

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NON-HODGKİN LENFOMA TEDAVİSİNDE İLAÇ
DİRENCİNİ YENMEK AMACIYLA AKTİF
HEDEFLENDİRİLMİŞ, ÇOKLU İLAÇ YÜKLÜ
NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN
VİTRO-İN VİVO ETKİNLİK VE GÜVENLİLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Nurbanu DEMİRTÜRK

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

Ecz. Selen i SAR'a

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NON-HODGKİN LENFOMA TEDAVİSİNDE İLAÇ DİRENCİNİ
YENMEK AMACIYLA AKTİF HEDEFLENDİRİLMİŞ, ÇOKLU
İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
İN VİTRO-İN VİVO ETKİNLİK VE GÜVENLİLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Nurbanu DEMİRTÜRK

Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Erem BİLENSOY

ANKARA
2024

**NON-HODGKİN LENFOMA TEDAVİSİNDE İLAÇ DİRENCİNİ YENMEK
AMACIYLA AKTİF HEDEFLENDİRİLMİŞ, ÇOKLU İLAÇ YÜKLÜ
NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO- İN VİVO
ETKİNLİK VE GÜVENLİLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Nurbanu Demirtürk

Danışman: Prof. Dr. Erem Bilensoy

Bu tez çalışması 23.10.2024 tarihinde jürimiz tarafından
"Farmasötik Teknoloji Doktorası Programı" nda doktora tezi olarak kabul
edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Betül ARICA YEGIN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Tansel ÇOMOĞLU*
(Ankara Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN*
(Gazi Üniversitesi)

Üye: *Dr. Öğr. Üy. Gamze VARAN*
(Hacettepe Üniversitesi)

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

01 Kasım 2024

Prof. Dr. Müge YEMIŞCI ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

01 /11/2024

Ecz. Nurbanu Demirtürk

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

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullandığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokollü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir; gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

Ecz. Nurbanu DEMİRTÜRK

TEŞEKKÜR

Bu tezin her aşamasında bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimiyle çalışmalarımı yönlendiren, ilham veren saygıdeğer danışman hocam **Prof. Dr. Erem Bilensoy**'a,

Tez çalışmalarım süresince gösterdikleri destek ve katkılarından dolayı tez izleme komitesi hocalarım **Prof. Dr. Güneş Esendağlı** ve **Prof. Dr. Devrim Gözüaçık**'a,

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na ve tez çalışmalarım sırasında her türlü imkânı sağlayan tüm değerli öğretim üyesi/elemanı hocalarına, öğrencilerine ve personeline,

Yaptığımız çalışmalar sırasında gösterdikleri özen ve yardımları için **Prof. Dr. Emirhan Nemutlu**, **Dr. Öğr. Üyesi Sadık Kağa**, **Dr. Milo Malanga** ve başta **Dr. Bio. Sibel Gökşen** olmak üzere tüm **Esendağlı Lab** üyelerine,

Akademik olarak yetişmeme büyük katkı sağlayan, süreç boyunca ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan **Dr. Öğr. Üyesi Gamze Varan** ve **Dr. Öğr. Üyesi Cem Varan**'a,

Süreç boyunca sağladıkları katkılar, fikir alışverişleri ve destekleri için tüm **Bilensoy Lab** ekibi üyelerine,

Akademik katkılarının yanı sıra bana hayatımın en kıymetli dostluklarını kazandıran **Prof. Dr. Gerrit Borchard** ve **Cenevre Üniversitesi FABIO** aileme,

Manevi destekleriyle her an yanımda olan, her zorluğu paylaşan ve beni motive eden, Ankara'daki ailem **Ecz. Selen İsar**, **Ecz. Merve Özkaya**, **End. Müh. Ashı Şahin**, **Dr. Ecz. Gizem Tezel**, **Ecz. Atakan Şahin**, **Uzm. Ecz. Erdinç Sarıçimen**, **Ecz. Ahmet Onur Beyazıt** ve **Ecz. Akın Temel**'e,

Beni her koşulda destekleyen, bana her zaman inanan ve güvenen; babam **Bünyamin Demirtürk**, annem **Nurhan Demirtürk**, ablam **Av. Ayça Demirtürk Karamıklı** ve ağabeyim **Av. Cengizhan Karamıklı**'ya sonsuz sevgileri ve sabırları için,

Doktora tez çalışmalarımda sağladıkları destek için **YÖK 100/2000 Doktora Projesi**'ne, **TÜBİTAK BİDEB 2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı** ve **2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı** ve **Bicyclos Horizon Msca Staff Exchange Projesi**'ne teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Demirtürk, N., Non-Hodgkin Lenfoma Tedavisinde İlaç Direncini Yenmek Amacıyla Aktif Hedeflendirilmiş, Çoklu İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Geliştirilmesi ve in vitro- in vivo Etkinlik ve Güvenliliğinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Günümüzde Non-Hodgkin Lenfoma'nın birinci basamak tedavi yöntemi olarak, siklofosamid, doksorubisin, vinkristin gibi antikanserlerin yanı sıra, prednizon ve monoklonal antikor Rituksimab'ı da içeren (R-CHOP) "4'lü ilaç rejimi" kullanılmaktadır ancak antikanser ilaç direnci nedeniyle istenen başarı sağlanamamaktadır. Bu tez kapsamında mitokondriyi hedeflemeyi sağlayan "Guanidin grubu" içeren amfifilik ve polimerik siklodekstrinler ile hazırlanan nanopartiküller kullanılarak, R-CHOP tedavisinin etkililiğini arttırmak, yan etkilerini azaltmak ve gelişen ilaç direncinin aşılması amaçlanmıştır. Tezin ilk aşamasında hemoliz, biyolojik sıvıda stabilite ve kompleman aktivasyonu gibi çalışmalarla siklodekstrin türevlerinin güvenliliği kanıtlanmıştır. Ardından her bir antikanser ilacın miktar tayini için HPLC yöntemleri valide edilmiştir. Daha sonra ise başarılı bir şekilde rituksimab ile aktif hedeflendirilmiş çoklu ilaç yüklü nanopartiküller nanopresipitasyon yöntemi ile hazırlanmış ve partikül büyüklüğü, yüzey yükü, ilaç yükleme etkinliği, ilaç salım profili belirlenmesi gibi *in vitro* karakterizasyon çalışmalarının ardından 2 ve 3 boyutlu hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlaç çözeltileri ile karşılaştırıldığında aktif hedeflendirilmiş ilaç yüklü nanopartikül uygulanan lenfoma hücre hatlarında canlılık açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Son olarak *in vivo* deneyler kapsamında Balb/c farelerde farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışması, güvenlilik çalışması, antitümöral etkinlik çalışması gerçekleştirilmiş ve ilaç direncini aşmada umut vaat eden bir model ilaç taşıyıcı sistem ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Non-Hodgkin lenfoma; nanoilaç ; siklodekstrin; rituksimab; çift hedeflendirme

Tez TÜBİTAK tarafından 220S051 numaralı proje ve 2211-C Doktora Burs Programı ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Demirturk, N., Development and in vitro-in vivo Evaluation of Active Targeted Multidrug Loaded Nanoparticles to Overcome Drug Resistance in the Treatment of Non-Hodgkin Lymphoma, Hacettepe University Graduate School Health Sciences Pharmacy Department of Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024. Currently, the first-line treatment for Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) involves a "4-drug regimen" known as R-CHOP, which includes anticancer agents such as cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine, as well as prednisone and the monoclonal antibody rituximab. However, due to anticancer drug resistance, the desired level of success is not always achieved. This thesis aims to enhance the effectiveness of R-CHOP therapy, reduce side effects, and overcome emerging drug resistance by using nanoparticles made from amphiphilic and polymeric cyclodextrins containing "guanidine groups" that target mitochondria. In the first phase of the thesis, the safety of cyclodextrin derivatives was demonstrated through studies on hemolysis, stability in biological fluids, and complement activation. Subsequently, HPLC methods were validated for quantifying each anticancer drug. Following this, rituximab-targeted, multi-drug-loaded nanoparticles were successfully prepared using the nanoprecipitation method. In vitro characterization studies, including particle size, surface charge, drug loading efficiency, and drug release profile, were conducted, followed by 2 and 3-dimensional cell culture studies. The results showed a statistically significant reduction in cell viability in lymphoma cell lines treated with the targeted drug-loaded nanoparticles compared to drug solutions ($p < 0.05$). Finally, in vivo experiments were carried out in Balb/c mice to assess pharmacokinetics, bioavailability, safety, and antitumor efficacy. The study has led to the development of a promising model drug delivery system for overcoming drug resistance.

Key Words: Non-Hodgkin lymphoma; nanomedicine; cyclodextrin; rituximab; dual targeting

*The thesis was supported by TUBITAK with project number 220S051 and 2211-C
PhD Scholarship Program.*

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iv
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.2. Kanserde İlaç Direnci	5
2.3. Non- Hodgkin Lenfoma (NHL)	7
2.4. Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler	11
2.5. Tümör Hedefleme Stratejileri	12
2.5.1. Pasif Hedeflendirme	14
2.5.2. Aktif Hedeflendirme	16
2.6. Siklodekstrinler	18
2.7. Non-Hodgkin Lenfoma, Güncel Tedavi Yaklaşımları ve Karşılaşılan Sorunlar	21
2.7.1. Doksorubisin	23
2.7.2. Siklofosfamid	24
2.7.3 Vinkristin	25
2.7.4 Rituksimab	26
2.7.5. Non-Hodgkin Lenfomada Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Araç ve Gereçler	30
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	30
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.1.3. Kullanılan Biyolojik Materyaller	32

3.2. Siklodekstrinlerin Sentezlenmesi, Saflaştırılması ve Biyogüvenliliğinin Belirlenmesi	33
3.3. Doksorubisinin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu	34
3.4. Siklofosfamidin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu	36
3.5. Vinkristinin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu	38
3.6. Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	40
3.6.1. Hemoliz	40
3.6.2. Biyolojik Sıvıda Stabilité	40
3.6.3. Kompleman Aktivasyonu	41
3.7. Mab ile Aktif Hedeflendirilmiş Antikanser İlaç Yüklü Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve in vitro Karakterizasyonu	41
3.7.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması	44
3.7.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yükünün Belirlenmesi	45
3.7.3. Fiziksel Stabilitenin Değerlendirilmesi	45
3.7.4. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	46
3.7.5. Nanopartiküllerin Sterilizasyonu	46
3.7.6. İlaç Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	46
3.7.7. İlaç Salım Profilinin Belirlenmesi	47
3.7.8. Nanopartikül Yapısındaki Rituksimab'ın Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi	48
3.8. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemin Güvenliğinin ve Etkinliğinin Konvansiyonel Hücre Kültürü Çalışmalarında Belirlenmesi	48
3.8.1. Boş Nanopartiküllerin Güvenliğinin Belirlenmesi	48
3.8.2. İlaç Direnci Geliştirme Çalışmaları	49
3.8.3. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Etkinliğinin Belirlenmesi	49
3.8.4. Antikora Bağımlı Hücrel Sitotoksitenin Belirlenmesi	50
3.8.5. Kolesterol Ekstraksiyon Çalışması	50
3.8.6. Survivin Deneyi	51
3.8.7. Mitokondri İzolasyonu	51
3.8.8. P-gp İnhibisyonunun Belirlenmesi	52
3.9. 3B Tümör Modeli Çalışmaları	53
3.10. Hücre Ölüm Mekanizmasının Belirlenmesi	53
3.11. Hayvan Çalışmaları	54
3.11.1. Serbest ve Nanopartiküle Bağlı İlaçların Plazma Profilinin Belirlenmesi	54

3.11.2. Güvenlilik Çalışması	54
3.11.3. Antitümöral Etkinlik Çalışması	55
3.11.4. Histopatolojik İnceleme	56
3.12. İstatistiksel Analiz	56
4. BULGULAR	58
4.1. Siklodekstrinlerin Sentezlenmesi Saflaştırılması ve Biyogüvenliliğinin Belirlenmesi	58
4.2. Doksorubisinin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu	59
4.3. Siklofosfamidin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu	62
4.4. Vinkristinin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu	65
4.5. Gua-CD Türevlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	68
4.5.1. Hemoliz	68
4.5.2. Biyolojik Sıvıda Stabilitate	68
4.5.3. Kompleman Aktivasyonu	69
4.6. Mab ile Aktif Hedeflendirilmiş Antikanser İlaç Yüklü Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve in vitro Karakterizasyonu	70
4.6.1. Rituksimab Adamantan Modifikasyonu:	70
4.6.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yükünün Belirlenmesi	71
4.6.3. Fiziksel Stabilitenin Değerlendirilmesi	73
4.6.4. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	75
4.6.5. Nanopartiküllerin Sterilizasyonu	76
4.6.6. İlaç Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	76
4.6.7. İlaç Salım Profilinin Belirlenmesi	77
4.6.8. Nanopartikül Yapısındaki Rituksimab'ın Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi	81
4.7. Nanopartiküler Sistemin Güvenliğinin ve Etkinliğinin Konvansiyonel Hücre Kültürü Çalışmalarında Belirlenmesi	82
4.7.1. Boş Nanopartiküllerin Güvenliğinin Belirlenmesi	82
4.7.2. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Etkinliğinin Belirlenmesi	83
4.7.3. Antikora Bağımlı Hücrel Sitotoksitenin Belirlenmesi	85
4.7.4. Kolesterol Ekstraksiyon Çalışması	86
4.7.5. Survivin Deneyi	88
4.7.6. Mitokondri İzolasyonu	88
4.7.7. P-gp İnhibisyonunun Belirlenmesi	90

