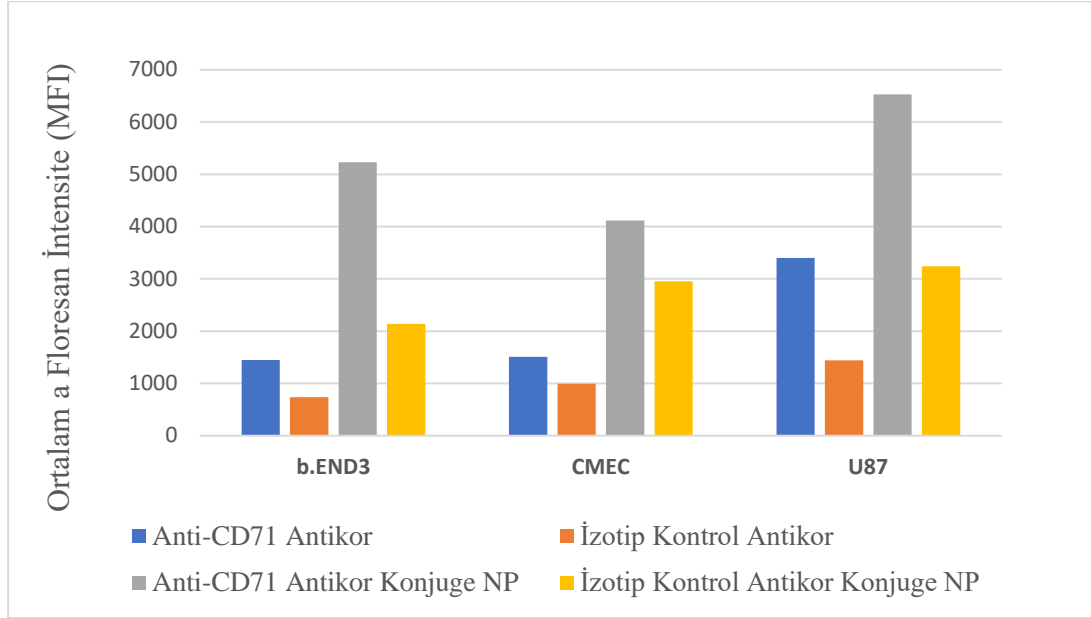
4.6.3. Antikor-Reseptör Bağlanma Testleri

b.END3, hCMEC/D3 ve U87 hücreleri ile gerçekleştirilen antikor-reseptör etkileşimi çalışmalarında, akım sitometri analizlerinin verileri toplu olarak Şekil 4.45'te gösterilmiştir.

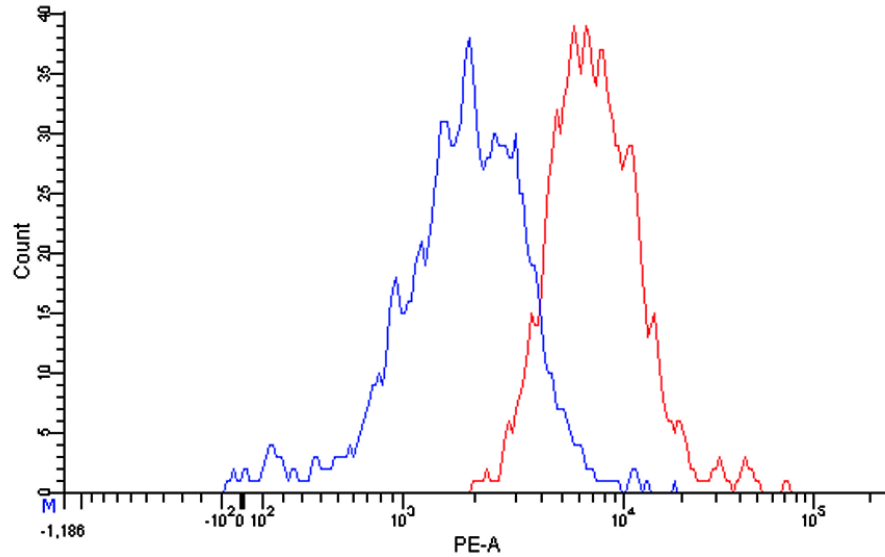
Akım sitometri analizlerine göre, fare Anti-CD71 konjuge edilmiş (kırmızı) ve İzotip kontrol antikorunu konjuge edilmiş (mavi) nanopartiküllerin bEnd.3 hücre reseptörlerine bağlanmaları karşılaştırıldığında, Anti-CD71 konjuge partiküllerin grafiğin daha sağında yer alması dolayısı ile, kontrol antikorunu konjuge edilmiş nanopartiküllere göre reseptörlere daha fazla bağlandığı görülebilir (Şekil 4.46).

Şekil 4.47 ve Şekil 4.48'de görülen akım sitometri analizleri, hedeflendirilmiş ve kontrol antikorunu konjuge edilmiş nanopartiküllerin CMEC ve U87 hücrelerinin reseptörlerine bağlanmalarını göstermektedir. Bu iki hücre hattı insan hücre hattı olduğu için, aktif hedeflendirme için insan Anti-CD71 antikorunu kullanılmıştır. İnsan anti-CD71 antikorunu farede üretildiği için, sekonder antikor APC boyası konjuge

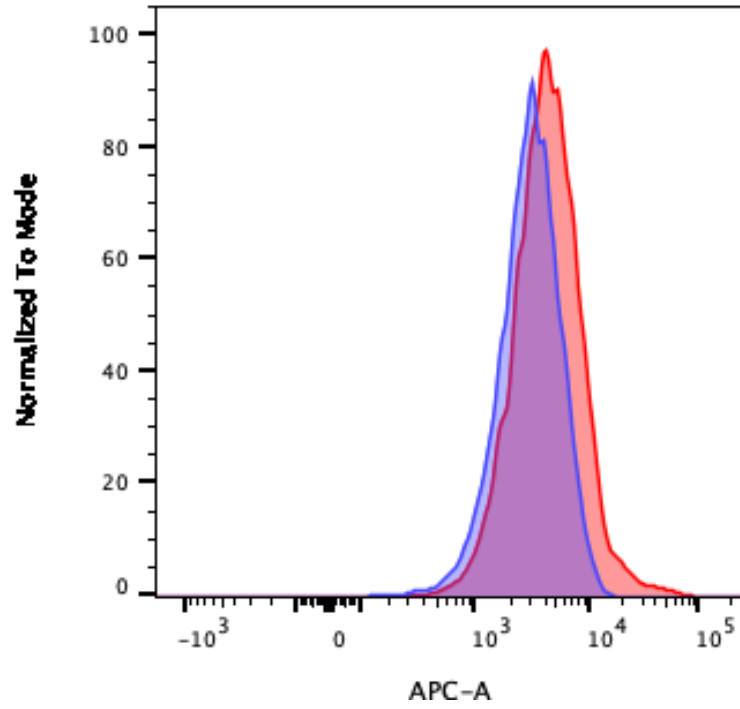
(Biolegend) Anti-fare antikorü olarak belirlenmiştir. Kırmızı renk ile ifade edilen aktif hedefleme antikorü konjuge edilmiş nanopartiküller, mavi ile gösterilen kontrol antikorü konjuge edilmiş nanopartiküllere göre hücre reseptörlerine daha fazla bağlanarak, grafikte daha sağda yer almıştır.



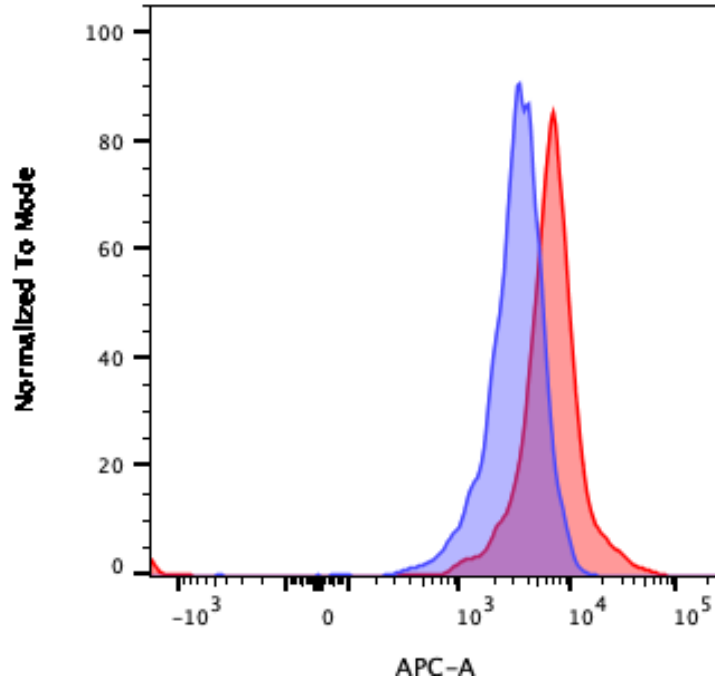
Şekil 4.45. bEnd.3, hCMEC/D3 ve U87 hücrelerine Anti-CD71 ve izotip kontrol antikorların bağlanması, (n=3)



Şekil 4.46. Fare Anti-CD71 konjuge edilmiş (kırmızı) ve izotip kontrol antikorü konjuge edilmiş (mavi) nanopartiküllerin BEnd.3 hücrelerinin reseptörlerine bağlanmasını gösteren akım sitometri analizi, (n=3)



Şekil 4.47. İnsan Anti-CD71 konjuge edilmiş ve İzotip kontrol antikorunu konjuge edilmiş partiküllerin hCMEC/D3 hücrelerinin reseptörlerine bağlanmasını gösteren akım sitometri analizi, (n=3)



Şekil 4.48. İnsan Anti-CD71 konjuge edilmiş (kırmızı) ve İzotip kontrol antikorunu konjuge edilmiş partiküllerin (mavi) U87 hücrelerinin reseptörlerine bağlanmasını gösteren akım sitometri analizi, (n=3)

4.6.4. Transitöz Çalışmaları

İn vitro KBB modellerinin oluşturulması için transwell sistemi kullanılmış ve hücre hatlarına özel birer adet transwellin insert kısmına ekilen bEnd.3 ve hCMEC/D3 hücrelerinin TEER ölçümleri 10 gün süre ile takip edilmiştir (Şekil 4.49). İn vitro KBB bütünlüğe ulaştığında, TEER ölçümleri bEnd.3 ve hCMEC/D3 hücreleri için sırasıyla 200 ve 60 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ sabit değerlere ulaşmıştır (Şekil 4.50). TEER ölçümlerinin sabitlenmesinden sonra, transitöz çalışmaları sonucunda, apikal yüzeye (insert) eklenen nanopartiküllerin içerisine enkapsüle edilen BVZ alt kompartman olan basolateral kompartmandan tayin edilmiştir.



Şekil 4.49. 6 kuyucuklu transwell görüntüsü, insertlere bEnd.3 hücreleri ekilmiş ve DMEM eklenmiş transwell görüntüsü, (n=3)

bEnd.3 ve CMEC hücreleri ile yapılan transitöz çalışmalarında BVZ tayininde kullanılan elisa kit yönteminde, kalibrasyon çözelti konsantrasyonları: 500 - 250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,7 - 7,8 - 3,9 - 1,95 ng/ml olarak belirlenmiştir. Her iki hücre hattı için de Transwell'in apikal kısmından, her bir kuyucuk başına 8,3 μg BVZ taşıyan nanopartikül grupları, 1,5 ml besiyerinde disperse edilerek uygulanmıştır. Nanopartiküllerin insert kısmına eklenmesinden 24 saat sonra, basolateral bölgedeki besiyerleri (2,5 ml) alınmış ve ELISA ile analiz edilmiştir.