4.8. 3B Tümör Modeli Çalışmaları	91
4.9. Hücre Ölüm Mekanizmasının Belirlenmesi	94
4.10. Hayvan Çalışmaları	96
4.10.1. Güvenlilik Çalışması	96
4.10.2. Plazma Profili Belirlenmesi	97
4.10.3. Antitümöral Etkinlik	100
4.10.4. Histopatolojik İnceleme	102
5. TARTIŞMA	103
5.1. Etkin Maddelere Ait in vitro Miktar Tayin Yöntemleri ve Validasyonları	103
5.2. Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	103
5.2.1. Hemoliz	105
5.2.2. Biyolojik sıvıda stabilite	106
5.2.3. Kompleman Aktivasyonu	108
5.3. Antikanser İlaç ve mAb Yüklü Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve in vitro Karakterizasyonu	111
5.3.1. Rituksimab Adamantan Modifikasyonu:	111
5.3.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yükünün Belirlenmesi	113
5.3.3. Fiziksel Stabilitenin Değerlendirilmesi	116
5.3.4. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	117
5.3.5. Nanopartiküllerin Sterilizasyonu	118
5.3.7. İlaç Salım Profilinin Belirlenmesi	120
5.3.8. Nanopartikül Yapısındaki Rituksimab'ın Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi	122
5.4. Nanopartiküler Sistemin Güvenliğinin ve Etkinliğinin Konvansiyonel Hücre Kültürü Çalışmalarında Belirlenmesi	124
5.4.1. Boş Nanopartiküllerin Güvenliğinin Belirlenmesi	124
5.4.2. Hücre Ölüm Mekanizmasının Belirlenmesi	125
5.4.3. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Etkinliğinin Belirlenmesi	127
5.4.4. Antikora Bağımlı Hücrel Sitotoksitenin Belirlenmesi	128
5.4.5. Kolesterol Ekstraksiyon Çalışması	129
5.4.6. Survivin Deneyi	131
5.4.7. Mitokondri İzolasyonu	132
5.4.8. P-gp İnhibisyonunun Belirlenmesi	135
5.5. 3B Tümör Modeli Çalışmaları	137

5.6. Hayvan Çalışmaları	138
5.6.1. Güvenlilik Çalışması	139
5.6.2. Plazma Profili Belirlenmesi	140
5.6.3. Antitümöral Etkinlik	142
5.6.4. Histopatolojik İnceleme	144
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	146
7. KAYNAKLAR	148
8. EKLER	164
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	165
EK-2: Turnitin Dijital Makbuz	168
EK-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	169
EK-4: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	170
EK-5: Tez İle İlgili Yayın	171
9. ÖZGEÇMİŞ	189

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
2B	2 boyutlu
3B	3 boyutlu
ACD	Amfifilik siklodekstrin
ALT	Alanin transferaz
AST	Aspartat transaminaz
CD	Siklodekstrin
cm	Santimetre
CYC	Siklofosfamid
dk	Dakika
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle's Besiyeri
DOX	Doksorubisin
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGF(R)	Epidermal büyüme faktörü (reseptörü)
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbent deneyi
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EP	Avrupa Farmakopesi
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IC50	Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu
kDa	Kilodalton
LDH	Laktat dehidrogenaz
LOD	Saptama sınırı
LOQ	Tayin edilebilirlik sınırı
mg	Miligram
mL	Mililitre
n	Örneklem sayısı
NK	Natural Killer (Doğal öldürücü hücreler)

nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PB	Partikül büyüklüğü
PBMC	İnsan periferik kan mononükleer hücreleri
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PCD	Polimerik Siklodekstrin
PDI	Polidispersite indeksi
r²	Korelasyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RTX	Rituksimab
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforez
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Standart sapma
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
U	Ünite
USP	Amerikan Farmakopesi
VEGF(R)	Vasküler endotelial büyüme faktörü (reseptörü)
VK	Varyasyon katsayısı
VRC	Vinkristin
WST-1	Suda çözünür tetrazolyum tuzu
X	Ortalama
ZP	Zeta potansiyel
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Tümörde ilaç direncine sebep olan faktörler ve ilaç direncini aşmak için nano ilaç taşıyıcı sistemler	6
2.2. İlaç taşıyıcı sistemlerde hedeflendirme mekanizmaları	14
2.3. Anti-CD20 monoklonal antikoru (RTX) ve CD20 reseptörü arasındaki etkileşim	18
2.4. Siklodekstrin tipleri ve şematik gösterimleri	19
2.5. Doksorubisin kimyasal yapısı	23
2.6. Siklofosfamid kimyasal yapısı	24
2.7. Vinkristin kimyasal yapısı	25
2.8. Rituksimab (kimerik monoklonal antikor) yapısı	26
3.1. Amfifilik (a) ve polimerik (b) CD türevlerinin yapısı	33
3.2. Adamantan-Ritüksimab konjugasyonu	42
3.3. Nanopresipitasyon yöntemi ile nanopartikül hazırlanması	43
4.1. Amfifilik ve polimerik siklodekstrin türevlerinin yapısı ve NMR sonuçları	57
4.2. DOX'e ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi	58
4.3. CYC'e ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi	61
4.4. VRC'e ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi	64
4.5. Boş ACD ve PCD'nin farklı konsantrasyonlarda 30 dakikalık inkübasyondan sonra hemoliz değerleri (n=3 ±SD)	67
4.6. 450 nm dalga boyunda ölçülen C3a miktarları ile oluşturulan kalibrasyon doğrusu	68
4.7. Adamantan-mAb konjugatı SDS PAGE analizi, Örnek 1 (kuyucuk 1), Örnek 2 (kuyucuk 2), Örnek 3 (Kuyucuk 3), Örnek 4 (Kuyucuk 4), Örnek 5 (Kuyucuk 5).	70
4.8. NP'lerin ortalama partikül büyüklüğü (PS), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (ZP) sonuçları (n=3 ±SD)	71
4.9. Belirlenen zaman aralıklarında (5., 10. ve 30. günlerde) nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri	73
4.10. Nanopartiküllere ait SEM görüntüleri a) blank ACD NP, b) DOX-ACD NP, c) VRC-ACD NP, d) CYC-ACD NP, e) RTX-DOX-ACD NP, f) RTX-VRC-ACD NP, g) RTX-CYC-ACD NP, h) blank PCD NP, i) DOX-PCD NP, j) VRC-PCD NP, k) CYC-PCD NP, l) RTX-DOX-PCD NP, m) RTX-VRC-PCD NP, n) RTX-CYC-PCD NP	74

- 4.11. PBS'de (pH 7.4) DOX'un (n=3 ±SD) zamana bağlı salım sonuçları, 37 °C'de 100 rpm'de su banyosunda inkübe edildi. Aşağıdaki grafik ilk 120 dakikanın genişletilmiş halidir. 77
- 4.12. PBS'de (pH 7.4) CYC'un (n=3 ±SD) zamana bağlı salım sonuçları, 37 °C'de 100 rpm'de su banyosunda inkübe edildi. Aşağıdaki grafik ilk 120 dakikanın genişletilmiş halidir. 78
- 4.13. PBS'de (pH 7.4) VRC'un (n=3 ±SD) zamana bağlı salım sonuçları, 37 °C'de 100 rpm'de su banyosunda inkübe edildi. Aşağıdaki grafik ilk 120 dakikanın genişletilmiş halidir. 79
- 4.14. CD nanopartiküllerindeki Rituksimab'ın yapısal bütünlüğünü belirlemek için doğal koşullar altında SDS-PAGE analizi sonuçları. Hat M: Precision Plus Protein Unstained Protein Standards; Hat 1: Rituksimab standardı; Hat 2: RTX-Amfifilik GuaCD nanopartikül; Hat 3: RTX-Polimerik GuaCD nanopartikül; Hat 4: RTX-ilaç yüklü Amfifilik GuaCD nanopartikül ; Hat 5: RTX-ilaç yüklü Polimerik GuaCD nanopartikül 80
- 4.15. Serbest RTX ve NP'e bağlı RTX'e ait sirküler dikroizm spekturumları 81
- 4.16. Farklı konsantrasyonlarda Gua-CD'lerin L929 sağlıklı fibroblast hücrelerinde 24 saat ve 48 saat (n=6 ± SD) boyunca hücre canlılığı üzerindeki etkisi. CD solüsyonları seyreltilerek hazırlanmıştır. 81
- 4.17. Daudi insan lenfoma hücrelerinin mikroskopik görüntüleri 81
- 4.18. Daudi (a) ve Bjab (Direnc gelişmiş (b) ve gelişmemiş (c)) insan lenfoma hücre hatları insan lenfoma hücreleri ile 24 saat ve 48 saat inkübe edilen farklı NP formülasyonları (DOX, VRC, CYC yüklü üç farklı antikanser ilacı), boş CD NP'leri ve üç farklı ilaç çözeltisi kullanılarak hücre canlılığı (%) (n=3, ±SD) değerlendirildi. p<0.05. Hücre canlılığı WST-1 testi ile değerlendirildi. 84
- 4.19. Farklı nanopartikül formülasyonları ve ilaç çözeltileri ile inkübe edilen Daudi (a) ve Bjab (Direnc gelişmiş (b) ve gelişmemiş (c)) lenfoma hücrelerde yüzde lizise oranı (n=8 ± SS) 86
- 4.20. Üç farklı antikanser ilaç yüklü (Doksorubisin, Siklofosamid, Vinkristin) yüklü farklı nanopartikül formülasyonları, boş CD nanopartiküller ve üç farklı ilaç çözeltileri ile inkübe edilen Daudi, ve Bjab (Direnc gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücrelerindeki kolesterol miktarı yüzdesi (n=3, ±SS) 87
- 4.21. DOX yüklü CD nanopartikülleri ve DOX çözeltisi ile inkübe edilen Daudi ve Bjab (Direnc gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücrelerinde mitokondride detekt edilen doksorubisin miktarı (n=8, ±SS) 89

4.22.	RTX-DOX-ACD NP formülasyonları ve Verapamil ile inkübe edilen Bjab (Direnç gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücrelerinde akümüle olan Kalsein miktarı (n=3 ±SS)	90
4.23.	Farklı formülasyonlarla inkübe edilen 3B lenfoma sferoidlerinde 48 ve 72 saat sonunda hücre canlılığı (n=6 ± SS)	91
4.24.	Farklı formülasyonlarla inkübe edilen Bjab (Direnç gelişmiş (a) ve gelişmemiş (b)) 3B lenfoma sferoidlerinde 48 saat sonunda hücre canlılığı (n=6 ± SS)	92
4.25.	48 ve 72 saat sonra farklı formülasyonlarla inkübe edilen 3B lenfoma sferoidlerinin mikroskop görüntüleri. Işık mikroskobu altında sferoidlerin morfolojik yapısı gözlenmiştir	93
4.26.	Dirençli ve dirençsiz Bjab hücre hatlarında hazırlanan farklı formülasyonlar ile çalışıldığında hücrelere ait ölüm mekanizmaları	94
4.27.	Dirençli ve dirençsiz Bjab hücre hatlarında hazırlanan farklı formülasyonlar ile çalışıldığında hücrelere ait ölüm mekanizmalarının yüzde olarak ifadesi	95
4.28.	Sağlıklı Balb/c farelere tek/tekrarlı doz şeklinde uygulanan boş nanopartiküller sebebiyle serumdan elde edilen ALT, AST miktarları ve oranları (n=4)	96
4.29.	Etkin maddelere ait LC/MSMS kalibrasyon doğruları	97
4.30.	Balb/c serum örneklerinden elde edilen ilaç miktarları	98
4.31.	Tümör büyümesi gözlenen Balb/c fareler ve her enjeksiyon öncesi ölçülen tümör boyutları	100
4.32.	Sakrifiye edilen farelerden çıkarılan tümör dokuları ve ağırlıkları	101
4.33.	Tümör kesitlerinin eosin boyanmasıyla elde edilen nekrotik alanlar	102

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. NHL tedavisinde nanopartiküler taşıyıcı sistemlerle yapılan klinik çalışmalara örnekler	28
2.2. B Hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen nanopartiküler sistemler	29
4.1. DOX'e ait konsantrasyon ve kromatogram alan değerleri	58
4.2. DOX'in geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayıları (n=6)	59
4.3. DOX'e ait kesinlik parametresi değerleri (n=6)	60
4.4. CYC'e ait konsantrasyon ve kromatogram alan değerleri	61
4.5. CYC'in geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayıları (n=6)	62
4.6. CYC'e ait kesinlik parametresi değerleri (n=6)	63
4.7. VRC'e ait konsantrasyon ve kromatogram alan değerleri	64
4.8. VRC'in geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayıları (n=6)	65
4.9. VRC'e ait kesinlik parametresi değerleri (n=6)	66
4.10. ACD ve PCD boş nanopartiküllerin stabilite testi öncesi ve sonrasında ait partikül boyutu (PB), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (ZP) değerleri (n=3±SS)	68
4.11. ACD ve PCD NP'lerin neden olduğu kompleman aktivasyonuna ait kalibrasyon denkleminde elde edilen C3a miktarları	69
4.12. Sterilizasyon işleminden önce ve sonra NP formülasyonu sulu kolloidal dispersiyon miktarı	75
4.13. Hazırlanan nanopartiküllere ait % yükleme etkinliği sonuçları	76
4.14. Farklı nanopartikül formülasyonları ve ilaç çözeltileri ile inkübe edilen Daudi hücrelerindeki Survivin protein miktarı	88
4.15. Formülasyon çözelti ve nanopartikül formülasyonlarına ait farmakokinetik parametreleri	99

1. GİRİŞ

Lenfatik sistem, işlevsel bir bütün olarak birçok organı içerir. Bunlar, beyaz kan hücrelerinin üretildiği dalak, timus, bademcikler ve kemik iliğidir. Lenfatik damar sistemi, kan venöz sistemi ile paralel çalışır ve interstisyel doku boşluklarından toplanan lenf sıvısını taşır. Lenfoma, lenf düğümlerinde ve diğer lenfatik sistem dokularında lenfositlerden kaynaklanan bir kanser türüdür ve lenf dokusunun bulunduğu organlarda ortaya çıkabilir ve/veya etkilenebilir (1). Lenfomalar iki ana alt kategoriye ayrılır: Hodgkin Lenfoma ve Non-Hodgkin Lenfoma (NHL). İki lenfoma türünü ayırt etmek, hastalıklı hücreleri mikroskop altında inceleyerek mümkündür. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, 2018 yılında 9.6 milyon insanın ölümüne neden olan kanser, dünya çapında ikinci en yaygın ölüm nedenidir ve lenfomalar, tüm kanserlerin yaklaşık %3'ünü oluşturur ve hematolojik kanserler arasında en yaygın gruptur. NHL, tüm lenfomaların %85-90'ını oluşturur (2). NHL, Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın kanserlerden biridir ve tüm kanserlerin yaklaşık %4'ünü oluşturur. Amerikan Kanser Derneği, 2024 yılında yaklaşık 44.590 erkek ve 36.030 kadın dahil olmak üzere 80.620 kişinin NHL ile teşhis edileceğini tahmin etmektedir (3). Genel olarak, NHL'li hastaların yaklaşık %50'si tedavi edilebilmektedir. Nükslerin çoğu tedaviden sonraki ilk 2 yıl içinde görülür. Geç dönemde nüks riski, hem geç hem de agresif histolojiler gösteren hastalarda daha yüksektir. İndolent (düşük dereceli) NHL, immünoterapiler, radyoterapi ve kemoterapiye yanıt verirken, ileri evrelerde kalıcı nüks sıklıkla gözlemlenmektedir. Agresif NHL ile teşhis edilen veya bu formlara dönüşen hastalarda nüks olasılığı tedaviden sonra daha yüksektir. Klinik remisyon birçok hastada gözlemlenmektedir. Ancak, ilk tedavisi başarısızlıkla sonuçlanan hastaların yaklaşık %30 ila %40'ı, birincil direnç (%15) veya nüks (%25) nedeniyle kötü prognoza sahiptir (4). Bu tür hastaların tedavileri, ciddi toksisite ve ölümcül enfeksiyon riskleri ile ilişkili daha agresif, yüksek doz kemoterapi rejimleri ve otolog kök hücre nakli ile yapılmaktadır. Bu yoğun tedaviyi tolere edebilen nüks görülen hastaların oranı %50'dir, diğer hastalar ise yaşlılık veya ek hastalıklar nedeniyle tedaviye uygun olmamakta ve tedavi başarısız olmaktadır. Özellikle yaşlı hastalarda tedavi başarısızlığının temel nedeni, hastaların tedaviye toleranslarının azalmasıdır. Kemik iliği fonksiyonundaki bozulma, değişmiş ilaç metabolizması ve eşlik eden

hastalıkların varlığı, tedaviye bağlı komplikasyonların sayısını artırır ve tedavi başarısızlığına yol açar (5).

Günümüzde, NHL hastalarına uygulanan çeşitli tedavi yaklaşımları bulunmaktadır. Evre, hastalığın türü ve hasta geçmişi, uygulanacak tedavi türünü belirleyen faktörlerdir. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, kemoterapi, NHL'nin tedavisinde ana yaklaşımdır. Ayrıca, NHL hastalarına tedavi ve palyatif amaçlarla kemoterapinin yanısıra tek başına veya kombine radyoterapi uygulanmaktadır. Diğer bir tedavi yöntemi olan immünoterapide, kanser hücrelerinin yüzeyindeki farklı antijenleri hedeflemek için monoklonal antikolar kullanılır. NHL tedavisinde kemoterapide, temel olarak CHOP (siklofosamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizon) olarak bilinen 4 ilaç rejimi kullanılır. Bu tedavi rejiminde, kortikosteroid oral yolla üç farklı antikanser ilacı ise intravenöz olarak uygulanır. Ayrıca, tedavi etkinliğini artırmak için monoklonal antikor Rituksimab'ın dahil olduğu R-CHOP, günümüzde NHL hastaları için birinci basamak standart tedavi olarak kullanılmaktadır (6).

Tedavi başarısını artırmak için diğer ilaçların yan etkilerini azaltmaya yönelik çeşitli yaklaşımlar geliştirilmektedir. En güncel yaklaşım, NHL tedavisi için nano ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesidir. Günümüzde, özellikle kanser teşhisi ve tedavisinde uygulanan nanoteknoloji, geleneksel kemoterapiye alternatif olarak en umut verici seçeneklerinden biri haline gelmiştir. Kullanılan nano boyutlu taşıyıcı sistemler, lipit veya polimer bazlı, ilaçla ilişkili, inorganik ve viral nanopartiküller gibi çeşitli türlerde incelenmiştir. İlacın hedef bölgeye ulaşması nanopartikül ve tümörün fiziksel özelliklerine bağlı olan pasif hedeflendirme ve/veya hedef bölgeye spesifik ligand modifikasyonu ile sağlanan iki yöntem ile gerçekleştirilebilir. Bir nanopartikülün etkili olabilmesi için tümör bölgesine ulaşması gerekmektedir. Öncelikle partikülün şekli, yükü, partikül büyüklüğü gibi karakterizasyon özellikleri pasif hedeflendirme için uygun olmalıdır. Ayrıca bu fiziksel özellikleri sayesinde günümüzde nanopartiküllerin hücre içi hedeflendirme yani organelleri hedefleyebileceği ifade edilmektedir. Daha etkili tedavi sağlamak ve kemoterapötiklere bağlı yan etkilerin azaltılabilmesi için ise tümöre aktif hedeflendirme oldukça cazip hale gelmiştir.

Bu tez kapsamında;

- Guanidino grubu içeren oligosakkarit yapıda amfifilik siklodekstrin ve polimerik siklodekstrin türevleri kullanılarak doksorubisin, siklofosfamid ve vinkristini içeren ve rituksimab ile aktif hedeflendirilmiş ve guanidino grubu sayesinde mitokondriyal hedefleme yapabilen siklodekstrin nanopartiküller hazırlanarak ileri tekniklerle *in vitro* ayrıntılı karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- Siklodekstrin nanopartiküllerin yapısında bulunan guanidino grubundan faydalanılarak hücresel alımın artması ve bu sayede hedeflenen kanserli hücrelerdeki ilaç birikiminin de artması sağlanmıştır.
- Rituksimab'ın etkinliğinin azalmadan nanopartiküler sisteme dahil edildiği gösterilmiştir.
- Rituksimab dirençli NHL hücre grubu geliştirilmiş ve dirençsiz hücre grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirme yapılmıştır. Her iki hücre grubunda da çalışılarak, üç etkin maddenin aynı nanopartiküler sistemle fiziksel karışım halinde taşınması sayesinde hedefleme ve sinerjik etki kaynaklı olarak daha fazla antikanser etkililik sağlandığı *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir.
- 3B hücre kültürü sayesinde lenfoma modelinin *in vitro* ortamda daha başarılı taklit edilmiş ve bu sayede formülasyonların etkililikleri dirençli ve dirençsiz hücre gruplarında daha gerçekçi olarak değerlendirilmiştir.
- Hayvan deneyleri kapsamında sağlıklı fare modelinde Rituksimab-siklofosfamid-vinkristin-doksorubisin serbest çözelti formundaki konvansiyonel tedaviyle karşılaştırmalı olarak nanoilacın intravenöz yoldan uygulamasıyla konsantrasyon-zaman profilleri elde edilmiş, biyoyararlanım ve farmakokinetik parametreler hesaplanmış ve nanopartiküler formülasyonun biyoyararlanım üzerine etkisi belirlenmiştir.
- Hayvan deneylerinin ikinci aşamasında ise NHL tümör indüklenmiş hayvan modelinde nanopartiküle bağlı Rituksimab-siklofosfamid-vinkristin-doksorubisin tedavisinin konvansiyonel çözelti formunda tedaviyle karşılaştırmalı olarak antitümöral etkinliği gösterilmiştir.

- Hayvan çalışmalarında ayrıca nanopartikuler formülasyonun güvenlilik profili değerlendirilmiş ve böylelikle güncel tedavide kullanımı sorunlu olan prednizon uygulamasının da önüne geçilebileceği ve buna bağlı yan etkilerin azaltılabileceği saptanmıştır.

Böylece, nanoteknolojinin klinik uygulamasına dayalı kapsamlı bir tez çalışması yapılmış olup, mevcut tedavinin nanoila şeklinde uygulanmasının avantajları ve olası zorlukları açıkça değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2023 yılı tanımlamasına göre kanser, hücrelerin anormal ve kontrolsüz büyümesiyle karakterize edilen karmaşık ve değişken bir hastalık grubudur. Bu hücreler hızla çoğalabilir, normal sınırlarını aşabilir ve potansiyel olarak yakındaki dokuları istila edebilir. Metastaz süreci özellikle endişe vericidir; kanser hücreleri kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla vücudun diğer bölgelerine gidebilir ve uzak organlarda yeni tümörler oluşturabilir. Metastaz, kanserin yayılmasına ve şiddetine katkıda bulunan, genellikle tedaviyi daha zor hale getiren ve prognozu etkileyen önemli bir faktördür (7). 2024 yılı sonuna kadar Amerika Birleşik Devletlerinde toplamda yaklaşık 2.001.140 yeni kanser vakası ortaya çıkması ve her gün yaklaşık 5.480 kişiye kanser teşhisi konması tahmin edilmektedir (8). Türkiye'ye ait 2022 yılı verilerini değerlendirdiğimizde ise 240.013 kişiye kanser teşhisinin konduğu ve mortalitenin 129.672 olduğu belirlenmiştir (9).

2.2. Kanserde İlaç Direnci

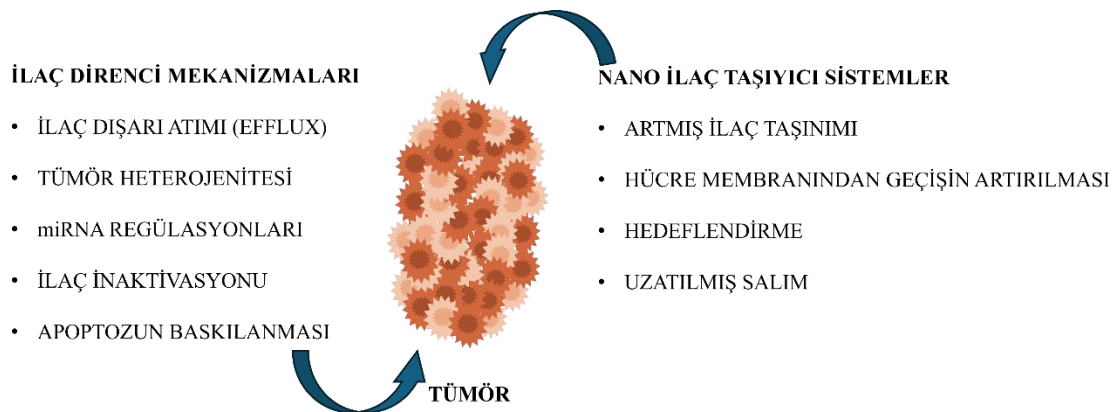
İlaç direnci, hastalıkların farmasötik tedavilere toleranslı hale gelmesiyle ortaya çıkan bir olgudur. Bu kavram ilk olarak bakterilerin belirli antibiyotiklere dirençli hale gelmesiyle ortaya çıkmıştır ancak benzer mekanizmaların kanser dahil olmak üzere diğer hastalıklarda da ortaya çıktığı keşfedilmiştir. Bazı ilaç direnci mekanizmaları hastalığa özgüdür, bazıları ise evrimsel olarak korunarak günümüze kadar gelmiştir (10).

İlaç direnci içsel ve/veya edinilmiş faktörlere bağlı olarak ortaya çıkabilir. İçsel direnç şunlara atfedilebilir:

- (a) ilaç inaktivasyonu,
- (b) ilaç hedefinin değişen ekspresyonu ve/veya işlevi,
- (c) hücresel membran boyunca değişen ilaç taşınması veya

(d) hedeflenen bölgede gerçekleşen mutasyonlar ve ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler sebebiyle (11) ilaç ile moleküler hedefi arasındaki etkileşim verimliliğinin azalması.

Öte yandan edinilen ilaç direnci, ilaca dirençli kanser hücresi klonlarının gelişimini kolaylaştıran veya ilgili metabolik yollarda yer alan enzimlerde mutasyonları tetikleyen genetik veya çevresel faktörlerden etkilenir (12).