Şekil 4.50. Transwell içindeki insertlere ekilmiş olan b.End.3 hücrelerinde TEER ölçümü görüntüsü

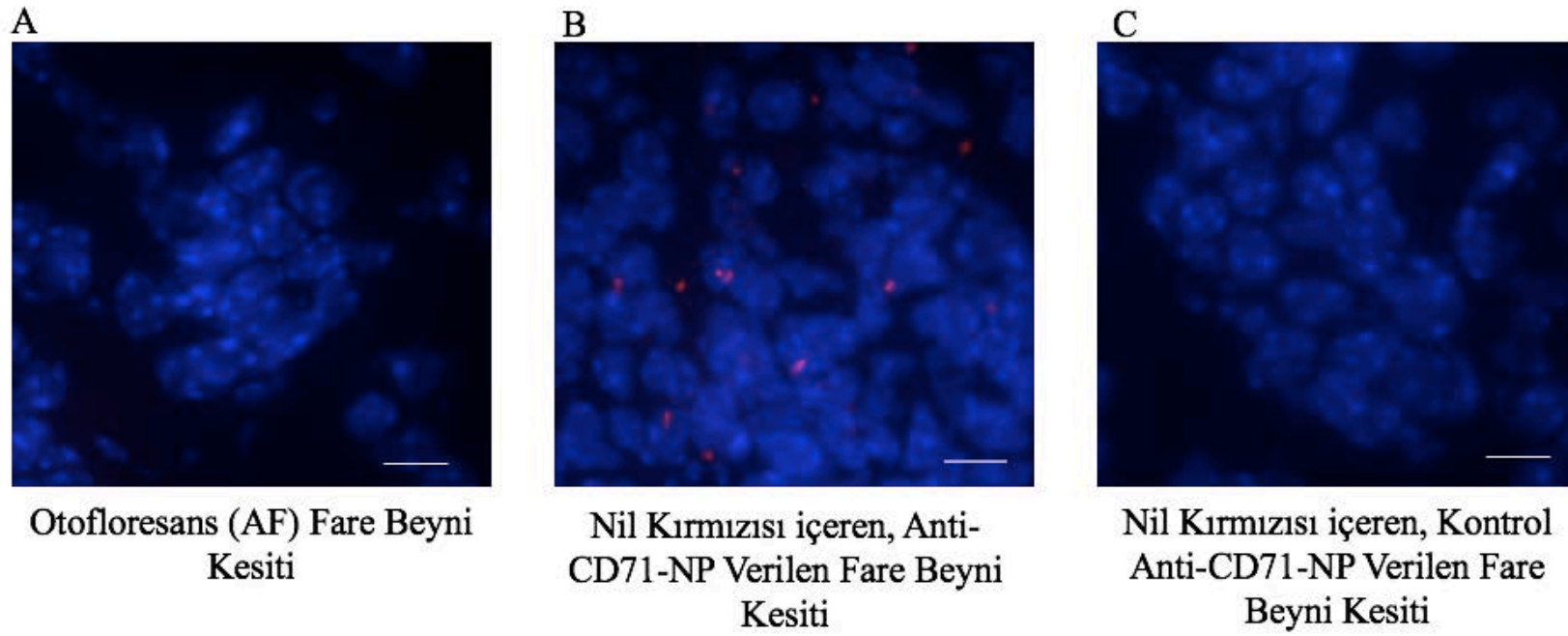
bEnd.3 hücreleri ile yapılan çalışmada, ELISA analizi sonucunda, anti-CD71 antikoru ile hedeflendirilmiş ve BVZ yüklü (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nanopartiküllerin kullanıldığı transwell'in basolateral kısmından alınan besiyerinde ortalama 2,01 ng/ml BVZ dedekte edilmiş ve kontrol antikoru olan IgG konjuge ve BVZ yüklü nanopartiküllerin eklendiği insertin basolateral bölgesindeki besiyerinde ise BVZ tayin edilememiştir.

CMEC hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmada ise, yine 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BVZ içeren nanopartiküllerin apikal kısma eklenmesi sonrasında, basolateral kısımdan elde edilen besiyeri, elisa kit ile tayin edilmiş ve bir kuyucuğun basolateral kısmında ortalama 2,9 ng/ml BVZ tayin edilmiştir. Hedeflendirilmemiş nanopartiküllerin taşıdığı BVZ ise, kendi basolateral kısımlarından tayin edilememiştir. Bu durum, transitoz deneyi ile, in vitro ortamda, geliştirilen hedeflendirilmiş sistem ile BVZ'nin KBB'yi başarı ile geçtiği ve besiyerinden tayin edilebildiğini göstermektedir ancak basolateral kısımdan tayin edilen BVZ yüzdesi oldukça düşüktür.

4.7. İn vivo Çalışmalar

4.7.1. Beyne Hedeflendirilmiş Nanopartiküllerin, Kan Beyin Bariyerini Geçişlerinin in vivo Çalışmalarla Gösterilmesi

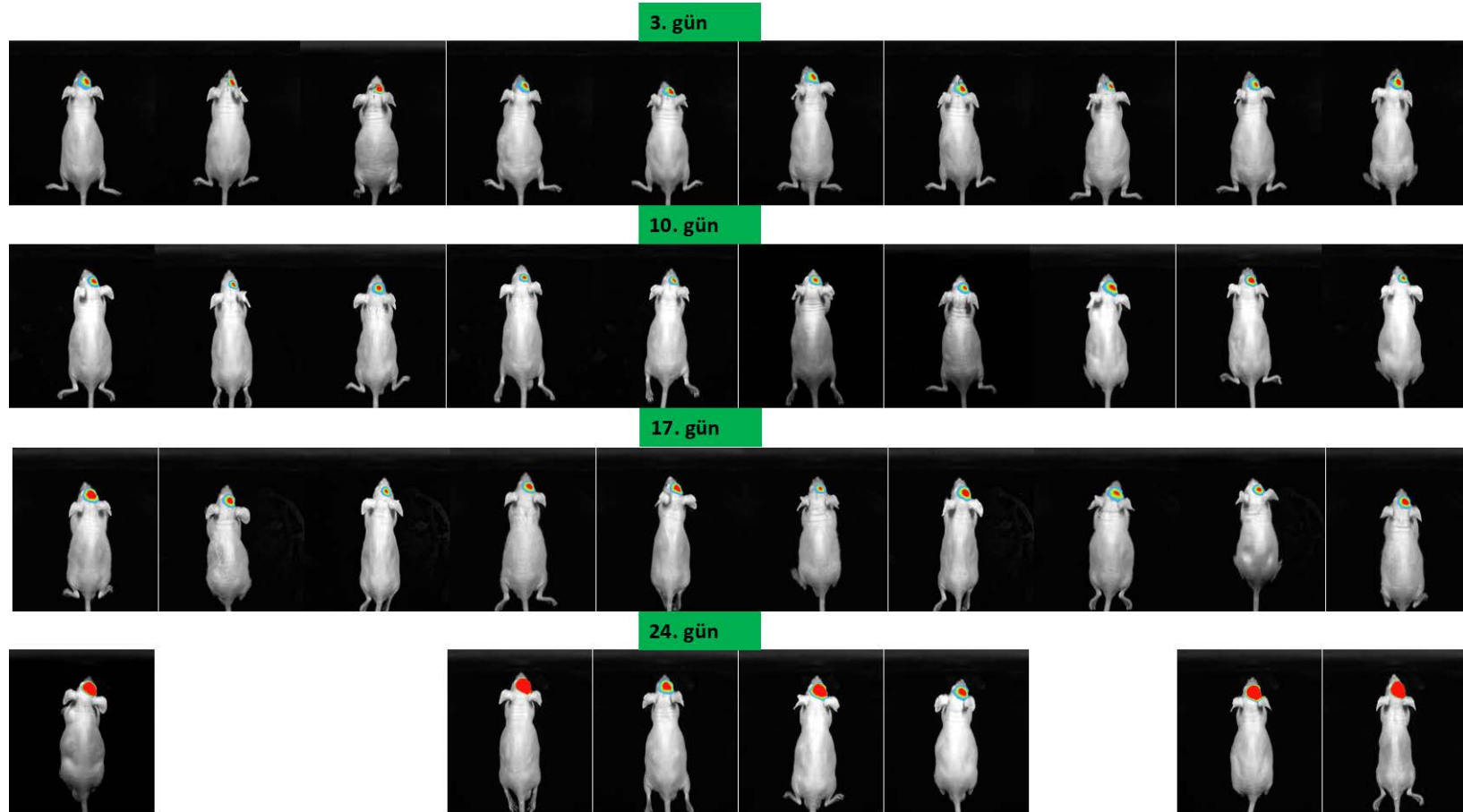
Şekil 4.51 ile gösterilen, birinci resimdeki fare beyni kesiti, işlem yapılmamış olan fareye aittir. Ortada bulunan resimde ise, nil kırmızısı yüklü hedefli nanopartiküllerin KBB'yi aşarak, fare beynine ulaştığı, kesit üzerinde gösterilmiştir. Sağdaki resim, kontrol antikorlu konjuge ve nil kırmızısı yüklü nanopartiküllerin verildiği farelerdir. Bu resimde de, otofloresan (Autofluorescent:AF) fare gibi ışımaya görülmemiştir. Bu durum, nil kırmızısı boyasının, geliştirilen aktif hedeflendirilmiş yeni ilaç taşıyıcı sistemle başarı ile beyne gönderildiğini ve KBB'nin aşıldığını göstermektedir.



Şekil 4.51. Nil kırmızısı içeren hedefli ve kontrol nanopartikül gruplarının farelere iv olarak verilmesinden 16 saat sonra alınan beyin kesitlerinin floresan mikroskop görüntüsü, (n=3).

4.7.2. İn vivo Glioma Modelinin Geliştirilmesi

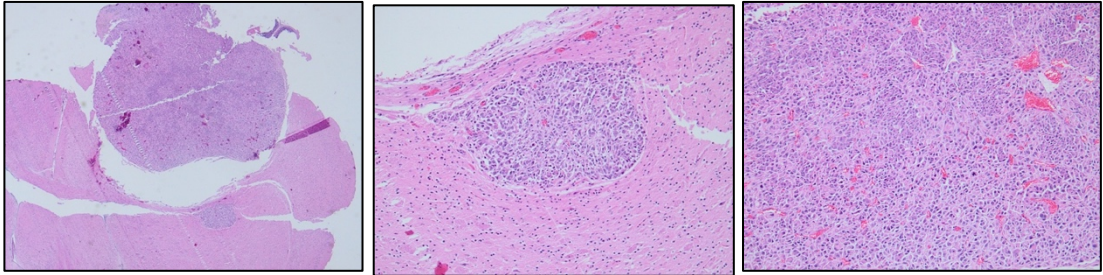
Daha önce pilot çalışmalarla, farelere ksenograf olarak denenen GBM modeli ile, in vivo görüntüleme cihazından sinyal alınmış ve lusiferaz U87 hücrelerinin fare bedeninde görüntülenebildiği belirtilmişti. Bu çalışmaların devamında, ortotopik GBM modeli geliştirilmiştir. 10 adet nude fare beynine ekilen lusiferaz U87 glioma hücreleri, iv lusiferin uygulaması ile yaklaşık bir ay boyunca takip edilmiştir. Her uygulamada, in vivo görüntüleme cihazı ile fare beyinlerindeki sinyaller takip edilmiş, hücrelerin çoğalarak tümöre dönüşmesi izlenmiştir. Haftada bir alınan görüntülerle, 10 adet nude farenin, tümör gelişim aşamaları değerlendirilmiş, davranışları incelenmiştir. Farelerin 24.gün dolaylarında hayat kalitelerinin düşmesi üzerine, fareler etik ilkelere göre sakrifiye edilmiş ve tümörler çıkarılarak patolojik incelemeye tabii tutulmuştur. Şekil 4.52'de görüldüğü üzere, 3., 10., 17. ve 24.gün alınan görüntülerde her hafta sinyal giderek artmış ve tümör gelişimi tamamlanmıştır.