Şekil 2.1. Tümorede ilaç direncine sebep olan faktörler ve ilaç direncini aşmak için nano ilaç taşıyıcı sistemler (13)

Bir tümör sadece kanser hücre grubu değil aksine infiltratif ve yerleşik konak hücreler, salgılanan faktörler ve hücreler arası matriksin heterojen bir koleksiyonudur. Kanser hücreleri, tümör büyümesini ve ilerlemesini desteklemek için konak dokularında önemli moleküler, hücresel ve fiziksel değişiklikleri uyarır. Gelişmekte olan bir tümör mikroçevresi (TME) karmaşık ve sürekli olarak evrilen bir varlıktır. TME bileşimi tümör tipleri arasında değişse de genellikle bağışıklık hücreleri, stromal hücreler, kan damarları ve hücreler arası matriksi içerir. TME'nin kanser ilerlemesini aktif olarak teşvik eden, sadece sessiz izleyici olmayan bir rol oynadığı giderek daha fazla kabul edilmektedir. Tümör gelişiminin erken aşamalarında, kanser hücreleri ile TME bileşenleri arasında dinamik ve karşılıklı bir etkileşim gelişir. Bu etkileşim kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekler, metastazı teşvik eder. TME, hipoksik ve asidik mikroçevre tarafından ortaya konan zorlukları aşmak, oksijen ve besin kaynağını geri kazandırmak ve metabolik atıkları uzaklaştırmak için anjiyogenez mekanizmalarını düzenler. Ayrıca, tümörler, tümör büyümesini destekleyen (pro-tümörijenik) ve tümör büyümesini baskılayan (anti-tümörijenik) işlevler gösterebilen

çeşitli adaptif ve doğal bağışıklık hücreleri tarafından infiltrasyona uğrar. Tümörün fiziksel parametrelerinde, genomunda ve çevresindeki ortamda meydana gelen değişiklikler ilaç direncini tetiklemektedir. Tek ajanlı kemoterapiye direnç sorununun ilk çözümü olarak kombinasyon tedaviler ve doz sıklığının artırılması gibi yöntemler denenmektedir. Ancak gelişen çoklu ilaç direnci ve tolere edilemeyen yan etkiler sebebiyle daha etkili çözümlere ihtiyaç duyulmaktadır (14, 15) ve nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler kanserde ilaç direncinin üstesinden gelme konusunda oldukça umut vaad eden yaklaşımlar olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.1.).

2.3. Non- Hodgkin Lenfoma (NHL)

Lenfomalar vücudun her organını etkileyebilen, çok çeşitli semptomlarla ortaya çıkabilen bir hastalıktır. Gelişiminin çeşitli aşamalarındaki lenfositlerden kaynaklanırlar ve spesifik lenfoma alt tipinin özellikleri, kaynaklandıkları hücrenin özelliklerini yansıtır (16). Malign lenfomalar Hodgkin lenfoma ve NHL olarak ikiye ayrılır. HL tüm lenfomaların yaklaşık %10'unu oluştururken ve geri kalan %90'ı NHL türevleridir ve NHL en yavaştan en agresif malignitelere kadar değişen geniş bir hastalık yelpazesini temsil eder (17). HL ve NHL baş-boyun bölgesinde görülür ancak lenf nodu tutulumu olsun veya olmasın ektranodal hastalık NHL hastalarında daha sık görülür. Ektranodal tutulum, Waldeyer halkası (yani bademcikler, farenks ve dilin tabanı), tükürük bezleri, paranazal sinüsler ve tiroid bezleri gibi alanları içerir (18).

1990'larda Uluslararası Lenfoma Çalışma Grubu, biyolojik ilkelere dayalı bir NHL sınıflaması oluşturma kararı almıştır. Bu çaba, Revize Avrupa-Amerikan Lenfoid Neoplaziler Sınıflaması (REAL) olarak bilinen sistemi ortaya çıkardı (19). REAL sınıflaması, 2001'de DSÖ tarafından "Hematopoietik ve Lenfoid Dokuların Tümörlerinin Sınıflaması"na dönüştü ve 2008 ile 2016'da yenilendi. Son olarak da 2021 Eylül'ünde Uluslararası Konsensüs Sınıflandırması (ICC) yayımlandı (20, 21). DSÖ tarafından tanımlanan 60'tan fazla spesifik NHL alt tipi bulunmaktadır. Bu alt tipler, lenfoma hücrelerinin özelliklerine, görünümüne, hücre yüzeyindeki proteinlerin varlığına ve genetik özelliklerine göre kategorize edilmiştir. Alt tipler, hücre tipine

göre B hücresi (vakaların yaklaşık %90'ı), T hücresi veya NK hücresi NHL olarak sınıflandırılırken, hastalığın ilerleme hızına göre ise iki ana kategoriye ayrılır:

Agresif lenfomalar: Hızla ilerleyen ve tüm NHL vakalarının yaklaşık %60'ını oluşturan lenfomalardır. En yaygın agresif NHL alt tipi Difüze Büyük B Hücreli Lenfoma (DLBCL) olup, agresif NHL'nin en sık görülen türüdür.

İndolent lenfomalar: Yavaş ilerleyen ve genellikle ilk tanı konduğunda daha az belirti ve semptom gösteren lenfomalardır. Yavaş büyüyen veya indolent alt tipler, tüm NHL vakalarının yaklaşık % 40'ını temsil eder. Foliküler Lenfoma (FL), indolent NHL'nin en yaygın alt tipidir (22-24).

NHL riskini artıran bazı faktörler bulunmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemini zayıflatan durumlar veya tedaviler NHL riskini artırabilmektedir. Ayrıca, aşırı ultraviyole (UV) ışınına maruz kalmak da risk faktörleri arasında yer alır. Virüsler ve diğer patojenler, özellikle Epstein-Barr Virüsü (EBV), İnsan T-Lenfotropik Virüsü (HTLV), İnsan Herpes virüsü 8 (HHV8), Hepatit C Virüsü, SV40 (Simian Virüsü 40) ve *Helicobacter pylori* gibi etkenler de NHL gelişiminde rol oynayabilir. Otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıklar, örneğin Romatoid Artrit, Sjogren Sendromu ve Sistemik Lupus Eritematozus (SLE), NHL riskini artıran diğer faktörlerdir. Ayrıca, bazı mesleki maruziyetler, özellikle fenoksi asitler, organofosfatlar ve organoklorinler gibi pestisitler ve kimyasallarla uzun süreli temas da risk faktörleri arasında sayılmaktadır (25, 26).

NHL semptomları çok belirgin olmamakla birlikte aşağıda belirtilen şekillerde ortaya çıkabilir:

- Boyun, koltuk altı, kasık veya karın bölgesindeki lenf düğümlerinde şişlik
- Bilinmeyen bir sebeple ateş
- Gece terlemeleri
- Şiddetli yorgunluk
- Bilinmeyen bir sebeple kilo kaybı
- Cilt döküntüleri veya kaşıntılı cilt
- Bilinmeyen bir sebeple göğüs, karın veya kemiklerde ağrı

Ateş, gece terlemeleri ve kilo kaybı birlikte görüldüğünde, bu belirtiler B semptomları olarak adlandırılır. NHL ile ilişkili diğer belirtiler ise kanserin vücutta olduğu yere, tümörün büyüklüğüne ve tümörün ne kadar hızlı büyüdüğüne bağlı olarak değişebilir (27).

Tedavi seçenekleri ise sahip olunan NHL alt tipine ve evresine bağlıdır ancak en yaygın yöntemler;

- Kemoterapi
- Hedeflendirilmiş ve immünoterapötik ilaçlar
- Steroidler
- Radyoterapi ve
- Kök hücre naklidir (28).

Birçok kanser türünde olduğu gibi kemoterapi öncelikli seçenektir. NHL türüne bağlı olarak tek başına bir kemoterapi ilacı veya birden fazla kemoterapi ilacının kombinasyonu kullanılabilir. En yaygın kullanılan tedavi rejimi R-CHOP'tur. R-CHOP'taki her harf, tedavide kullanılan farklı bir ilacı temsil etmektedir.

R: Rituksimab (375 mg/m^2), CD20 adlı bir proteine bağlanarak kanserli B hücrelerini hedef alır ve bağışıklık sisteminin bu hücreleri yok etmesine yardımcı olur; iv infüzyon yoluyla uygulanır.

C: Siklofosfamid (750 mg/m^2), kanser hücrelerinin DNA'sını hasarlandırarak büyümelerini durdurur veya yavaşlatır ve iv bolus ya da iv infüzyon yoluyla verilir.

H: Hidroksidaunorubisin hidroklorür (Doksorubisin hidroklorür veya Adriamycin®) (50 mg/m^2), kanser hücrelerinin çoğalması için gerekli olan enzimi bloke ederek büyümelerini engeller ve iv bolus yoluyla uygulanır.

O: Oncovin® (Vinkristin sülfat) ($1,4 \text{ mg/m}^2$ maksimum doz 2 mg), kanser hücrelerinin bölünmesini durdurarak büyümelerini yavaşlatır; bu da iv infüzyon yoluyla yapılır.

P: Prednizon (50 mg/m² maksimum doz 100 mg) ise bir kortikosteroid olup, enflamasyonu azaltır, kanser semptomlarını hafifletir ve yan etkileri yönetmeye yardımcı olur; evde ağız yoluyla, tablet veya kapsül şeklinde alınır.

Tedavi döngüleri genellikle 21 gün arayla 6-8 kür şeklinde yapılır, ancak 14 gün aralıklarla da olabilir (29, 30).

İmmünoterapötikler ise lenfoma hücrelerinin yüzeyindeki benzersiz proteinleri tanıyacak şekilde tasarlanmış ilaçları içerir. Bu ilaçlar lenfoma hücrelerine bağlanarak, bağışıklık sisteminin onları bulup yok etmesini sağlar. Diğer immünoterapi ise lenfoma hücrelerinin bağışıklık sistemini baskılamasını engeller, böylece bağışıklık sisteminin lenfoma hücrelerini yok etme yeteneğini geri kazandırır. İmmünoterapinin lenfoma üzerindeki etkisi, bağışıklık sisteminin lenfoma hücrelerini hedef alma yeteneğine bağlıdır. Kullanılan immünoterapötiklerin türleri:

- **Antikor-İlaç Konjugatları (ADC):** Monoklonal antikorlar ve kemoterapi ilaçlarının birleşimidir. Örneğin, brentuximab vedotin (Adcetris) bu tür bir tedavi örneğidir. Bu tedavi lenfoma hücrelerinin yüzeyindeki proteinleri hedefler ve içeriye girerek hücreyi öldürür. Yan etkiler arasında düşük kan hücresi sayıları, sinir hasarı, anemi, yorgunluk ve bulantı bulunabilir.
- **Biyobenzer Tedaviler:** Var olan biyolojik tedavilere benzer şekilde üretilen tedavilerdir. Biyobenzerlerin referans ürün kadar etkili olmaları beklenir, ancak tamamen aynı olmayabilirler. Örnekler: Rituximab-abbs (Truxima) ve rituximab-pvvr (Ruxience).
- **Çift Yönlü Antikorlar (bsAbs):** İki farklı hedefe bağlanabilen yenilikçi immünoterapötiklerdir. Onlarca antijen tanıyabilirler. Örnekler: Mosunetuzumab-axgb (Lunsumio) ve Epcoritamab-bysp (Epkinly).
- **CAR-T Hücre Tedavisi:** Genetik olarak değiştirilmiş T hücreleri, lenfoma hücrelerinin yüzeyindeki antijenleri tanıyıp yok eder. Onaylı CAR-T hücre tedavileri arasında Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta), Brexucabtagene Autoleucel (Tecartus) bulunur.
- **Kontrol Noktası İnhibitörleri:** Bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanımasını engelleyen sinyalleri bloke eder. Onaylı kontrol noktası inhibitörleri, Nivolumab (Opdivo) ve Pembrolizumab (Keytruda)'dır.

- **Sitozin İlaçları:** Doğal sitokinlerin sentetik versiyonlarıdır ve bağışıklık yanıtını artırabilirler. Denileukin diftotox (Ontak) örnek verilebilir. Yan etkiler arasında grip benzeri semptomlar, düşük beyaz kan hücresi sayısı, döküntüler ve saç dökülmesi olabilir.
- **İmmünomodülatör İlaçlar:** Tümör hücrelerine karşı çeşitli şekillerde etki ederler. Onaylı örnekler Lenalidomide (Revlimid) ve Interferon Alfa-2b (Intron A)'dir.
- **Monoklonal Antikorlar:** Lenfoma tedavisinde kullanılan en yaygın biyolojik ajanlardır. Lenfoma hücrelerinin yüzeyindeki antijenleri hedef alırlar. Lenfoma tedavisi için onaylanmış monoklonal antikorlar şunlardır:
 - Alemtuzumab (Campath)
 - Mogamulizumab-kpkc (Poteligeo)
 - Obinutuzumab (Gazyva)
 - Ofatumumab (Arzerra)
 - Rituximab (Rituxan)
 - Tafasitamab (Monjuvi)
- **Radyoimmunoterapi (RIT):** Monoklonal antikorlarla bağlanmış radyasyon kaynağı içerir. Bu tedavi, lenfoma hücrelerine küçük dozda radyoaktivite vererek onları yok eder. Onaylı örnek ise Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin)'dir. Yan etkiler arasında ateş, üşüme, pnömoni, akciğer iltihabı ve düşük kan sayımları bulunabilir (31).