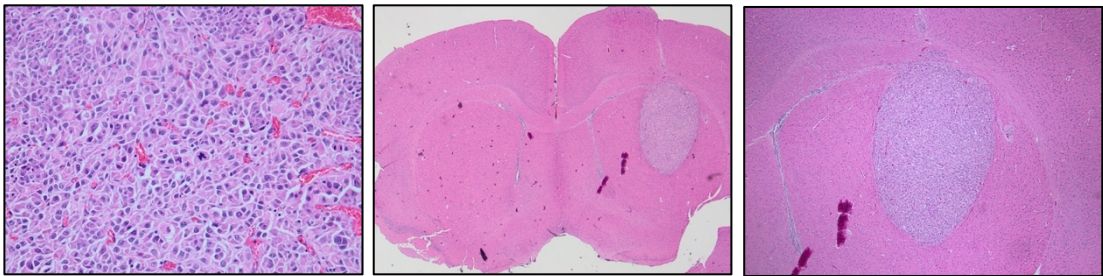
Şekil 4.52. Nude farelerin beynine ekilen U87-LUC hücrelerinin, in vivo görüntüleme cihazı ile haftalık sinyal takibi görüntüleri

Tümörlerin Histopatolojik İncelemeleri

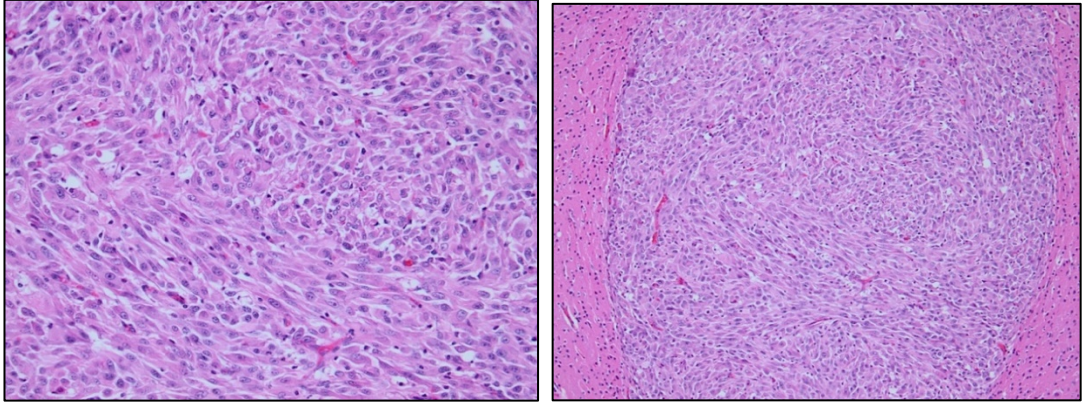
Şekil 4.53, Şekil 4.54 ve Şekil 4.55'te görülebileceği üzere, geliştirilen tümör modeli sonrasında sakrifiye edilen farelerin tümör gelişimleri patolojik olarak da doğrulanmıştır (n=3). U87 hücrelerinin nude farelerde oluşturduğu tümör dokusuna ait Hematoksilen-Eozin Boyamaları aşağıda verilmiştir. U87 hücrelerinin beyin dokusunda çoğaldıkları ve tümör oluşturdukları görülmektedir.



Şekil 4.53. U87 hücrelerinin nude farelerde oluşturduğu tümör dokusuna ait Hematoksilen-Eozin Boyamaları (1.Fare)



Şekil 4.54. U87 hücrelerinin nude farelerde oluşturduğu tümör dokusuna ait Hematoksilen-Eozin Boyamaları (2.Fare)

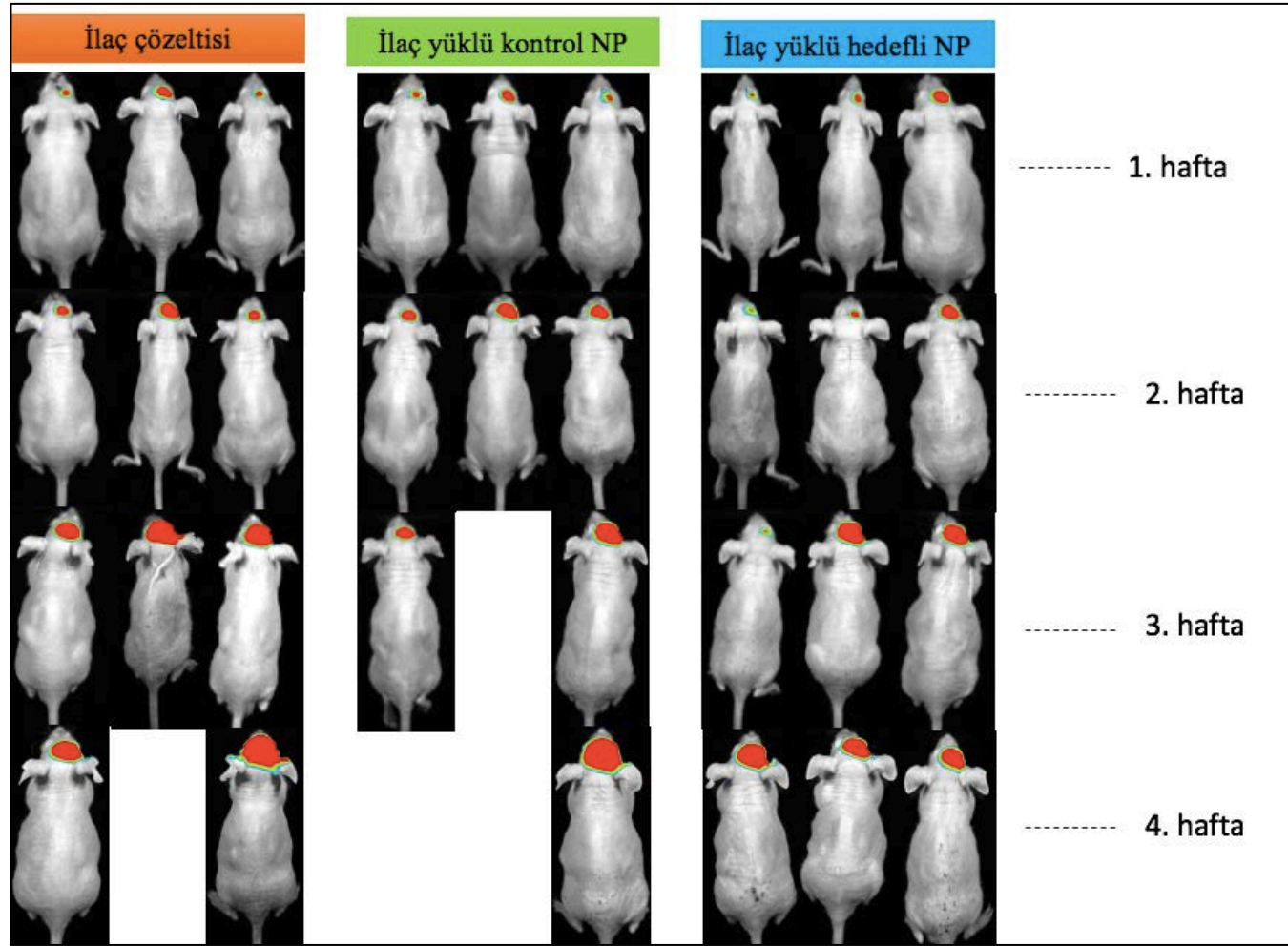


Şekil 4.55. U87 hücrelerinin nude farelerde oluşturduğu tümör dokusuna ait Hematoksilen-Eozin Boyamaları (3.Fare)

4.7.3. İn vivo Glioblastoma Multiforme Modelinde BVZ Yüklü

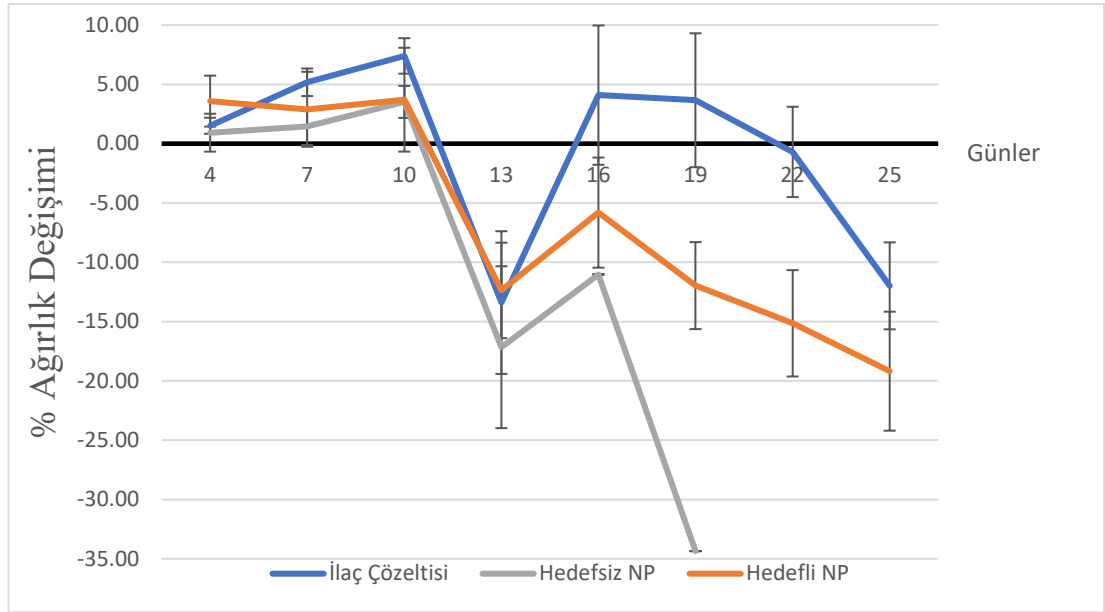
Hedeflendirilmiş Nanopartiküllerin Etkinliklerinin İncelenmesi

Tümör modelinin geliştirildiği farelerde, ilaç gruplarının farelere iv olarak uygulanması sonrasında ilk fare ölümü, beyne hücrelerin ekilmesinden 15 gün sonra, kontrol antikoruna konjuge edilmiş BVZ yüklü nanopartiküllerin iv olarak verildiği grupta olmuştur. 17. Günde de ilaç çözeltisinin verildiği grupta 2.fare ölümü gerçekleşmiştir. 4.Haftada ise kontrol antikoruna konjuge edilmiş BVZ yüklü nanopartiküllerin grubundaki 3 adet farenin tamamı ölmüş ya da davranışsal durumları göz önüne alınarak kurban edilmiştir. Şekil 4.56'da görüldüğü üzere; 3.haftada hedefsiz nanopartikül grubu ile başlayan fare ölümleri, ilaç çözeltisi grubu ile devam etmiş ve 4.haftada tüm farelerin hayatta kaldığı grup, aktif hedeflendirilmiş ilaç yüklü partiküllerin verildiği grup olmuştur. İlaç yüklü hedeflendirilmiş nanopartiküllerin verildiği gruptaki 3 fare, in vivo görüntüleme cihazı ile tümör ışımalarının takip edildiği süre boyunca sağ kalmıştır. 5. Hafta da yaşamaya devam eden fareler, davranışsal değişiklikler gösterdiği ve hayat kaliteleri düştüğü için kurban edilmiştir.



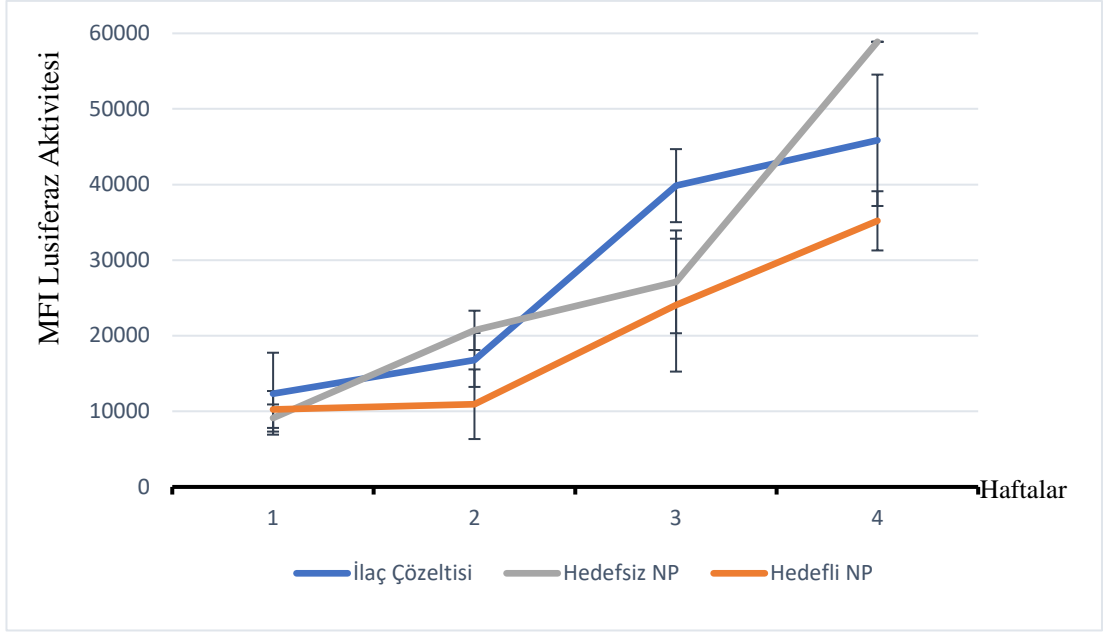
Şekil 4.56. Geliştirilen in vivo Glioblastoma Multiforme modelinde, ilaç gruplarının tümör büyümelerinin izlenmesi

Şekil 4.57 ile gösterilen farelerdeki % ağırlık değişimi incelendiğinde, 10.güne kadar farelerin ağırlıklarının arttığı, ancak 13.günden itibaren yaklaşık %15'e varan oranlarda ağırlık kaybı yaşadıkları görülmektedir. 15. Günde ağırlıkları bir miktar düşerken, 22.gün ve sonrasında tüm fare gruplarında ciddi bir % ağırlık azalması görülmektedir.



Şekil 4.57. İn vivo Glioblastoma Multiforme modelinde ilaç gruplarının uygulanması sonrası farelerin % ağırlık değişimi

Farelerin tedavi süresince, haftalık olarak tümör ışımaları in vivo görüntüleme cihazı ile takip edilmiştir. Şekil 4.58'de görüldüğü üzere; ilaç çözeltisi ve hedefsiz nanopartikül gruplarına ait MFI lusiferaz ışımaları artarak devam ederken, hedefli nanopartiküllere ait olan tümör ışımalarındaki artış, diğer iki gruba göre daha azdır. BVZ, mekanizması gereği tümör büyümesini yavaşlatıcı/durdurucu etkiye sahip olduğu için, tümör büyümesinin diğer iki gruba göre daha yavaş devam etmesi, hedeflenen bir durumdur.



Şekil 4.58. İn vivo Glioblastoma Multiforme modelinde ilaç gruplarının uygulanması sonrası MFI Lusiferaz Aktivitesi

5. TARTIŞMA

5.1. Nanopartiküllerin Ara Molekül Sentezi ile Hazırlanması, Aktif Hedeflendirilmesi ve Karakterizasyonu

PLGA nanopartiküller birçok farklı yöntem ile hazırlanabilmektedir. Ancak, protein yapılı maddelerin enkapsülasyonu sırasında dikkat edilmesi gereken parametreler bulunmaktadır. Tez kapsamında ilaç etkin maddesi olarak kullanılan BVZ, mAb'dır. MAbların formülasyonu sırasında stabiliteyi dolayısı ile etkinliklerini korumak gerekmektedir. Protein yapısı ile konsantrasyonu, sıcaklık, ışık maruziyeti, yardımcı maddeler, pH değişimleri ve çalkalama/sallama/karıştırma gibi mekanik işlemler antikorların katlanmalarını/ yapılarını değiştirebilmekte, geri dönüşü olmayan agregasyona neden olabilmektedir. Agregasyon, proteinlerin fiziksel stabilitesi ile ilgili en önemli problemdir çünkü protein agregatları immünojenisiteye neden olmaktadır.

MAblar, diğer terapötik proteinler gibi, formülasyon, depolama ve taşınma gibi durumlarda sıcaklığa maruz kalabilmektedir. Yüksek sıcaklık maruziyeti ise proteinin konformasyonunda değişikliklere yol açarak agregasyonuna neden olmaktadır. Sıcaklık yükseldikçe agregasyon hızlanmaktadır (100). Bu sebeple, tez kapsamında nanopartiküllerin hazırlama metoduna karar verilirken, öncesinde BVZ için ön stabilite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, BVZ'nin 25 mg/ml konsantrasyonundaki çözeltisinin sıcaklık artışına karşı partikül büyüklüğü, Zetasizer cihazının kademeli olarak sıcaklığı yükseltme programı ile değerlendirilmiştir. 60 °C ve 70 °C arasında 1 °C intervalde gerçekleştirilen sıcaklığa bağlı partikül büyüklüğü değerlendirme çalışmalarında; 61 °C ve 62 °C 'de BVZ ana piki gözlenebilmiş ancak 63 °C'de piklerde oluşan kaymanın gözlenmesi ile birlikte, 67 °C'de agregasyon tespit edilmiştir. 68 °C 'de ise, BVZ'in ana piki tamamen ortadan kaybolmuştur. T_{onset} değeri, proteinin geri dönüşsüz olarak deaktive olduğu sıcaklığı ifade etmektedir. Sıcaklık maruziyetine bağlı olarak değişen BVZ partikül büyüklüğü incelendiğinde T_{onset} değerinin 63 °C olduğu tespit edilmiştir. Nanoenkapsülasyon metodu, bu sıcaklık değerlerine ulaşılmayacak şekilde modifiye edilmiştir.

Benzer şekilde, BVZ önstabilite deneylerinde pH etkisi de incelenmiş ve ekstrem pH değerlerinde BVZ'nin agregate olduğu tespit edilmiştir. Sousa ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, farklı pH ortamlarında BVZ'nin konformasyonel değişimi incelenmiş ve termal stabilite verileri incelendiğinde pH 6, BVZ'nin yapısal stabilitesi için en uygun pH olarak belirlenmiştir. pH 8,9 ve 10'da ise BVZ biyoaktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (101). Tez kapsamında gerçekleştirilen analizler sonrasında, farklı konsantrasyonlarda ve farklı pH ortamlarında ölçülen antikora ait partikül büyüklüklerinin pH 6,2 – 7 arasında neredeyse değişime uğramazken, pH 3 gibi ya da pH 11 gibi ekstrem asidik ve bazik ortamlarda agregasyon gözlenmiştir.

Mekanik stres ise, protein konformasyonunu geri dönüşümsüz olarak bozan bir diğer faktör olup, tez kapsamında BVZ partikül büyüklüğüne etkisi incelenmiş ve 60 saniyeden fazla sonikasyonun agregasyona neden olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu veriler ışığında, BVZ'ın içerisine yükleneceği ilaç taşıyıcı sistemin hazırlanması metodu modifiye edilerek, stres koşullarından arındırılmıştır.

BVZ'nin PLGA-PEG nanopartiküller içerisine enkapsüle edilmesiyle, kanda kalış süresinin artırılması, hedeflenen bölgeye daha düşük dozda daha etkin tedavi sağlanması, tedavi süresince karşılaşılan yan etkilerin azaltılması amaçlanmıştır. Bu sistemlerin hazırlanmasında FDA tarafından kullanımı onaylanmış PLGA polimerlerinin, kanda kalış süresini artırılması için PEG ile konjuge edilmiş formları kullanılmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanma metodu, Csaba ve arkadaşlarının geliştirdikleri mekanik stres etkisi diğer yöntemlere göre daha az olan yöntemin modifiye edilmesi ile elde edilmiştir (93). Modifiye çözücü difüzyon tekniğine göre; organik faz hazırlandıktan sonra, az miktardaki sulu faz ile kısa süreli vorteks ile karıştırılmakta ve elde edilen emülsiyon da yüksek miktardaki polar faza (etanol) eklenmektedir. Manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirilen bu ekleme basamağı sonrasında nanopartiküllerin presipitasyonu gözlenmektedir. Bu fazın da su ile seyreltilmiş ve sonrasında organik faz uzaklaştırılmıştır. BVZ içeren nanopartiküllerin yüksek rpm değerlerinde santrifüj edilmesi, protein stabilitesine zarar vereceğinden dolayı, santrifüj basamağı için özel filtreli tüpler kullanılmıştır. Bu filtreli tüplerin por

açıklıkları 300 kDa olarak belirlenmiştir. Böylece, nanopartiküller içerisine yüklenmeyen BVZ, santrifüj sırasında filtreden aşağıya inerek ependorf içerisinde kalmış, nanopartiküller ise filtre içerisindeki yaklaşık 50 ul'lik su içerisinde kalarak agrege olmamışlardır.

Nanopartiküllerin aktif hedeflendirilmesi çalışmalarında, kan-beyin endotelinin luminal tarafında yüksek oranda eksprese olduğu bilinen Tf/CD71 reseptörleri hedef alınarak, bu reseptöre spesifik antikörlerin nanopartiküllere konjugasyonu sağlanmıştır. Literatür çalışmalarında, aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin TfR1 reseptörü sayesinde reseptör aracılı endositoz ile KBB'yi geçtiği gösterilmiştir (102-105). Ayrıca Anti-CD71 antikoru ile konjuge edilen nanopartiküllerin de seçici olarak TfRlere bağlanarak, reseptör aracılı endositoz ile hücre içerisine alındığı gösterilmiştir (106-108). İlaç taşıyıcı sistemin aktif hedeflendirilmesinde, BVZ taşıyan nanopartiküllerin reseptör aracılı endositoz ile KBB'yi aşması ve etkin madde salımını gerçekleştirmesi amaçlanmıştır. Bevacizumab'ın etki mekanizması dikkate alındığında, BVZ'nin nanopartiküller aracılığı ile KBB'yi geçtikten sonra tümör mikroçevresinde salınması, tümör hücreleri tarafından salgılanan VEGF'e bağlanarak inhibe etmesi, dolayısı ile tümör damarlanmasını/büyümesini durdurması/yavaşlatması öngörülmüştür.

Tez kapsamında bEnd.3 ve hCMEC/D3 hücreleri ile çalışılmış ve dolayısı ile nanopartiküllere konjuge edilen Anti-CD71 antikörleri hücre kültürü çalışmalarına göre seçilmiştir. Fare beyin endotelial hücreleri olan bEnd.3 hücreleri ile çalışılırken, fareye spesifik anti-CD71 antikoru ve kontrol grubu nanopartiküllerine, bu antikora özel kontrol antikoru (IgG) konjuge edilirken, insan beyin endotelial hücreleri olan hCMEC/D3 hücreleri ile çalışılırken ise insana spesifik Anti-CD71 antikörleri kullanılmış ve bu grubun kontrol grubu nanopartiküllerine de insan anti-cd71 antikoru özel kontrol antikoru (IgG) konjuge edilmiştir. Bu şekilde hücre hattına spesifik olan antikörün çalışıp çalışmadığı, hedefleyici olan antikör ile aynı yapıya sahip ancak reseptöre spesifik olmayan kontrol antikörleri ile denenmiştir.

Anti-CD71 antikörlerinin PLGA-PEG nanopartiküllerine konjugasyonu için literatür araştırması gerçekleştirilmiş ve konjugasyon basamağının ilaç taşıyıcı sistem

için en önemli basamak olduğu dikkate alınarak, en güvenilir yöntem seçilmiştir. Aktif hedeflendirme stratejilerinde, hedefleyici ligandın nanopartiküle adsorbe edildiği ya da hidrofobik/elektrostatik etkileşimler ya da biyotin-avidin kompleksi ile bağlandığı yaklaşımlar mevcuttur (109-111). Ancak adsorpsiyon seçeneğinde, ligandın kan dolaşımına girdikten sonra endojen proteinler ile yer değişimine uğrayabileceği bilinmektedir (112). Biyotin-avidin kompleksleri ise kovalent olmayan güçlü bağlardır ancak immünojenik reaksiyonlara neden olabilmektedirler (113). Tez kapsamında antikör-nanopartikül konjugasyonu için tercih edilen yöntem; tiyol fonksiyonel grupları ile maleimid uçları arasında gerçekleşen stabil tiyoeter bağlarının oluşturulmasıdır (114-116).

Karra ve arkadaşlarının çalışmasına göre; sentezledikleri OCA molekülü, antikör-nanopartikül kovalent bağı için ara molekül olarak kullanılmıştır. OCA amfifilik bir moleküldür ve oleik asite sisteinin polar grubunun eklenmesi ile elde edilmiştir. Bu molekülün bir ucu, PLGA matrisi içerisine lipofilik oleik zinciri ile bağlanmışken, diğer ucu yer alan polar grupları ise nanopartikülün yüzeyinde konumlanarak yüzeyin tiyol grupları ile fonksiyonelleştirilmesini sağlamıştır. Yüzeydeki tiyol grupları ise, maleimid ile aktive edilmiş antikörlerin kovalent bağlanması için önemlidir (94).