2.4. Nano İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanotıp, nanoölçek aralığındaki malzemelerin hastalıkların teşhis edilmesi, terapötik ve biyolojik ajanların belirli hedef bölgelere kontrollü bir şekilde iletilmesi için kullanılan nispeten yeni ancak hızla gelişen bir bilimdir alanıdır (32).

Nano ilaç taşıyıcı sistemler (NİTS) 40 yılı aşkın süredir çalışılan sistemlerdir ve hazırlanmasında kullanılan malzemelerin bileşimine göre,

1. Kendiliğinden birleşen sistemler (misel)
2. Hücre zarı bazlı biyomimetik taşıyıcı sistemler (eksozom)
3. Doğal polimerik taşıyıcı sistemler (siklodekstrin)
4. Polimerik taşıyıcı sistemler (PLGA)
5. Lipid nanopartikülleri (lipozom)
6. İnorganik nanopartiküller (altın nanopartikül)
7. Hibrit nanopartiküller olarak sınıflandırılabilirler (33, 34).

NİTS'ler benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde konvansiyonel dozaj şekillerine göre birçok üstünlüğe sahiptir.

- İstenen bölgeye, dokuya, hücreye pasif ve/veya aktif hedeflendirilmiş ilaç taşınması,
- İlaçların farmakokinetik özelliklerini geliştirilmesi,
- Kontrollü ilaç salınımı,
- İlacın kanda kalış süresinin uzatılması,
- Doz ve dozlama sıklığının azaltılması,
- Arttırılmış etkililik ve azaltılmış toksisite sağlanması,
- İlaç direncinin üstesinden gelmesi,
- Çoklu ilaç taşınmasını sağlanması gibi özellikleri sayesinde tedavi etkinliğinin artırılmasında oldukça umut vaat eden sistemlerdir (35).

2.5. Tümör Hedefleme Stratejileri

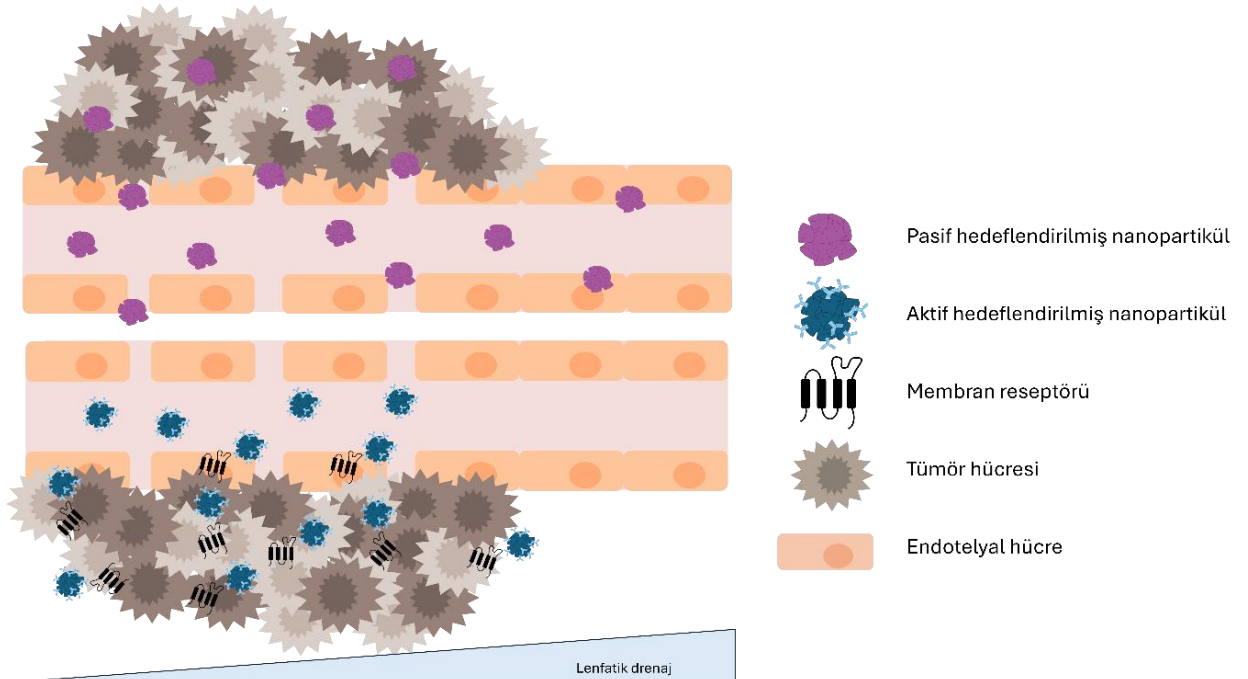
NİTS'in temel amacı, hedefleme stratejileri kullanılarak ilacın belirlenen hedef alana optimum konsantrasyonda ve uygun zamanda salımının sağlanmasıdır (36).

Hedeflendirilmiş NİTS, sağlıklı hücrelerin toksik bileşiklerden korunması, doza bağlı yan etkilerin en aza indirilmesi ve ilaca dirençli kanser hücrelerinin üstesinden gelinmesi gibi çok sayıda fayda sunar (37).

İyi tasarlanmış bir NİTS, ideal olarak mononükleer fagositik sistem tarafından temizlenmemeli, hedef dokularda yeterli birikimi sağlamak için kan dolaşımında uzun süre kalabilmeli, hedef hücreler tarafından içselleştirmeyi kolaylaştırmalı ve düşük

toksinite sergilemelidir. NİTS'lerin boyut, yük ve şekil gibi fiziksel özellikleri, terapötik etkinliği optimize etmek için değiştirilebilir. İlaç hedefleme için pasif ve aktif hedeflendirme olarak iki ana strateji (Şekil 2.2) vardır (38). Ayrıca içsel ve dışsal tetikleyicilerle ilaç taşınması ve salımını sağlayan hedeflendirme stratejileri de günümüzde oldukça kullanılmaktadır (39).

- Pasif hedefleme, hem ilaç taşıyıcısının hem de tümörün fiziksel özelliklerine bağlı olarak ilaçların tümör dokularında birikmesine dayanır.
- Aktif hedefleme ise NİTS yüzeyindeki ligandlar ile hedef hücrelerdeki reseptörler arasındaki moleküler etkileşimleri içerir. Bu hedefleme yaklaşımı, kan dolaşımında bulunan NİTS'nin tümör dokusuna ekstravaze olduktan sonra ligand-reseptör bağlanması yakın mesafede (0,5 mm'den az) gerçekleşmektedir (40).
- Uyarılarla ilaç taşınmasını sağlayan içsel tetikleyiciler arasında pH, redoks durumu, hipoksi ve enzimler yer alırken, dışsal uyarılar arasında ışık, sıcaklık, alternatif manyetik alan (AMF) ve ultrason (US) gibi faktörler bulunur (41).



Şekil 2.2. İlaç taşıyıcı sistemlerde hedeflendirme mekanizmaları

2.5.1. Pasif Hedeflendirme

NİTS, tümör damar sisteminin sızdıran endotelyumuna nüfuz ederek çeşitli katı tümörlerde birikebilirler. Bu fenomen, artan geçirgenlik ve tutulma (*EPR Enhanced Permeation and Retention*) etkisi olarak bilinir. NİTS kan dolaşımında daha uzun süreli dolaşım için modifiye yüzeylerle tasarlandığında bu kavrama pasif hedeflendirme adı verilir (42).

Kanserli hücrelerin hızlı büyümesi, yeni kan damarlarının oluşumunu (neovaskülarizasyon) veya tümörün yakınındaki mevcut damarların oksijen ve besin sağlamak üzere yeniden yönlendirilmesini gerektirir. Bu süreç, büyüme faktörleri gibi anjiyojenik düzenleyicilerin dengesizliği ve matris metaloproteinazların enzimatik etkisi ile sonuçlanır, bu da oldukça düzensiz ve genişlemiş tümör damarlarının gelişmesine yol açar. Bu damarlar, endotel hücreleri arasında genişlemiş aralık bağlantılarına ve bozulmuş lenfatik drenaja sahip çok sayıda gözenek sergiler. EPR etkisi, molekül ağırlığı 50 kDa'dan büyük olan NİTS de dahil olmak üzere makromoleküllerin, özellikle tümör interstisyumu içinde birikmesinde çok önemli bir rol oynar. Bu fenomen, tümör damar sistemiyle ilişkili artan damar geçirgenliği ve zayıf lenfatik drenaj nedeniyle bu NİTS'in tümörlerde pasif olarak birikmesine izin verir (43).

NİTS partikül boyutu, yüzey yükü ve şekli gibi fiziksel özellikleri pasif hedefleme için gerçekten çok önemlidir. NİTS, neovaskülatürün sızdıran gözeneklerinden etkili bir şekilde ekstravaze olmak ve tümör interstisyumu boyunca yayılmak için uygun boyutta olmalıdır. Geçirgen damar sistemi için epitel açıklığı boyutu büyük ölçüde değişir, tipik olarak 200 ila 800 nm arasındadır. Bu nedenle, EPR ile hedefleme yaklaşımından faydalanabilmek için NİTS büyüklüğünün kontrol edilmesi önemlidir (44). Son çalışmalar, büyüklükleri 10 ila 500 nm arasında değişen NİTS'in, EPR etkisinden yararlanmada en etkili olduğunu göstermektedir. Ancak bu gibi durumlarda daha düşük ağırlık ve küçük partikül büyüklüğüne sahip moleküllerin tümör interstisyumundan dışarı yayılabileceği gözlenmiştir. Bu nedenle, NİTS büyüklüğünün optimize edilmesi, hedef bölgeden erken difüzyonu en aza indirirken tümörlerdeki etkili birikimi dengelemek için gereklidir (45). NİTS için optimal boyut aralığı, 400 nm'den çok daha küçük boyutlarda olduğunda EPR yoluyla etkisiyle

ekstravazasyonu kolaylaştırır. Ek olarak, böbrekler tarafından filtrasyonu önlemek için NİTS boyutu 10 nm'yi aşmalı, karaciğer tarafından spesifik yakalamayı önlemek için ise boyutları 100 nm'nin altında kalmalıdır (46).

NİTS'in lipid bileşimleri, nanopartikül stabilitesi ve organizma ile etkileşim açısından modifiye edilebilir. Örneğin Doxil® olarak bilinen lipozomal DOX, belirli bir molar oranda hidrojenlenmiş soya fosfatidilkolin (DSPC), kolesterol ve PEG-lipitinden oluşan bir lipozom içinde hapsedilmiş FDA onaylı ilk nanoilaçtır. Yaklaşık yirmi yılda geliştirilen bu formülasyon, EPR etkisinden yararlanmak, uzatılmış kan dolaşım süresi sağlamak, hedef bölgede artmış ilaç birikimi sağlamak ve azaltılmış yan etki profili gibi belirli üstünlüklere ulaşmayı amaçlamıştır (47).

NİTS yüzey yükü, hücrelerle ve biyolojik ortamlarla etkileşimlerini önemli ölçüde etkiler(48). Pozitif yüklü NP'ler, elektrostatik çekim yoluyla hafif negatif yüklü hücre zarlarına güçlü bir şekilde yapışma eğilimindedir ve bunların içselleştirilmesini kolaylaştırır. Pozitif yüklü NİTS hücre içine girdikten sonra lizozomlarla birleşen kesecik oluşumunu indükleyebilir. Bu işlem, partiküllerin pozitif yükünü nötralize etmek için gereken klorür iyonlarının birikmesi nedeniyle lizozomun şişmesine ve yırtılmasına yol açabilir. Bu, NİTS'in lizozomal bozulmadan kaçmasına, hücre çekirdeğinin yakınında lokalize olmasına ve tümör hücrelerini etkili bir şekilde öldürmesine olanak tanır. Buna karşılık, negatif yüklü ve nötr NİTS tipik olarak lizozomlarla birlikte lokalize olur ve pozitif yüklü NİTS'de görülen perinükleer lokalizasyonu veya güçlü sitotoksik etkileri gösterme yeteneğinden yoksundur. Biyolojik düzeyde, pozitif yüklü NİTS vücuda girdiğinde, etraflarında bir "protein korona" oluşturan proteinleri çekerler ve genel yüklerini negatife dönüştürürler. Bu fenomen hücresel içselleştirmeyi engelleyebilir (49). Ancak Kurtz-Chalot ve ark. silika nanopartiküllerin toksisitesini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada aynı partikül boyutuna sahip nötral, amin grubu bağlı pozitif ve karboksil grubu bağlı negatif yüklü üç farklı silika nanopartikül grubu oluşturmuşlardır. RAW 264.7 fare makrofajlarını 20 saat boyunca silika nanopartikülleriyle inkübe ettikten sonra florimetrik analiz yaparak yüksek pozitif yüklü silika nanopartiküllerin hücre yüzeyinde en fazla absorbe edildiği ve diğer gruplardan daha fazla sitotoksositeye sebep olduğunu göstermişlerdir (50).

2.5.2. Aktif Hedeflendirme

Aktif hedefleme, normal dokular üzerindeki etkiyi en aza indirirken ilaçları, genleri ve teranostikleri hedeflenen yerlere tam olarak ulaştırmak, böylece terapötik etkinliği artırmak ve yan etkileri azaltmak için çok önemlidir. Aktif hedefleme, tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen reseptörlere bağlanan ligandlarla nanotaşıyıcı yüzeyleri modifiye ederek, serbest ilaçlara veya pasif olarak hedeflenen NİTS'e kıyasla ilaç hedefleme etkinliğini artırır. Bu yaklaşım, tümör bölgelerinde ilaç birikimini, sistemin hasasiyetini ve seçiciliğini belirgin şekilde artırabilir (37, 42).