Tez kapsamında, OCA molekülü sentezlenmiş ve H-NMR ve UPLC-MS yöntemleri ile analiz edilerek sentez doğrulanmıştır. OCA molekülünün yüzey aktif madde özelliği, Yüzey Gerilimi Cihazı (Attensiyon) ile Wilhelmy Tablası ve Du Nouy Halkası yöntemleri kullanılarak test edilmiş ve OCA molekülünün artan konsantrasyonlarında yüzey geriliminin düştüğü tespit edilmiştir.

Nanopartiküllerin hazırlanması basamağında, OCA molekülü organik faza eklenmiştir. OCA'nın nanopartiküllerin yüzeyini fonksiyonelleştirdiği Ellman's analizi ile gösterilmiştir. Bu analiz için, OCA içeren ve içermeyen PLGA-PEG nanopartiküller hazırlanmış ve yüzeylerindeki OCA aktivitesi, yüzey sülfidril gruplarının kantitatif tayini ile tespit edilmiştir. OCA ile hazırlanan nanopartiküllerin yüzeyindeki sülfidril konsantrasyonu 192,408 $\mu\text{M}/\text{ml}$ olarak ölçülürken, OCA ile hazırlanmayan nanopartiküllerin yüzeyindeki sülfidril konsantrasyonu ise 2, 954 $\mu\text{M}/\text{ml}$ olarak ölçülmüştür. OCA molekülünün PLGA-PEG nanopartiküllerin yüzeyine bağlanarak,

yüzeylerini sülfidril grupları ile fonksiyonelleştirdiği Ellman's analizi ile gösterilmiştir. Bunun yanında, sülfidril grupları negatif yüklü gruplar olduğundan, OCA ile hazırlanan nanopartiküllerin, diğer nanopartiküllere göre yüzey yükünün de daha negatif olması gerekmektedir. Zeta potansiyel ölçümleri sonrasında OCA-NP için $-24,7 \text{ mV} \pm 2,5$ değeri elde edilirken, NP için $-16,8 \pm 3,9 \text{ mV}$ değeri ölçülmüştür. OCA molekülü, partikül büyüklüğü ve PDI ölçümleri açısından anlamlı bir fark yaratmamıştır.

OCA molekülü ile hazırlanan, dolayısı ile yüzeyleri tiyol grupları ile kaplanmış nanopartiküllere, antikörlerin kovalent olarak bağlanması önemli basamaklardan birisidir. Aktif hedeflendirme konjugasyonu için tiyol-maleimid bağı hedeflenmiştir. Hedefleyici antikörler maleimid aktive edici LC-SMCC maddesi ile 2 saat karışmaya bırakılmış ve bu sürede maleimid yapısı antikora amin ucundan bağlanmıştır. Santrifüj ile temizleme işlemlerinden sonra, OCA-NP ile maleimid aktive edilmiş antikörler gece boyu karışmaya bırakılmıştır. Böylece OCA molekülünün sülfidril ucu ile, antikörlerin maleimid ucu kovalent bağ gerçekleştirmiştir.

Antikörlerin kovalent olarak nanopartiküllere bağlanması, BCA analizi ile doğrulanmıştır. Aktifleştirilmiş antikörlerin nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olmadığını/tutunmadığını, kovalent olarak bağlandığını göstermek için, aktive edilmiş ve aktive edilmemiş antikörler OCA-NP ile inkübe edilmiş ve 24 saat sonrasında santrifüj edilerek süpernatanttaki antikör miktarı kantitatif olarak tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, maleimid aktivasyonu yapılmadan nanopartiküller ile inkübe edilen grubun süpernatantındaki antikör oranı % 90,96 iken, maleimid aktivasyonu işlemi gerçekleştirilmiş olan antikörlerin nanopartiküller ile inkübe edildiği grubun süpernatantındaki antikör oranı % 23,22 olarak belirlenmiştir. Bu durumda, maleimid aktivasyonu sayesinde antikörler nanopartikül yüzeyine çok daha fazla oranda tutunmuş ve aktif hedeflendirme sağlanmıştır.

Nanopartiküller hazırlandıktan ve aktif olarak hedeflendirildikten sonra, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri DLS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Boş OCA-NPlerin partikül büyüklüğü ve PDI değeri sırasıyla ortalama $130,7 \pm 5,8 \text{ nm}$ ve $0,114 \pm 0,034$ olarak ölçülürken, zeta potansiyel değeri $-18,1 \pm 3,5 \text{ mV}$ olarak ölçülmüştür. Bu partiküllere BVZ yüklendiğinde partikül büyüklüğü ve PDI değeri sırası

ile $160,7 \pm 7,0$ nm ve $0,191 \pm 0,012$ olarak belirlenirken, zeta potansiyel değeri $-26,4 \pm 7,1$ mV olarak ölçülmüştür. Hem BVZ yüklü hem de aktif olarak hedeflendirilmiş olan OCA-NPlerin ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerleri ise sırası ile $174,7 \pm 2,9$ nm ve $0,101 \pm 0,03$ olarak ölçülürken, bu nanopartiküllerin zeta potansiyel değerinin $-19,1 \pm 9,4$ mV olduğu tespit edilmiştir. BVZ yüklenmesi ve nanopartiküllerin aktif hedeflendirilmesi aşamalarında ortalama partikül büyüklüğü ve PDI değerinde artış gözlenirse de, 200 nm'ye kadar partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin, endositoz ile KBB'den geçebildiği literatürde gösterildiğinden (1, 2), bu artış ihmal edilmiştir. Zeta potansiyel değerleri ise, tüm gruplarda negatif kalarak, nanopartikül süspansiyonunun stabil olduğunu, agregasyona ortam sağlamadığını göstermiştir. Bu grupların morfolojileri AFM ve SEM yöntemleri ile incelenmiş ve partikül büyüklüğü dağılımlarının homojen olduğu tespit edilmiştir.

BVZ'nin nanopartiküllere yüklenmesi basamağında, farklı konsantrasyonlarda BVZ çözeltileri sulu faz olarak sisteme dahil edilmiş ve nanopartiküllerin agregasyonuna neden olmayacak maksimum konsantrasyonda BVZ çözeltisi nanopartiküllerin hazırlama metoduna dahil edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği %81 olarak tespit edilmiştir ve literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (117-121). BVZ'nin aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerden salım çalışmaları ise üç farklı pH değerinde gerçekleştirilmiştir: pH 6, pH 7,4 ve pH 10. BVZ'nin PLGA nanopartiküllerden salımı, polimerin degradasyonu, mAbın PLGA nanopartiküllerden difüzyonu, mAbın molekül büyüklüğü ve izoelektrik noktası gibi birçok faktöre bağlıdır. BVZ'nin izoelektrik noktası 8.3'tür ve bu değer üzerinde BVZ negatif yüklenmektedir. PLGA nanopartiküller de negatif yüklü oldukları için, 8,3'ün altındaki pH değerlerinde BVZ ile nanopartiküle arasında güçlü bir elektrostatik etkileşim olmakta ve bu durum, salım hızını düşürmektedir (118).

Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin kısa süreli stabiliteleri test edilmiş ve DLS yöntemi ile partikül büyüklükleri, PDI ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda başlangıç değerlerine (0.) göre partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri arasında 1., 7. ve 14. günlerde anlamlı bir fark yokken 30. günde anlamlı farklılık ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Hücre kültürü

çalışmalarına başlanmadan önce, nanopartiküllerin hücre kültürü ortamında süreye bağlı olarak agregasyonları da DLS yöntemi ile incelenmiş ve 72 saatte, hücre besiyeri içerisindeki nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüklerinde anlamlı bir değişim tespit edilmezken, 24 saatten sonra PDI değerlerinde anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0,05$).

5.2. Hücre Kültürü Çalışmalarında Aktif Hedeflendirilmiş Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin, Hücre İçine Alımlarının ve Transitozlarının Değerlendirilmesi

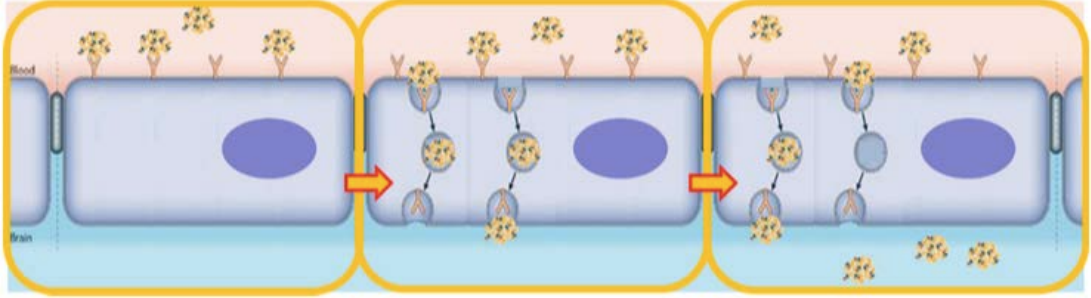
İlaç taşıyıcı sistemin hazırlanması, karakterizasyonu, ilaç yüklenmesi ve ilaç salımının incelenmesi sonrasında hücre kültürü çalışmalarına başlanmıştır. Bu aşamada, aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin KBB'yi geçmeleri üzerine çalışıldığı için, fare beyin endotel (bEnd.3) ve insan beyin endotel (hCMEC/D3) hücreleri ile çalışılmıştır. Öncelikle bu hücre hatları üzerine, ilaç yüklü ve hedeflendirilmiş/kontrol antikoru konjuge edilmiş nanopartiküllerin sitotoksiteleri araştırılmış ve 24,48 ve 72.saatte hücre canlılığının %80'in altına düşmediği tespit edilmiştir. U87 glioma hücreleri ile de sitotoksite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve BVZ yüklü olmayan partiküllerin bu hücreler üzerine önemli ölçüde sitotoksik olmadığı ancak, BVZ yüklü nanopartiküllerin U87 glioma hücrelerinin % hücre canlılığını diğer gruplara göre ciddi anlamda etkilediği görülmüştür. Şekil 4.41 ile gösterildiği üzere U87 hücrelerinde, 24.saatte ilaç yüklü nanopartiküllerden 50 µg/ml konsantrasyonda hedefli nanopartiküller, hücre canlılığını %60'a kadar düşürmüştür. 48.saatte hücre canlılıkları 24.saate göre artarken, 72.saatte %hücre canlılığı yeniden %80'in üzerine çıkmıştır. Bu durum, BVZ'nin ilk 24 saatte yüksek miktarda salınması ile, U87 hücrelerinin salgıladığı VEGF'e bağlanarak inhibe etmesi ve dolayısı ile hücre çoğalmasını yavaşlatması ile açıklanabilir. Sonrasında 48.ve 72.saatlerde ortama bağlı olarak BVZ aktivitesinin azalması (agregasyon) nedeni ile hücre canlılığı yeniden %80 üzerine çıkmış olabileceği düşünülmektedir. U87 hücrelerinin % hücre canlılığı ile uygulanan nanopartiküllerin konsantrasyonları arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

Aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin hücrelerin yüzeyindeki reseptörlere bağlanmaları, antikor bağlanma testleri ile gösterilmiştir. Bu testlerde; bEnd.3, hCMEC/D3 ve U87 hücreleri ile nanopartiküllerin etkileşimleri araştırılmış ve nanopartiküllere konjuge haldeki antikorlar, sekonder antikorlar ile işaretlenerek akım sitometri cihazı ile reseptör-antikor etkileşimleri incelenmiştir. Şekil 4.45 ile gösterilen grafikte; her üç hücre hattında da hem Anti-CD71 antikorunun hem de Anti-CD71 antikorunu ile konjuge olan nanopartiküllerin ortalama floresan şiddeti kontrol gruplarından daha fazladır ($p < 0,05$). Bu durum, antikorların nanopartiküllere konjuge edildiğinde de reseptörlere seçici olarak bağlandığını, aktif hedeflendirmenin in vitro ortamda doğru şekilde çalıştığını göstermektedir.

Nil kırmızısı yüklü aktif hedeflendirilmiş/kontrol antikorunu konjuge edilmiş nanopartiküllerin bEnd.3 ve hCMEC/D3 hücreleri içerisine alım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve ortalama floresan şiddeti incelendiğinde, hedeflendirilmiş nanopartiküllerin kontrol partiküllerine göre hücre içerisine daha fazla alındığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). İn vivo çalışmalarda GBM modeli fareler üzerinde geliştirileceği için, nanopartiküllerin bEnd.3 hücreleri içerisine alımları floresan mikroskop ile de incelenmiştir. Şekil 4.44 ile gösterildiği gibi; FITC boyası ile işaretlenmiş hedefli nanopartiküller, DAPI ile boyanmış hücre çekirdeklerinin etrafında, sitoplazmada konumlanırken, FITC ile işaretlenmiş kontrol antikorunu konjuge nanopartiküller ise hücrelerin içerisinde çok az görülmektedir.

Transitoz çalışmaları, ilaç taşıyıcı sistemlerin beyin penetrasyonunun incelenmesi için gerçekleştirilen çalışmalardır. İn vitro transitoz modellerinin KBB'den geçişi olabildiğince iyi yansıtması, in vivo deneyler öncesinde, ilaç taşıyıcı sistemin KBB'yi geçtiğinin gösterilmesi açısından önemlidir. BBB, dolaşımdaki kanı beyinden ayıran dinamik bir arayüzdür (84). Beyin endotel hücrelerinde TfR reseptörünün yüksek oranda eksprese edildiği bilinmektedir (122). Anti-TfR antikorlar ve bu antikorların konjuge edildiği ilaçlar da KBB'yi TfR-aracılı endositoz ile geçebilmektedir (Şekil 5.1)(12, 123, 124). Tez kapsamında da, TfR reseptörlerini eksprese ettikleri bilinen bEnd.3 ve hCMEC/D3 hücreleri ile in vitro transitoz modelleri oluşturulmuştur. Oluşturulan modeller monokültür modellerdir. Membran filtreli insert'ün üst kısmına

ekilen endotelial hücrelere BVZ yüklü hedeflendirilmiş ve kontrol antikoruna konjuge edilmiş nanopartiküller eklenmiş ve BVZ alt kompartmandan tayin edilmiştir.



Şekil 5.1. Reseptör aracılı endositozun şematik gösterimi (125)

bEnd.3 hücreleri ile yapılan çalışmada, ELISA analizi sonucunda, anti-CD71 antikoruna ile hedeflendirilmiş ve BVZ yüklü (50 µg/ml) nanopartiküllerin kullanıldığı transwell'in basolateral kısmından alınan besiyerinde ortalama 2,01 ng/ml BVZ ölçülmüştür. Her bir kuyucuğa, kontrol antikoruna olan IgG konjuge ve BVZ yüklü nanopartiküllerin eklendiği insert'ün basolateral bölgesindeki besiyerinde ise BVZ tayin edilememiştir.

CMEC hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmada ise, basolateral kısımdan elde edilen besiyeri, elisa kit ile tayin edilmiş ve bir kuyucuğun basolateral kısmında ortalama 2,9 ng/ml BVZ tayin edilmiştir. Hedeflendirilmemiş nanopartiküllerin taşıdığı BVZ ise, kendi basolateral kısımlarından tayin edilememiştir. Bu durum, transitoz deneyi ile, in vitro ortamda, geliştirilen hedeflendirilmiş sistem ile BVZ'nin KBB'yi geçtiği ve besiyerinden tayin edilebildiğini göstermektedir. Ancak ELISA yöntemi ile tayin edilen BVZ miktarının tayin alt sınırına yakın olması, BVZ'nin transitoz çalışması sırasında agregre olarak inaktive olması ya da hücre kültürü ortamında konformasyonunun değişerek inaktive olması ile açıklanabilir.

5.3. İn vivo Çalışmalarla Aktif Hedeflendirmenin Gösterilmesi

İn vitro çalışmalar ile BVZ'nin KBB'yi geçişi gösterildikten sonra, in vivo çalışmalarla da ilaç taşıyıcı sistemin KBB'yi geçtiği gösterilmiştir. Bu çalışma için 9 adet CD1 fare üç gruba ayrılmıştır (n=3): Nil kırmızısı yüklü hedefli nanopartiküller, nil kırmızısı yüklü kontrol antikoru ile konjuge edilmiş nanopartiküller, ve işlem yapılmayan fareler. Nil kırmızısı, floresan mikroskopta ışığa verdiği için ve nanopartiküller hazırlanırken solmadığı için tercih edilmiştir. Boya nanopartiküller içerisine yüklenmiş ve daha sonra hedeflendirme/kontrol antikoru ile konjuge edilmiştir. Bu çalışmada amaç; boya yüklenmiş hedefli/kontrol nanopartikül verilen fare grupları ile hiçbir işlem yapılmamış fare gruplarının beyin dokularındaki nil kırmızısı ışımalarını floresan mikroskop yöntemi ile karşılaştırmaktır.

Partiküller ilaç gruplarındaki farelere, iv yoldan verilmiştir. 16 saat sonunda, fareler sakrifiye edilerek perfüze edilmiştir. Perfüzyon sonrasında farelerin beyinleri çıkarılarak -80°C'de saklanmıştır. Daha sonra fare beyinlerinden 5 mikron kalınlığında kesitler alındıktan sonra DAPI ile boyanmış, görüntüleri alınıp floresan mikroskopta düzenlenmiştir. Şekil 4.51 ile gösterilen, birinci görüntüde fare beyni kesiti, işlem yapılmamış olan fareye aittir. Ortada bulunan görüntüde ise, nil kırmızısı yüklü hedefli nanopartiküllerin DAPI ile boyanmış hücre çekirdeklerine yakın sitoplazmada konumlandığı, hücrelerin içerisine girdiği görülmektedir. Sağdaki görüntü, kontrol antikoru konjuge ve nil kırmızısı yüklü nanopartiküllerin verildiği gruba aittir. Bu görüntüde de, AF görüntüleri gibi ışığa görülmemiştir.

Nil kırmızısı molekülü, BVZ molekülü ile karşılaştırıldığında çok daha küçük bir moleküldür. Bu açıdan bakıldığında, bu çalışmada ilaç taşıyıcı sistemin aktif hedeflendirme stratejisinin in vivo ortamda test edildiği söylenebilir. İn vitro ortamda BVZ ile gösterilen KBB geçişi, in vivo ortamda gerçekleştirilememiştir çünkü beyin dokusundan BVZ tayin etmek için ELISA'dan farklı analiz yöntemleri gerekmektedir. Bu sebeple, ilaç taşıyıcı sistemin aktif hedeflendirme stratejisinin başarısı boya yükleme ve mikroskop yöntemleri ile gösterilirken, BVZ yüklü ve aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin etkinliği, geliştirilen in vivo GBM modeli üzerinde gösterilmiştir.

5.4. İn vivo Glioma Modelinde Beyne Hedeflendirilmiş Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemin Etkinliğinin Değerlendirilmesi

İlaç taşıyıcı sistemin, aktif hedeflendirme stratejisi ile BVZ'yi hedeflenen dokuya in vivo ortamda ulaştırıp ulaştırmadığı, in vivo GBM modeli oluşturularak ve partiküllerin tümör üzerine etkileri incelenerek araştırılmıştır. Oluşturulan GBM modeli için, alternatiflerine göre daha agresif ve damarlanmasının homojen olması nedeni ile U87 insan glioma hücreleri tercih edilmiştir. GBM modelinin in vivo ortamda, ortotopik olarak geliştirilmesi, tümörün beyin mikroçevresinde yerleşerek insan GBM'sını daha iyi yansıması ve KBB'nin modelde yer alması açısından üstünlük göstermektedir. Literatürde daha önce ortotopik ya da ksenograf U87 fare GBM modelleri geliştirilmiştir (78, 79).

İn vivo GBM modeli, 10 adet nude fare üzerinde geliştirilmiştir. İn vivo biyoluminesans özelliğine sahip U87-LUC hücreleri intrakranial olarak farelerin beyne ekilerek ortotopik GBM modeli geliştirilmiştir. Hücrelerin ekiminden sonra tümör ışımaları, farelere, lusiferaz substratı olan lusiferin'in haftalık iv uygulanması ile in vivo görüntüleme cihazında takip edilmiştir. Tümör ekiminden sonra 4 hafta boyunca izlenen ışımalarda, 4. haftada fare ölümleri başlamış ve beyindeki ışım miktarı artmıştır. 4 hafta sonunda tüm fareler sakrifiye edilerek, beyinleri çıkarılmış ve histopatolojik incelemeye götürülmüştür. Histopatolojik incelemeler sonrasında, H&E boyamaları ile U87 hücrelerinin beyin dokusunda çoğaldıkları ve tümör oluşumuna yol açtıkları doğrulanmıştır.

İn vivo GBM modelinin oluşturulması sonrasında, 9 adet nude fare ile yeniden tümör modeli oluşturulmuştur. Walker ve arkadaşlarının çalışmasında; 5, 10 ve 15 mg/kg BVZ'nin fare beynindeki anormal damarlanmaya etkileri karşılaştırıldığında, 5 mg/kg BVZ VEGF'e bağlanarak, damarlanma oranını düşüren en uygun konsantrasyon olarak seçilmiştir (48). 9 adet fare, 5 mg/kg BVZ içeren hedefli nanopartiküller, 5 mg/kg BVZ içeren kontrol antikoru konjuge nanopartiküller ve 5 mg/kg BVZ çözeltisi olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (n=3). U87-LUC hücrelerinin intrakranial olarak nude farelere ekiminden 3 gün sonra ilaçlar gruplara iv olarak uygulanmaya başlanmıştır. 3 günde 1 kere iv olarak 100'er uL ilaç çözeltisi, ilaç yüklü hedefli nanopartikül veya ilaç

yüklü kontrol antikor konjuge nanopartiküller verilmiştir. 4 hafta süre ile farelerin tümör ışımaları, haftalık iv lusiferin uygulaması ile in vivo görüntüleme cihazında takip edilmiştir. Hedeflendirilmiş nanopartiküllerin iv olarak verildiği gruptaki fareler ile diğer gruplardaki farelerin ağırlıkları da çalışma boyunca takip edilmiş ve yaklaşık 2.haftada tüm fare ağırlıkları ani bir şekilde düşmüştür. Sonrasında ilaç çözeltisi grubundaki fareler en az kilo kaybeden fareler olmakla birlikte en çok kilo kaybeden grubun kontrol nanoapartikül grubu olduğu tespit edilmiştir.

Şekil 4.56. ile gösterilen görüntülerde, 1.haftada tümör ışımaları arasında gözle görülür bir fark yokken, 2.hafta tümör ışımaları karşılaştırıldığında, hedefli ilaç grubunun ışımalarının diğer gruplardan daha az olduğu görülmektedir. Görüntülere göre, gruplar arasındaki tümör ışımaları farkı sonraki haftalarda kapanırken, MFI lusiferaz aktiviteleri karşılaştırıldığında hedefli nanopartikül grubundaki MFI lusiferaz aktivitesinin, diğer gruplara göre daha az arttığı tespit edilmiştir. BVZ içeren hedefli nanopartiküller, uygulandıkları fare grubunda, U87 hücrelerinin anjiyogenesiz için salgıladığı VEGF'i, diğer gruplara göre daha fazla inhibe ederek, tümör büyümesinde yavaşlamaya neden olmuştur. Çalışma süresince takip edilen fare ölümleri, ilk olarak beyne hücrelerin ekilmesinden 15 gün sonra kontrol nanopartikül grubunda gerçekleşmiştir. İlaç çözeltisi grubundan bir fare ile devam eden ölümler, 4.haftada yalnızca aktif hedeflendirilmiş partiküller ile tedavi edilen gruptaki 3 fare canlı kalana kadar devam etmiştir. Sağ kalımları açısından fare grupları değerlendirildiğinde, ilaç yüklü hedeflendirilmiş partiküllerin iv olarak verildiği gruptaki fareler canlı kalırken, diğer gruplardaki fareler hayatlarını sürdürememişlerdir. Bu durumda, tez kapsamında geliştirilen ilaç taşıyıcı sistem ile, BVZ'nin hedef dokuya seçici olarak gönderdiği, ilacın kanda kalış süresini artırdığı ve ilaç çözeltisi grubuna göre, farelerin hayatta kalma sürelerini uzattığı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmalar derlendiğinde;