Aktif hedefleme stratejisi, iki ana hücre hedefi üzerine odaklanmaktadır. İlk hedef, kanser hücrelerinin doğrudan hedeflenmesidir. Bu hedef doğrultusunda, belirli kanser türlerinde yüksek miktarda bulunan transferrin, folat, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) veya glikoprotein reseptörleri gibi spesifik moleküller hedef alınabilir. İkinci hedef ise tümör endotelinin hedeflenmesidir. Tümör dokusunda anjiyogenez (yeni damar oluşumu) sağlamak amacıyla VEGF, integrinler, vasküler hücre adezyon molekülleri ve matris metalloproteinazlar gibi moleküller aşırı derecede ekspresyon gösterir. Bu moleküllere uygun ligandlarla donatılmış nanopartiküller, tümöre özgü olarak hedeflenebilir. Transferrin Reseptörü, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ve Folat Reseptörü gibi hücre yüzeyinde bolca bulunan reseptörler, ligandlar aracılığıyla hedeflenebilir. Ayrıca, antikor ve peptit bazlı hedefleme yöntemleri de kullanılabilir (51-61).

Monoklonal Antikorlar ile Aktif Hedeflendirme

Monoklonal antikorlar (mAb'ler), ilk kez Kohler ve Milstein tarafından hibridoma teknolojisi kullanılarak başarıyla üretilmiştir (62). Genellikle kökenlerine göre fare kaynaklı (murin), kimerik, humanize ve insan kaynaklı olmak üzere dört gruba ayrılmaktadırlar (63).

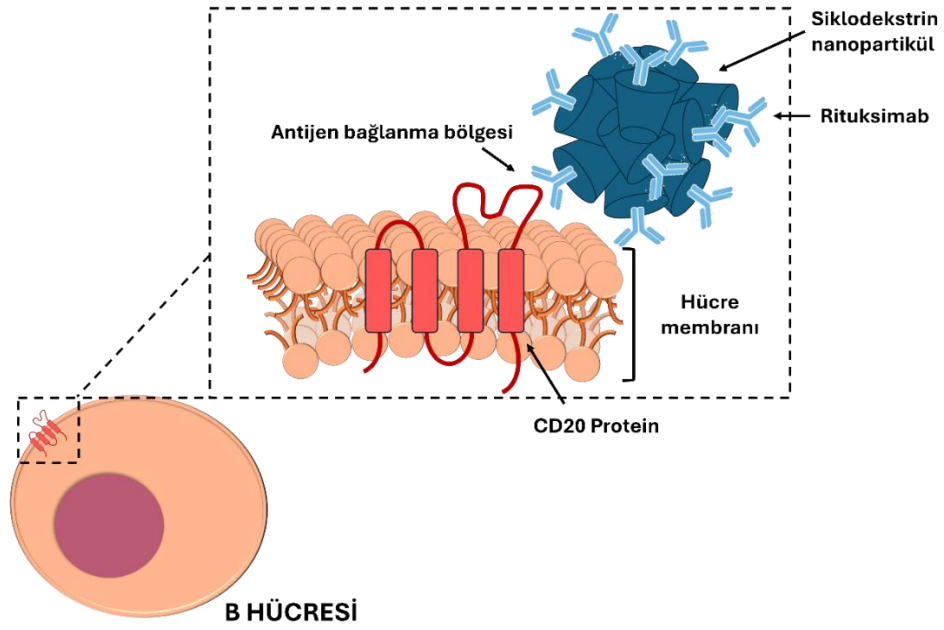
Orthoclone OKT®-3 (muromonab-CD3), ilk fare kökenli monoklonal antikor olup, 1985 yılında FDA tarafından insanlarda klinik kullanım için onaylanmış ve böbrek nakli sonrası antirejeksiyon tedavisinde kullanılmıştır. Ancak, fare kökenli antikorların ciddi enfeksiyon riski, duyarlılaşma ve anti-OKT3 antikor oluşumu gibi

sorunları, 'humanize' antikorlar üzerine yapılan araştırmaları hızlandırmıştır. 1997 yılında FDA tarafından onaylanan ikinci mAb olan Rituxan® (rituksimab), refrakter B-hücreli NHL tedavisi için ilk kimerik monoklonal antikordur. Bir yıl sonra, katı tümörlere yönelik ilk humanize mAb olan Herceptin® (trastuzumab), FDA onayı almış ve kısa sürede önemli bir mAb ürünü haline gelmiştir (64).

mAb, özel olarak hedeflenen hücreler veya dokular üzerinde belirli moleküller veya antijenlerle spesifik olarak etkileşime girerler. Bu özellikleri, NİTS' in doğrudan hedef dokuya taşınmasını ve istenilen biyolojik etkilerin elde edilmesini sağlar. Örneğın, kanser hücrelerini hedef almak için geliştirilen NİTS'ler, bu hücrelere özgü antijenleri tanıyan mAb'larla kaplanabilir. Bu sayede, kanser hücreleri üzerinde daha spesifik ve etkili bir etki sağlanabilirken, sağlıklı dokuların zarar görmesi önlenmiş olur (65). Literatürde karşımızda son yıllarda daha fazla çıkan bu hedefleme yöntemini kullanan Chiang ve ark., çift emülsiyon yöntemiyle hazırladıkları DOX ve paklitaksel yüklü Trastuzumab ile aktif hedeflendirilmiş nanokapsül formülasyonlarını hedeflenmemiş nanokapsüllerle karşılaştırıldığında, aktif hedeflendirilmiş nanokapsüllerin HER-2 aşırı ekspresyonu gösteren tümör hücreleri tarafından daha yüksek oranda alınabildiğini göstermişlerdir (66).

CD 20

CD20, diğer dokularda az bulunurken B hücrelerinde fazlaca eksprese edilen bir yüzey proteindir ve bu da onu B hücre kaynaklı malignitelere karşı immünoterapi için ideal bir hedef haline getirmektedir (Şekil 2.3). CD20 ifadesi, B hücresi öncesi (pre-B hücresi) aşamada başlar ve B hücreleri plazma hücrelerine terminal farklılaşmaya uğrayana kadar devam eder. CD20 salınmaz, değiştirilmez ve hücre içine alınmaz. CD20'in kesin fonksiyonu bilinmemekle birlikte hücre içine kalsiyum salımından sorumlu olduğu ve kalsiyum konsantrasyonunun devamlılığından sorumlu olduğu düşünölmektedir. Bu şekilde de B lenfositlerin aktivasyonunda rol oynadığı düşünölmektedir (67).



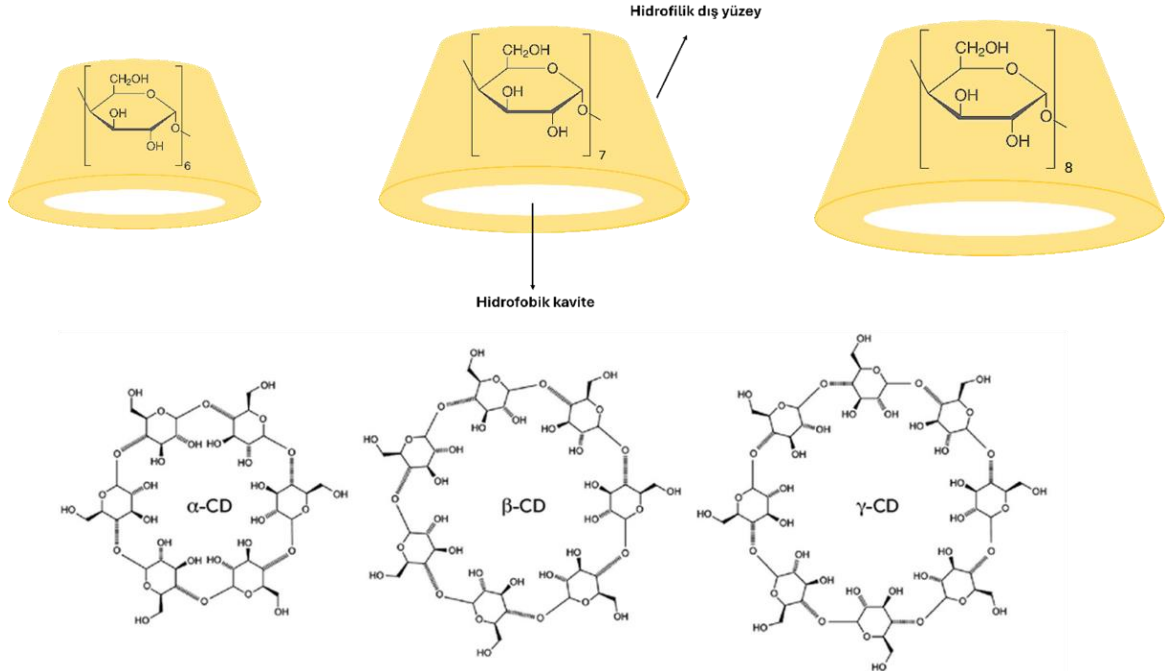
Şekil 2.3. Anti-CD20 monoklonal antikoru (RTX) ve CD20 reseptörü arasındaki etkileşim

2.6. Siklodekstrinler

Siklodekstrinler (CD'ler), α -1,4 bağlı glikopiranoz birimlerinden oluşan siklik oligosakaritlerdir. Doğal polimerler olan CD'ler, nişastanın glukoziltransferaz enzimi ile bozunmasıyla üretilir ve biyoyumlu olmaları nedeniyle geniş bir kullanım alanına sahiptirler.

Tarım, gıda, tekstil ve kozmetik endüstrilerinde çeşitli kullanımlara sahip olan CD'ler ilk olarak 1891 yılında Antoine Villiers tarafından keşfedilmiştir. 1953 yılında ise Freudenberg ve ekip arkadaşları, ilaç formülasyonlarında kullanılmaları için ilk patenti almışlardır. CD'ler, glikopiranoz alt birimlerinin sayısına göre sınıflandırılır; en yaygın türler α -CD (6 birim), β -CD (7 birim) ve γ -CD (8 birim) olarak bilinir (Şekil 2.4). Daha az alt birime sahip CD'ler, sterik engeller nedeniyle oluşmazken, 9 veya daha fazla glikoz ünitesine sahip olanların saflaştırılması oldukça zordur. CD'lerin üç boyutlu yapısı konik şeklindedir ve dar yüzde primer, geniş yüzde ise sekonder hidroksil gruplarını barındırır. Bu yapı, CD'lerin hidrofobik iç kavitelerine hidrofobik

ilaçları hapsedip su içinde çözünebilen kompleksler oluşturmalarına imkan tanır, bu nedenle farmasötik uygulamalarda büyük önem taşır (68-70).



Şekil 2.4. Framasötik alanda en sık kullanılan siklodekstrin tipleri ve şematik gösterimleri

β -CD'ler, büyük iç kavite hacmi sayesinde aromatik halkalarla etkileşim kurabilecek kapasiteye sahip oldukları için farmasötik uygulamalarda oldukça ilgi çekicidirler. Ancak, doğal CD'ler ve inklüzyon kompleksleri suda sınırlı çözünürlük gösterir. Özellikle β -CD, sıkı intramoleküler hidrojen bağları nedeniyle suyla daha uyumlu olup daha güçlü bir kristal yapı oluşturur. Buna rağmen, β -CD'lerin çözünürlüğü, α -CD'lere göre daha düşüktür (68). Bu durum, ikincil hidroksil grupları arasındaki iç hidrojen bağlarının çözünürlüğü sınırlamasından kaynaklanır. β -CD'nin çözünürlüğünü artırmak için hidroksil gruplarını farklı kimyasal gruplarla değiştirmek mümkün olsa da, bu işlem kompleksleşme yeteneğini olumsuz etkileyebilir.

CD'lerin kimyasal modifikasyonları, genellikle 2-, 3- ve 6-hidroksil gruplarına yeni işlevsel gruplar eklenerek yapılır. Bu modifikasyonlar, CD'lerin kimyasal özelliklerini ve fonksiyonlarını değiştirmek için kullanılır ve böylece çeşitli uygulama

alanlarında performanslarını artırır. Avrupa Farmakopesi (EP) ve Amerikan Farmakopesi (USP), bu modifikasyonların karakterizasyonunda anhidr glukoz birimi başına süstitüsyon sayısını temel kriter olarak belirler (37). β -CD için maksimum süstitüsyon sayısı 21'dir. CD'lerin farmasötik etkinliğini artırmak amacıyla modifiye CD türevleri sentezlenir. CD'lerin modifikasyonlarının başlıca nedenleri şunlardır:

- ***Suda Çözünürlüklerini Artırmak:*** Özellikle β -CD gibi suda çözünürlüğü sınırlı olan CD'lerin çözünürlüklerini artırarak, kaviteye giren ilaçların daha iyi çözünmesini sağlayabilir ve biyoyararlanımlarını artırabilirler.
- ***İnklüzyon Komplekslerinin Kapasitesini Artırmak:*** CD'lerin hidrofobik iç kaviteleri, ilaçların veya diğer aktif bileşenlerin daha etkili şekilde kapsüllenmesine olanak sağlar.
- ***Fiziksel ve Mikrobiyolojik Stabiliteyi Geliştirmek:*** Modifikasyonlar, CD'lerin fiziksel stabilitesini ve mikrobiyolojik dayanıklılığını artırarak, ürünlerin raf ömrünü uzatır.
- ***Konuk Moleküllerin Kimyasal Aktivitelerini Kontrol Etmek:*** CD'ler, konuk moleküllerin kimyasal aktivitelerini ve reaktivitesini düzenleyerek, istenmeyen yan etkileri minimize edebilir.
- ***Parenteral Toksisiteyi Azaltmak veya Ortadan Kaldırmak:*** CD'lerin toksik etkilerini azaltarak, özellikle parenteral ilaçlarda güvenliği artırmak (71).