- BVZ'nin PLGA-PEG nanoapartiküllere enkasülasyonu için, mAb inaktivasyonuna ya da agregasyonuna neden olmayacak, modifiye edilmiş bir nanoenkapsülasyon metodu geliştirildiği,
- BVZ yüklü nanopartiküllerin aktif hedeflendirilebilmesi için OCA molekülünün sentezlendiği,
- Sentezlenen OCA molekülünün çeşitli analiz yolları ile sentezinin doğrulandığı,
- Maleimid aktivasyonu ile aktive edilmiş Anti-CD71 ve izotip kontrol antikolarının, yüzeyi OCA molekülü ile tiyollenmiş PLGA-PEG nanopartiküllere konjuge edildiği,
- Nanopartikül yüzey aktivasyonunun Ellman's analizi ile doğrulandığı,
- Nanopartiküllere antikoların bağlanmasının BCA analizi ile kontrol edildiği,
- Aktif hedeflendirilmiş PLGA-PEG nanopartiküllere BVZ'nin enkapsüle edildiği,
- BVZ enkapsüle edilmiş ve aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin in vitro ortamda beyin endotel hücreleri ve glioma hücreleri üzerindeki sitotoksitelerinin araştırıldığı,
- BVZ-Anti-CD71 nanopartiküllerin, hedeflenen hücre yüzeyindeki reseptörlere afinitesinin sekonder antikor testi ile gösterildiği,
- Hücre içerisine alım çalışmaları gerçekleştirilerek, beyin endotel hücrelerinden aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin, kontrol nanopartiküllerine göre daha fazla hücre içine alındığının gösterildiği,
- Transitoz çalışmaları ile monokültür bir in vitro KBB modeli geliştirilebileceği ve BVZ-Anti-CD71-NP grubunun BVZ'yi alt kompartmana geçirerek, in vitro ortamda, etkin maddenin KBB geçişinin gösterildiği,
- Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin, KBB'ye aktif olarak hedeflendirildiğinin, nil kırmızısı yüklenmiş hedefli ve kontrol nanopartikül grupları ile gösterilebileceği, iv yoldan farelere verilen boya gruplarının mikroskop altında incelenmesi sonrasında, hedefli partiküllerin verildiği farelerin beyin kesitlerinde nil kırmızısının görüldüğü,

- In vivo GBM modelinin, U87-LUC hücreleri ile, nude fareler üzerinde intrakranial olarak geliştirildiği,
- Geliştirilen GBM modeli üzerinde BVZ yüklü ilaç taşıyıcı sistemlerin tedavi etkinliğinin ölçülebileceği,
- BVZ yüklü hedefli nanopartiküllerin verildiği GBM fare grubunun, kontrol NP ve ilaç çözeltisi gruplarına göre daha uzun süre yaşadığı ve tümör ışımalarının, diğer gruplara göre daha yavaş hızda arttığı sonuçlarına varılmıştır.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, mAb'ların ankapsüle edilerek, beyne hedeflendirilebilecekleri ve bu ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğinin in vitro ve in vivo gösterilebileceği sonuçları elde edilmiştir. Çalışmalarda karşılaşılan önemli problemlerden bir tanesi, BVZ aktivitesinin çeşitli ortamlarda ve koşullarda zamana bağlı olarak kaybolma ihtimalidir. Bu durum ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Tez kapsamında gerçekleştirilen ön stabilite deneyleri ile bu olumsuz etki sınırlandırılmaya çalışılsa da, mAb ile gerçekleştirilen çalışmalarda aktivitenin korunduğunun her çalışma basamağında test edilerek gösterilmesi önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Bors L, Erdő F. Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*. 2019;87(1).
2. Cen V, Já tiva P. Nanoparticle crossing of blood–brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine*. 2018;13(13):1513–6.
3. Keane J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J*. 2015;282(21):4067-79.
4. Zhou Y, Peng Z, Seven ES, Leblanc RM. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J Control Release*. 2018;270:290-303.
5. Upadhyay RK. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. *Biomed Res Int*. 2014;2014:869269.
6. Naik P, Cucullo L. In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci*. 2012;101(4):1337-54.
7. Zhang TT, Li W, Meng G, Wang P, Liao W. Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomater Sci*. 2016;4(2):219-29.
8. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*. 2019;99(1):21-78.
9. Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(3):133-50.
10. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(1):26-41.
11. Ek CJ, Dziegielewska KM, Stolp H, Saunders NR. Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol*. 2006;496(1):13-26.
12. Ayloo S, Gu C. Transcytosis at the blood-brain barrier. *Curr Opin Neurobiol*. 2019;57:32-8.
13. Tang W, Fan WP, Lau J, Deng LM, Shen ZY, Chen XY. Emerging blood-brain-barrier-crossing nanotechnology for brain cancer theranostics. *Chem Soc Rev*. 2019;48(11):2967-3014.
14. Zhang TT, Li W, Meng GM, Wang P, Liao WZ. Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomater Sci-Uk*. 2016;4(2):219-29.
15. Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *Bmc Neurosci*. 2008;9.

16. Garg T, Bhandari S, Rath G, Goyal AK. Current strategies for targeted delivery of bio-active drug molecules in the treatment of brain tumor. *J Drug Target*. 2015;23(10):865-87.
17. Dong XW. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*. 2018;8(6):1481-93.
18. Tajiri N, Lee JY, Acosta S, Sanberg PR, Borlongan CV. Breaking the Blood-Brain Barrier With Mannitol to Aid Stem Cell Therapeutics in the Chronic Stroke Brain. *Cell Transplant*. 2016;25(8):1453-60.
19. Konofagou EE, Tung YS, Choi J, Deffieux T, Baseri B, Vlachos F. Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1332-45.
20. Konofagou EE. Optimization of the Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening. *Theranostics*. 2012;2(12):1223-37.
21. Tocchio S, Kline-Fath B, Kanal E, Schmithorst VJ, Panigrahy A. MRI evaluation and safety in the developing brain. *Semin Perinatol*. 2015;39(2):73-104.
22. Tian Y, Mi GJ, Chen Q, Chaurasiya B, Li YA, Shi D, et al. Acid-Induced Activated Cell-Penetrating Peptide-Modified Cholesterol-Conjugated Polyoxyethylene Sorbitol Oleate Mixed Micelles for pH-Triggered Drug Release and Efficient Brain Tumor Targeting Based on a Charge Reversal Mechanism. *ACS Appl Mater Inter*. 2018;10(50):43411-28.
23. Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *Journal of Controlled Release*. 2011;153(3):198-205.
24. Rosenblum D, Joshi N, Tao W, Karp JM, Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat Commun*. 2018;9.
25. Danhier F, Feron O, Preat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2010;148(2):135-46.
26. Ramalho MJ, Sevin E, Gosselet F, Lima J, Coelho MAN, Loureiro JA, et al. Receptor-mediated PLGA nanoparticles for glioblastoma multiforme treatment. *Int J Pharmaceut*. 2018;545(1-2):84-92.
27. Loureiro JA, Gomes B, Fricker G, Coelho MAN, Rocha S, Pereira MC. Cellular uptake of PLGA nanoparticles targeted with anti-amyloid and anti-transferrin receptor antibodies for Alzheimer's disease treatment. *Colloid Surface B*. 2016;145:8-13.
28. Khan I, Khan M, Umar MN, Oh DH. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. *Int Nanobiotechnol*. 2015;9(6):396-400.
29. Chaturvedi VK, Singh A, Singh VK, Singh MP. Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Curr Drug Metab*. 2019;20(6):416-29.

30. Greish K. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting. *Methods Mol Biol.* 2010;624:25-37.
31. Bi Y, Hao F, Yan GD, Teng LS, Lee RJ, Xie J. Actively Targeted Nanoparticles for Drug Delivery to Tumor. *Curr Drug Metab.* 2016;17(8):763-82.
32. Ventola CL. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P T.* 2017;42(12):742-55.
33. Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J, Yeo Y. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol Pharm.* 2013;10(6):2093-110.
34. Jain KK. Nanobiotechnology-based strategies for crossing the blood-brain barrier. *Nanomedicine (Lond).* 2012;7(8):1225-33.
35. Sahin A, Esendagli G, Yerlikaya F, Caban-Toktas S, Yoyen-Ermis D, Horzum U, et al. A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(8):1657-64.
36. Fakruddin M, Hossain Z, Afroz H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *J Nanobiotechnology.* 2012;10:31.
37. Sousa F, Castro P, Fonte P, Kennedy PJ, Neves-Petersen MT, Sarmiento B. Nanoparticles for the delivery of therapeutic antibodies: Dogma or promising strategy? *Expert Opin Drug Deliv.* 2017;14(10):1163-76.
38. Gdowski A, Ranjan A, Mukerjee A, Vishwanatha J. Development of biodegradable nanocarriers loaded with a monoclonal antibody. *Int J Mol Sci.* 2015;16(2):3990-5.
39. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol.* 2016;18(suppl_5):v1-v75.
40. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
41. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(3):166-93.
42. Bahadur S, Sahu AK, Baghel P, Saha S. Current promising treatment strategy for glioblastoma multiforme: A review. *Oncol Rev.* 2019;13(2):417.
43. Ozdemir-Kaynak E, Qutub AA, Yesil-Celiktas O. Advances in Glioblastoma Multiforme Treatment: New Models for Nanoparticle Therapy. *Front Physiol.* 2018;9:170.

44. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(8):610-22.
45. Tea MN, Poonnoose SI, Pitson SM. Targeting the Sphingolipid System as a Therapeutic Direction for Glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1).
46. Li H, Lei B, Xiang W, Wang H, Feng W, Liu Y, et al. Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines. *Turk Neurosurg*. 2017;27(6):894-903.
47. Laquintana V, Trapani A, Denora N, Wang F, Gallo JM, Trapani G. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6(10):1017-32.
48. Walker EJ, Su H, Shen F, Degos V, Amend G, Jun K, et al. Bevacizumab attenuates VEGF-induced angiogenesis and vascular malformations in the adult mouse brain. *Stroke*. 2012;43(7):1925-30.
49. Fernandes C, Costa A, Osorio L, Lago RC, Linhares P, Carvalho B, et al. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In: De Vleeschouwer S, editor. *Glioblastoma*. Brisbane (AU)2017.
50. Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R. FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin (R)) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. *Oncologist*. 2009;14(11):1131-8.
51. Michael JS, Lee BS, Zhang M, Yu JS. Nanotechnology for Treatment of Glioblastoma Multiforme. *J Transl Int Med*. 2018;6(3):128-33.
52. Glaser T, Han I, Wu L, Zeng X. Targeted Nanotechnology in Glioblastoma Multiforme. *Front Pharmacol*. 2017;8:166.
53. Duvall M, Bradley N, Fiorini RN. A novel platform to produce human monoclonal antibodies The next generation of therapeutic human monoclonal antibodies discovery. *Mabs-Austin*. 2011;3(2):203-8.
54. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*. 2003;9(3):269-77.
55. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping Human-Antibodies for Therapy. *Nature*. 1988;332(6162):323-7.
56. Simovic D, Isner JM, Ropper AH, Pieczek A, Weinberg DH. Improvement in chronic ischemic neuropathy after intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia. *Arch Neurol*. 2001;58(5):761-8.
57. Reslan L, Dalle S, Dumontet C. Understanding and circumventing resistance to anticancer monoclonal antibodies. *Mabs-Austin*. 2009;1(3):222-9.
58. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006;2(3):213-9.