Modifiye CD türevleri arasında metillenmiş, sülfobütilerlenmiş ve hidroksipropillenmiş β -CD türevleri, GRAS (Genellikle Güvenli Kabul Edilir) statüsüne sahip olup, bu da onların güvenli kullanımlarını ve geniş uygulama alanlarını destekler (72). Avrupa İlaç Ajansı (EMA), CD'ler ile ilgili yayınladığı kılavuzlarda bu bileşenlerin oral, parenteral, nazal, rektal, dermal ve oküler kullanımları hakkında bilgiler sunmuştur (71). EMA kılavuzlarına göre, CD'ler, ilaçların suda çözünürlüklerini ve biyoyararlanımlarını artırmak için kullanılan siklik oligosakkaritler olarak tanımlanmaktadır. Farklı CD türevleri ile hazırlanmış çeşitli müstahzarlar mevcuttur. Özellikle tablet formülasyonlarında çözünürlüğü arttırmak, kötü tadı maskeleyerek, salım profilini değiştirmek stabiliteyi arttırmak ve yan etkileri azaltmak için yardımcı madde olarak tercih edilmektedirler (73, 74). Kou ve ark., suda düşük çözünürlüğe sahip antikonvulsan karbamazepin içeren tablet

formülasyonlarında HP- β -CD kullanarak piyasa preparatına oranla çözünürlüğün %95 oranında arttığını ortaya koymuşlardır (75). Piyasada ise Pansporin T[®](Sefotiam heksetil hidroklorür) ve Opalmon[®] (OP-1206) tabletlerinde α -CD; Zyrtec[®] (Setirizin) ve Mobital[®] (Meloksikam) tabletlerinde β -CD türevleri yardımcı madde olarak kullanılmıştır (76).

2.7. Non-Hodgkin Lenfoma, Güncel Tedavi Yaklaşımları ve Karşılaşılan Sorunlar

Günümüzde NHL hastalarına yönelik çeşitli tedavi yaklaşımları mevcuttur. Tedavi seçimini belirleyen faktörler arasında hastalığın evresi, türü ve hasta geçmişi yer almaktadır. Diğer kanser türlerinde olduğu gibi, NHL tedavisinde de kemoterapi temel bir yaklaşımdır. Ayrıca, tedavi ve palyatif amaçlarla NHL hastalarına radyoterapi de uygulanabilir; bu, tek başına veya kemoterapi ile birlikte yapılabilir (77). İmmünoterapide ise, kanser hücrelerinin yüzeyindeki belirli antijenlere yönelik spesifik hedefleme yapılır ve bu amaçla mAb'lar kullanılır. NHL tedavisinde sıklıkla hedeflenen antijenler arasında CD20, CD52, CD30 ve CD79b bulunur (78).

NHL tedavisinde genellikle CHOP olarak bilinen 4 ilaçlı kemoterapi rejimi uygulanır. Bu rejim DOX, CYC, VRC ve prednizon içerir. Bu tedavi planında, üç farklı antikanser ilaç intravenöz yolla uygulanırken, kortikosteroid prednizon ise oral olarak verilir. Tedavinin etkinliğini artırmak için, monoklonal antikor RTX'in de eklendiği R-CHOP protokolü günümüzde NHL hastaları için birinci basamak standart tedavi olarak kullanılmaktadır (23). Genel olarak, tedavi öncesinde hastaya 375 mg/m² RTX intravenöz olarak uygulanır. RTX'i takiben tedavinin ilk gününde CYC 750 mg/m², DOX 50 mg/m² bolus enjeksiyon ve VRC 1,4 mg/m² bolus enjeksiyon şeklinde uygulanır (79). Tedavi sırasında ilk gün başlanarak, 5 gün süreyle 100 mg prednizon oral olarak verilir. Bu tedavi döngüsü, 21 günde bir 6-8 kür şeklinde tekrarlanır. Klinik çalışmalarda tedavi yoğunluğunu 14 günlük döngüye çıkarmak denenmiş, ancak bu yöntemin standart 21 günlük döngüden daha etkili olmadığı, daha pahalı olduğu ve trombositopeni gibi toksisite risklerinin arttığı belirlenmiştir (80).

Klinikte NHL tedavisinde R-CHOP rejiminde kullanılan prednizon, glukokortikoidler olarak bilinen steroid hormonlar grubundandır (81). Kortizon,

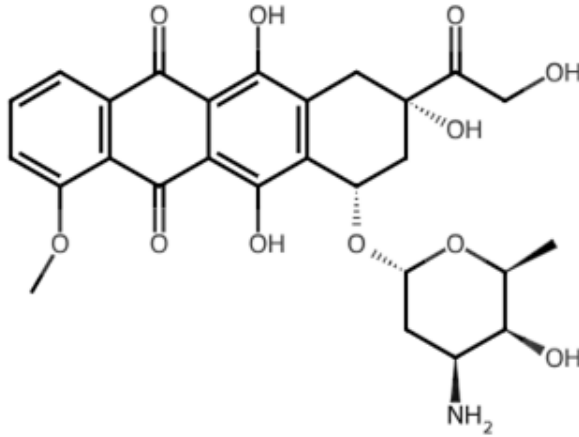
lenfoid dokunun hacmini, yapısını ve işlevini etkileyerek çeşitli etkiler sağlar. Kanser tedavisinde kortizonun kullanımı, sadece antikanser etkisini artırmakla kalmaz, aynı zamanda kemoterapinin neden olduğu bulantı, ağrı, iştah kaybı gibi yan etkileri de azaltmayı hedefler. Bununla birlikte, prednizon gibi glukokortikoidlerin kullanımı, kilo artışı, immünosupresyon ve osteoporoz gibi birçok yan etkiye neden olabilir (82). CHOP tedavisi gören lenfoma hastalarında yapılan bir araştırmada, steroid kullanımına bağlı diyabet riskinin %30'un üzerinde olduğu bulunmuştur. Ayrıca, diyabet veya steroid kaynaklı hiperglisemi, multipl miyelom ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) gibi diğer hematolojik malignitelerde de mortalite ile ilişkili olabilmektedir (83).

NHL hastalarının bazıları, R-CHOP tedavisinde kullanılan ilaçlardan bir veya birkaçına primer direnç geliştirebilirken, diğerleri tedavi sürecinin herhangi bir aşamasında direnç geliştirebilmektedir. R-CHOP tedavisi başarısız olan hastaların yaklaşık %20'si, tedavi sırasında veya hemen sonrasında primer refrakter hastalık (tedaviye rağmen ilerleme) yaşarken, %30'u ise tam iyileşme sağlandıktan sonra tekrar hastalığa yakalanmaktadır (84). NHL hastalarında tedavi sırasında veya sonrasında direnç gelişmesinin temel nedenlerinden biri, kemoterapinin diğer birçok kanser tedavisinde olduğu gibi kürler halinde uygulanmasıdır. R-CHOP tedavi rejiminde ilaçlar, toksisite nedeniyle 3 haftada bir yapılan kürler halinde verilmektedir. Bu aralarındaki sürede tümörlerin küçülmesi veya tamamen ortadan kalkması beklenirken, agresif huylu tümörlerin büyümesi ve yayılması da görülebilmektedir. Ayrıca, tekrarlanan RTX uygulamaları, RTX'a karşı spesifik direnç gelişimine neden olabilir. NHL hastalarının yaklaşık %50'si ilk RTX dozuna karşı direnç geliştirebilir, ve bu ilaca duyarlı hastaların yaklaşık %60'ında ise ikincil direnç ortaya çıkmaktadır (85).

Kanser tedavisinde geliştirilen yeni yöntemler ve kazanımlara rağmen, hem geleneksel kemoterapötik ajanlara hem de yeni hedeflenmiş ilaçlara karşı direnç, önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Her yeni ilaç veya formülasyonun yanında, kanserin direnç geliştirme olasılığı da oldukça yüksektir. Çünkü kanser, birçok farklı hücre ve bileşenin bir arada bulunduğu karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu heterojen yapı, tümör dokusunun direnç kazanarak hayatta kalmasını sağlayan çeşitli mekanizmalar geliştirmesine olanak tanır. Maalesef, ilaç direnci ve bunun sonucunda

tedavinin etkisiz hale gelmesi, kanser tedavisinde başarısızlığa yol açmaktadır. İlaç direncinin ve tedavi etkinliğinin azalmasının, kansere bağlı ölümlerin %90'ından sorumlu olduğu belirtilmektedir (86).

2.7.1. Doksorubisin



$C_{27}H_{29}NO_{11}$

Moleküler ağırlık: 543.5 g/mol

Suda çözünürlük: 10 mg/mL

E.N: 229-231 °C

Şekil 2.5. Doksorubisin kimyasal yapısı

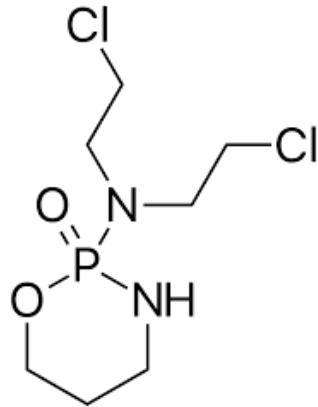
DOX, antrasiklin grubuna ait bir kemoterapötik ilaçtır. DOX'in (Şekil 2.5) kanser hücrelerinde etki gösterdiği iki temel mekanizma vardır:

1. DNA'ya yerleşme ve topoizomeraz-II aracılığıyla DNA onarımının bozulması: DOX, DNA'ya interkalasyon yaparak, DNA çift sarmalının içine yerleşir ve onun yapısını bozar. Bu süreç, topoizomeraz-II enziminin inhibisyonuna yol açar ve DNA'nın sarmalının yeniden oluşması ile onarımını engeller, sonuç olarak hücrenin çoğalma yeteneği ortadan kalkar ve hücre ölümü gerçekleşir (87).
2. Serbest radikallerin oluşumu ve hücre zarlarına, DNA'ya ve proteinlere zarar vermesi: DOX, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi serbest radikallerin üretimine neden olur. Bu serbest radikaller, hücre zarları, DNA ve hücresel proteinlerde ciddi hasarlara yol açarak hücresel stres ve hasara sebep olur (88).

DOX, akut miyeloid lösemi, akut lenfoblastik lösemi, multiple miyelom, Hodgkin ve NHL gibi hematolojik kanserlerin tedavisinde etkili bir şekilde kullanılır.

Ancak, NHL hastalarında tekrar eden nüksler önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu tür hastalarda, tedavi sırasında 450 mg/m²'yi aşan DOX kümülatif dozları uygulandığında kardiyotoksisite riski ortaya çıkmaktadır. Kardiyotoksisite, DOX en önemli doz sınırlayıcı faktörüdür ve bu durum geri dönüşümsüz kalp hasarlarına yol açabilir (89). Dolayısıyla, DOX klinik etkinliği, kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliği gibi kardiyotoksisiteye bağlı olarak önemli ölçüde sınırlıdır (90).

2.7.2. Siklofosfamid



$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$

Moleküler ağırlık: 261.08 g/mol

Suda çözünürlük: 40 mg/mL

E.N: 41-45 °C

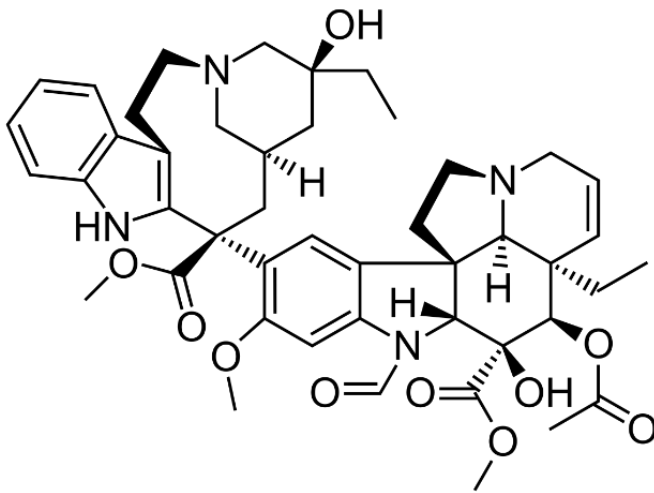
Şekil

2.6. Siklofosfamid kimyasal yapısı

CYC, enzimatik ve kimyasal aktivasyon gerektiren bir ön ilaçtır (Şekil 2.6) ve doğrudan etkili bir formda değildir. Meme, lenfoid ve pediatrik maligniteler gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde, diğer antineoplastik ajanlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Ayrıca, immünsüpresif özellikleri nedeniyle kemik iliği nakli ve çeşitli otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak tercih edilir. CYC'in aktif metabolitleri hücresel makromolekülleri alkile ederek ayrışmalarını önleyen kovalent bağlar oluşturur. En önemli hedef DNA'dır, çünkü DNA'nın alkilasyonu hücre bölünmesini önler ve ayrıca gen ifadesini bozar (91). CYC detoksifikasyonunda ana faktör, hücrelerde aldehid dehidrojenaz enziminin bulunmasıdır; yüksek proliferatif

potansiyeye sahip hücreler bu enzimi yüksek seviyelerde üretir ve bu da CYC'e karşı bir direnç gelişmesine neden olur. Klinik kullanımı sırasında en sık karşılaşılan yan etkiler arasında kemik iliği baskılanması, kardiyak ve gonadal toksisite, hemorajik sistit ve karsinogenez yer alır. Ayrıca, kümülatif doz, bu yan etkilerin riskini artıran başlıca faktördür (92, 93).