59. Field KM, Jordan JT, Wen PY, Rosenthal MA, Reardon DA. Bevacizumab and glioblastoma: scientific review, newly reported updates, and ongoing controversies. *Cancer*. 2015;121(7):997-1007.
60. Taugourdeau-Raymond S, Rouby F, Default A, Jean-Pastor MJ, Pharmacovigilance FN. Bevacizumab-induced serious side-effects: a review of the French pharmacovigilance database. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012;68(7):1103-7.
61. Prabhu RH, Patravale VB, Joshi MD. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Int J Nanomed*. 2015;10:1001-18.
62. Chan JM, Valencia PM, Zhang LF, Langer R, Farokhzad OC. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Methods Mol Biol*. 2010;624:163-75.
63. Suk JS, Xu QG, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliver Rev*. 2016;99:28-51.
64. Zhang C, Nance EA, Mastorakos P, Chisholm J, Berry S, Eberhart C, et al. Convection enhanced delivery of cisplatin-loaded brain penetrating nanoparticles cures malignant glioma in rats. *Journal of Controlled Release*. 2017;263:112-9.
65. Mishra P, Nayak B, Dey RK. PEGylation in anti-cancer therapy: An overview. *Asian J Pharm Sci*. 2016;11(3):337-48.
66. Webber MJ, Appel EA, Vinciguerra B, Cortinas AB, Thapa LS, Jhunjhunwala S, et al. Supramolecular PEGylation of biopharmaceuticals. *P Natl Acad Sci USA*. 2016;113(50):14189-94.
67. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic Polyethyleneglycols Effectively Prolong the Circulation Time of Liposomes. *Febs Lett*. 1990;268(1):235-7.
68. Cardoso MM, Peca IN, Roque ACA. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Curr Med Chem*. 2012;19(19):3103-27.
69. Bazak R, Hourri M, El Achy S, Kamel S, Refaat T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin*. 2015;141(5):769-84.
70. Yu KT, Zhou YL, Li YH, Sun XS, Sun FY, Wang XM, et al. Comparison of three different conjugation strategies in the construction of herceptin-bearing paclitaxel-loaded nanoparticles. *Biomater Sci-Uk*. 2016;4(8):1219-32.
71. Cardoso MM, Peca IN, Roque AC. Antibody-conjugated nanoparticles for therapeutic applications. *Curr Med Chem*. 2012;19(19):3103-27.
72. Hoyos-Ceballos GP, Ruozi B, Ottonelli I, Da Ros F, Vandelli MA, Forni F, et al. PLGA-PEG-ANG-2 Nanoparticles for Blood-Brain Barrier Crossing: Proof-of-Concept Study. *Pharmaceutics*. 2020;12(1).

73. Ayloo S, Gu CH. Transcytosis at the blood-brain barrier. *Current Opinion in Neurobiology*. 2019;57:32-8.
74. Weksler B, Romero I, Couraud P. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS* 2013;10/16
75. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cerebr Blood F Met*. 2016;36(5):862-90.
76. Wilhelm I, Krizbai IA. In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier for the Study of Drug Delivery to the Brain. *Mol Pharmaceut*. 2014;11(7):1949-63.
77. Kamiichi A, Furihata T, Kishida S, Ohta Y, Saito K, Kawamatsu S, et al. Establishment of a new conditionally immortalized cell line from human brain microvascular endothelial cells: A promising tool for human blood-brain barrier studies. *Brain Res*. 2012;1488:113-22.
78. Miyai M, Tomita H, Soeda A, Yano H, Iwama T, Hara A. Current trends in mouse models of glioblastoma. *J Neuro-Oncol*. 2017;135(3):423-32.
79. Stylli SS, Luwor RB, Ware TMB, Tan F, Kaye AH. Mouse models of glioma. *J Clin Neurosci*. 2015;22(4):619-26.
80. Slater K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12(1):70-4.
81. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163-76.
82. Jain A, Jain SK. In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. *Eur J Pharm Sci*. 2008;35(5):404-16.
83. Saraiva C, Praca C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release*. 2016;235:34-47.
84. Banerjee J, Shi Y, Azevedo HS. In vitro blood-brain barrier models for drug research: state-of-the-art and new perspectives on reconstituting these models on artificial basement membrane platforms. *Drug Discov Today*. 2016;21(9):1367-86.
85. Morgan RA. Human tumor xenografts: the good, the bad, and the ugly. *Mol Ther*. 2012;20(5):882-4.
86. Lenting K, Verhaak R, ter Laan M, Wesseling P, Leenders W. Glioma: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):263-82.
87. Lwin TM, Hoffman RM, Bouvet M. Advantages of patient-derived orthotopic mouse models and genetic reporters for developing fluorescence-guided surgery. *J Surg Oncol*. 2018;118(2):253-64.

88. Gomez-Cuadrado L, Tracey N, Ma R, Qian B, Brunton VG. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech*. 2017;10(9):1061-74.
89. Gargiulo G. Next-Generation in vivo Modeling of Human Cancers. *Front Oncol*. 2018;8:429.
90. Burkhardt JK, Santillan A, Hofstetter CP, Christos P, Berry N, Shin BJ, et al. Intra-arterial bevacizumab with blood brain barrier disruption in a glioblastoma xenograft model. *J Exp Ther Oncol*. 2012;10(1):31-7.
91. Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro*. 2011;3(3):e00063.
92. Akbas S, Sahin A, Calis S, Oncel H, Capan Y. Characterization of bevacizumab by dynamic light scattering while maintaining its native structure. *Pharmazie*. 2018;73(7):369-74.
93. Csaba N, Sanchez A, Alonso MJ. PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanostructures as carriers for nasal gene delivery. *J Control Release*. 2006;113(2):164-72.
94. Karra N, Nassar T, Ripin AN, Schwob O, Borlak J, Benita S. Antibody Conjugated PLGA Nanoparticles for Targeted Delivery of Paclitaxel Palmitate: Efficacy and Biofate in a Lung Cancer Mouse Model. *Small*. 2013;9(24):4221-36.
95. Brown R, Morris A, O'Neil R. Tight Junction Protein Expression And Barrier Properties Of Immortalized Mouse Brain Microvessel Endothelial Cells. *Brain Res*. 2007;1130:17-30.
96. Tian X, Brookes O, Battaglia G. Pericytes from Mesenchymal Stem Cells as a model for the blood-brain barrier. *Sci Rep*. 2017;7:39676.
97. Ejima D, Tsumoto K, Fukada H, Yumioka R, Nagase K, Arakawa T, et al. Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins*. 2007;66(4):954-62.
98. Kiese S, Pappenberg A, Friess W, Mahler HC. Shaken, not stirred: mechanical stress testing of an IgG1 antibody. *J Pharm Sci*. 2008;97(10):4347-66.
99. Eppler A, Weigandt M, Hanefeld A, Bunjes H. Relevant shaking stress conditions for antibody preformulation development. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;74(2):139-47.
100. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *J Pharm Sci*. 2020;109(1):169-90.
101. Sousa F, Sarrmento B, Neves-Petersen MT. Biophysical study of bevacizumab structure and bioactivity under thermal and pH-stresses. *Eur J Pharm Sci*. 2017;105:127-36.
102. Chen Z, Zhai M, Xie X, Zhang Y, Ma S, Li Z, et al. Apoferritin Nanocage for Brain Targeted Doxorubicin Delivery. *Mol Pharm*. 2017;14(9):3087-97.

103. Mizutani T, Ishizaka A, Nihei C. Transferrin Receptor 1 Facilitates Poliovirus Permeation of Mouse Brain Capillary Endothelial Cells. *J Biol Chem.* 2016;291(6):2829-36.
104. Sahin A, Yoyen-Ermis D, Caban-Toktas S, Horzum U, Aktas Y, Couvreur P, et al. Evaluation of brain-targeted chitosan nanoparticles through blood-brain barrier cerebral microvessel endothelial cells. *J Microencapsul.* 2017;34(7):659-66.
105. Somani S, Blatchford DR, Millington O, Stevenson ML, Dufes C. Transferrin-bearing polypropylenimine dendrimer for targeted gene delivery to the brain. *J Control Release.* 2014;188:78-86.
106. Barth B, Sharma R, Altinoglu E, Morgan T, Shanmugavelandy S, Kaiser J, et al. Bioconjugation of Calcium Phosphosilicate Composite Nanoparticles for Selective Targeting of Human Breast and Pancreatic Cancers In Vivo. *ACSNano.* 2010;4(3):1279-87.
107. Al-Shehri A, Favretto ME, Ioannou PV, Romero IA, Couraud PO, Weksler BB, et al. Permeability of PEGylated immunoarsonoliposomes through in vitro blood brain barrier-medulloblastoma co-culture models for brain tumor therapy. *Pharm Res.* 2015;32(3):1072-83.
108. Gregori M, Orlando A, Re F, Sesana S, Nardo L, Salerno D, et al. Novel Antitransferrin Receptor Antibodies Improve the Blood-Brain Barrier Crossing Efficacy of Immunoliposomes. *J Pharm Sci.* 2016;105(1):276-83.
109. Berlin JM, Pham TT, Sano D, Mohamedali KA, Marcano DC, Myers JN, et al. Noncovalent Functionalization of Carbon Nanovectors with an Antibody Enables Targeted Drug Delivery. *Acs Nano.* 2011;5(8):6643-50.
110. Park J, Mattessich T, Jay SM, Agawu A, Saltzman WM, Fahmy TM. Enhancement of surface ligand display on PLGA nanoparticles with amphiphilic ligand conjugates. *Journal of Controlled Release.* 2011;156(1):109-15.
111. Portnoy E, Lecht S, Lazarovici P, Danino D, Magdassi S. Cetuximab-labeled liposomes containing near-infrared probe for in vivo imaging. *Nanomedicine.* 2011;7(4):480-8.
112. Illum L, Jones PDE, Baldwin RW, Davis SS. Tissue Distribution of Poly(Hexyl 2-Cyanoacrylate) Nanoparticles Coated with Monoclonal-Antibodies in Mice Bearing Human-Tumor Xenografts. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984;230(3):733-6.
113. Phillips NC, Emili A. Immunogenicity of Immunoliposomes. *Immunol Lett.* 1991;30(3):291-6.
114. Debotton N, Parnes M, Kadouche J, Benita S. Overcoming the formulation obstacles towards targeted chemotherapy: In vitro and in vivo evaluation of cytotoxic drug loaded immunonanoparticles. *Journal of Controlled Release.* 2008;127(3):219-30.

115. Low K, Wacker M, Wagner S, Langer K, von Briesen H. Targeted human serum albumin nanoparticles for specific uptake in EGFR-Expressing colon carcinoma cells. *Nanomed-Nanotechnol.* 2011;7(4):454-63.
116. Toti US, Guru BR, Grill AE, Panyam J. Interfacial Activity Assisted Surface Functionalization: A Novel Approach To Incorporate Maleimide Functional Groups and cRGD Peptide on Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *Mol Pharmaceut.* 2010;7(4):1108-17.
117. Pandit J, Sultana Y, Aqil M. Chitosan-coated PLGA nanoparticles of bevacizumab as novel drug delivery to target retina: optimization, characterization, and in vitro toxicity evaluation. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(7):1397-407.
118. Sousa F, Cruz A, Fonte P, Pinto IM, Neves-Petersen MT, Sarmiento B. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Sci Rep.* 2017;7(1):3736.
119. Varshochian R, Jeddi-Tehrani M, Mahmoudi AR, Khoshayand MR, Atyabi F, Sabzevari A, et al. The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments. *Eur J Pharm Sci.* 2013;50(3-4):341-52.
120. Varshochian R, Riazi-Esfahani M, Jeddi-Tehrani M, Mahmoudi AR, Aghazadeh S, Mahbod M, et al. Albuminated PLGA nanoparticles containing bevacizumab intended for ocular neovascularization treatment. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(10):3148-56.
121. Zhang XP, Sun JG, Yao J, Shan K, Liu BH, Yao MD, et al. Effect of nanoencapsulation using poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) on anti-angiogenic activity of bevacizumab for ocular angiogenesis therapy. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:1056-63.
122. Dos Santos Rodrigues B, Oue H, Banerjee A, Kanekiyo T, Singh J. Dual functionalized liposome-mediated gene delivery across triple co-culture blood brain barrier model and specific in vivo neuronal transfection. *J Control Release.* 2018;286:264-78.
123. Haqqani AS, Thom G, Burrell M, Delaney CE, Brunette E, Baumann E, et al. Intracellular sorting and transcytosis of the rat transferrin receptor antibody OX26 across the blood-brain barrier in vitro is dependent on its binding affinity. *J Neurochem.* 2018;146(6):735-52.
124. Johnsen KB, Burkhart A, Melander F, Kempen PJ, Vejlebo JB, Siupka P, et al. Targeting transferrin receptors at the blood-brain barrier improves the uptake of immunoliposomes and subsequent cargo transport into the brain parenchyma. *Sci Rep.* 2017;7(1):10396.
125. Lu Q, Cai X, Zhang X, Li S, Song Y, Du D, et al. Synthetic Polymer Nanoparticles Functionalized with Different Ligands for Receptor-mediated Transcytosis across Blood-Brain Barrier. *ACS Appl Bio Mater.* 2018;1(5):1687-94.