2.7.3 Vinkristin



$C_{46}H_{56}N_4O_{10}$

Moleküler ağırlık: 825.0 g/mol

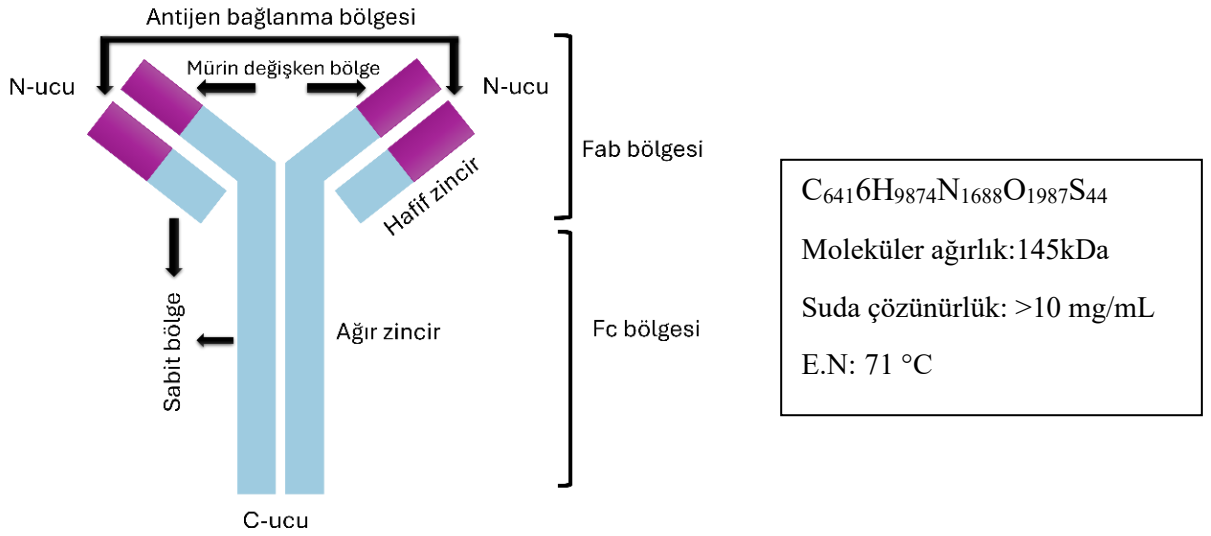
Suda çözünürlük: 50 mg/mL

E.N: 218 °C

Şekil 2.7. Vinkristin kimyasal yapısı

VRC, *Catharanthus roseus*'tan elde edilen vinka alkaloidleri grubuna ait bitkisel kaynaklı, RNA ve protein sentezini ve tubulinin mikrotübüllere polimerizasyonunu engelleyen hücre döngüsüne özgü bir antikanser ilaçtır (Şekil 2.7) (94). Akut lenfoblastik lösemi, lenfomalar, sarkomlar, nöroblastom, böbrek, karaciğer, akciğer, beyin ve meme gibi çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılan etkili bir moleküldür. Ayrıca, immünoşüpresan özellikleri nedeniyle idiyopatik trombositopenik purpura ve trombotik trombositopenik purpura gibi durumların tedavisinde de uygulanmaktadır. VRC, oral yolla alındığında zayıf biyoyararlanım gösterdiği için genellikle intravenöz formda, vinkristin sülfat olarak uygulanır. Ancak, vezikan özellik taşıdığı için ciddi yan etkiler riski bulunmaktadır. İntravenöz uygulamadan sonra, ilacın büyük bir kısmı vücut dokularına hızla dağılır. Özellikle çocuk hastalarda en sık görülen yan etkilerden biri periferik nöropatidir (95).

2.7.4 Rituksimab



Şekil 2.8. Rituksimab (kimerik monoklonal antikor) yapısı

RTX, 451 amino asitten oluşan iki ağır zincir ve 213 amino asitten oluşan iki hafif zincirden oluşur ve kanserde kullanılmak üzere onaylanan ilk monoklonal antikordur. 1997 yılında FDA tarafından B hücreli NHL tedavisi için onaylanmıştır (96). Bu antikor, CD20 antijenini hedefleyen bir immüno globulin G (IgG) 1 monoklonal kimerik insan/murin antikorudur (Şekil 2.8). NHL'lerin yaklaşık %80'i, CD20 reseptörlerinin aşırı eksprese edildiği B hücrelerinden kaynaklanır. RTX, B hücrelerinin ölümüne neden olan çeşitli mekanizmalar aracılığıyla etki gösterir: Antikora bağımlı hücrel sitotoksosite, CD20'nin doğrudan çapraz bağlanması, kompleman bağımlı sitotoksosite ve opsonizasyon kaynaklı fagositoz gibi erken ve uzun süreli etkileşimler sağlar. Kanser tedavisinde ilk onaylanan monoklonal antikor olmasının yanı sıra, günümüzde kronik lenfositik lösemi, foliküler lenfoma, romatoid artrit ve anti-nötrofil sitoplazmik antikor ilişkili vaskülit gibi çeşitli otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (51). RTX'ın NHL tedavisindeki tek başına etkinliği bilinmekle birlikte, R-CHOP kombine tedavisi uygulanan hastaların yaklaşık %65-70'i bu tedaviye olumlu yanıt vermektedirler. Tedavideki başarısızlığın birçok nedeni bulunmaktadır ancak en temel nedeni ilaç direncidir.

2.7.5. Non-Hodgkin Lenfomada Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Günümüzde klinik kullanıma sunulmuş yaklaşık 50 farklı nanotaşıyıcı sistem bulunmaktadır. Lösemi ve lenfoma gibi hematolojik kanserlerin tedavisinde, genellikle uzun vadeli yan etkiler ve çoklu ilaç direnci sorunlarına yol açan kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır. Ayrıca, kök hücre nakli gibi daha invaziv yöntemler de uygulanabilir. Ancak, nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerinin hematolojik kanserlerin tedavisinde sağladığı birçok avantaj mevcuttur (97). Bunlar arasında belki de en önemlisi, günümüzde kanser tedavisindeki en büyük sorunlardan biri olan ilaç direncinin nanopartiküllerle aşılabilesidir. İlaç direnci, tedavi öncesinde veya tedavi sürecinde ortaya çıkabilir ve bu durum hastalığın nüksüne neden olarak yüksek dozda kemoterapötik kullanımını gerektirebilir. Tekrarlanan tedaviler de çeşitli sorunlara yol açmaktadır.

Nanoteknoloji, antikanser moleküllerini malign hücrelere seçici bir şekilde, sağlıklı hücrelere zarar vermeden veya sistemik toksisite oluşturmadan ulaştırma imkânı sağlar. Bu sayede konvansiyonel tedavilerde ilacın erişemediği lenf düğümleri ve kemik iliği gibi kritik dokulara ulaşılabilir (52). Hematolojik kanserlerde konvansiyonel kemoterapinin başarısızlığında önemli bir etken, hematopoetik ve lenfoid dokulardaki tümörlerin heterojenliğidir. Bu heterojenlik, mevcut tanı ve tedavi yöntemlerinin etkinliğini azaltarak zorluklar yaratmaktadır.

Tablo 2.1'de, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin NHL tedavisindeki klinik çalışmalarına dair örnekler özetlenmiştir. Klinik araştırmalarda, genellikle konvansiyonel R-CHOP tedavisindeki antikanser ilaçların lipozomal formlarının kullanıldığı görülmektedir. Örneğin, birçok klinik çalışmada R-CHOP rejimindeki doksorubisin yerine Doxil® veya Myocet®, vinkristin yerine ise Marqibo® kullanılmıştır.

Tablo 2.1. NHL tedavisinde nanopartiküler taşıyıcı sistemlerle yapılan klinik çalışmalara örnekler

Uygulanan sistem	Faz	NCT numarası
Doxil [®] + Rituksimab, Siklofosfamid, Vinkristin ve Prednison	II	NCT00184002
Doxil [®] + Rituksimab, Siklofosfamid, Vinkristin ve Prednison	III	NCT02428751
Myocet [®] + Rituksimab, Siklofosfamid, Vinkristin ve Prednison	II	NCT01009970
Marqibo [®]	I	NCT04243434
Ritüksimab + Vinkristin	III	NCT01478542
siRNA taşıyan lipid nanopartikül	I	NCT02110563
Ritüksimab kaplı Abraxane [®]	I	NCT03003546
mRNA-2752 ve Durvalumab enkapsüle lipid nanopartikül	I	NCT03739931

Literatürde, NHL tedavisinde kullanılmak üzere nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesiyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların sayısı, diğer kanser türlerine kıyasla daha sınırlı olsa da, farklı türde nanopartiküler sistemlerle yapılan araştırmalar dikkat çekmektedir (98). Bu çalışmalarda, en yaygın kullanılan nanopartiküler taşıyıcı sistemler lipozomlar olmuştur. Bunun yanı sıra, anti-CD20 ile hedeflendirilmiş nab-paklitaksel uygulaması dikkat çekicidir (99). (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. B Hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen nanopartiküler sistemler

<i>Nanopartiküler sistem</i>	<i>Nanopartikül formülasyonu</i>	<i>Etkin madde</i>
İnorganik	Silikon nanopartikül	Peptit PA20-6
Nanopartikül	Altın nanopartikül	-
	Demir oksit nanopartikül	Rituksimab
Lipozom	CD74 hedeflenmiş lipozom	Deksametazon
	CD22 hedeflenmiş PEGlenmiş lipozom	Doksorubisin
	CD19 hedeflenmiş lipozom	Doksorubisin
	Lipid nanopartikül	Edelfosin
	Lipid nanopartikül	Rituksimab
Polimerik	PEGlenmiş PLGA nanopartikül	Doksorubisin
Nanopartikül	PLGA nanopartikül	Anti-miRNA-155PNA
	CD20 hedeflenmiş sarmal peptid konjugatları	Fab' IF5
	PEG-oligokolik asit bazlı telodendrimerler	Doksorubisin
	Disülfid çapraz bağlı misel	Doksorubisin
	Rituksimab bağlı Abraxane	Paklitaksel+Rituksimab
	SHAL konjuge PEG-PLA	Doksorubisin
	PEG-DSPE misel	Rituksimab

Tez kapsamında kullanılan antikanser ilaçlar olan DOX, CYC ve VRC, konvansiyonel R-CHOP tedavisinde kombinasyon halinde kullanılsa da, bu üç ilacı bir arada taşıyan ve NHL tedavisini hedefleyen polimerik nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin henüz geliştirilmemiş olması, literatür ve pazardaki eksikliklerden biridir ve NHL tedavisi için yapılan literatür taramasında, nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin kullanımının oldukça sınırlı olduğu ve siklodekstrinlerin NHL tedavisinde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı herhangi bir çalışmanın bulunmadığı görülmektedir. Ayrıca R-CHOP tedavi rejimini içeren nanopartikül çalışması da bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çok Noktalı Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (RT-5)	IKA-Werke, Almanya
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı (Multipoint HP)	Variomag, Almanya
Derin Dondurucu (- 20 °C)	Beko, Türkiye
Dikey akışlı 2B kabin (BHG 2004)	Faster, İtalya
Işık mikroskobu (DM-IL)	Molecular Devices, ABD
İnkübatör (MCO-5AC)	Sanyo, Japonya
Liyofilizatör	Labconco, ABD
Manyetik Karıştırıcı	Falc, İtalya
Mikroplaka Okuyucu (Versamax)	Leica, Japonya
Partikül Büyüklüğü Analizi Cihazı (NanoZS)	Malvern, İngiltere
pH Metre	Hanna, ABD
Rotatör	IsoLab, Almanya
Rotavapor (RV/HB 10)	IKA, Almanya
Saf Su Cihazı (Milli-Q)	Millipore, ABD
Su Banyolu Yatay Çalkalayıcı (WNE22)	Memmert , Almanya
Ultra Hassas Terazi	Mettler Toledo, ABD
Ultrasaf Su Cihazı (Tip 1)	Elga Labwater, İngiltere
Ultrasaf Su Cihazı (Tip 2)	Elga Labwater, İngiltere
Ultrasantrifüj (EBA21)	Hettich, Almanya

Ultrasantrifüj (Universal-320)	Hettich, Almanya
Ultrasonik Banyo	Advantage Lab, İsviçre
Vorteks (MS1)	IKA, Almanya
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (1100 Series)	HP Agilent, Almanya

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Anti-mCD20	İnvivogen
Asetonitril (HPLC kalite, $\geq\%99,8$)	Sigma &Aldrich, Almanya
Dimetilsülfoksit, (Hücre kültürüne uygun, $\geq\%99,5$)	Sigma&Aldrich, Almanya
Diyaliz membran (MwCO:14.000 Da)	Sigma &Aldrich, Almanya
Dokсорubisin	Sigma &Aldrich, Almanya
Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM)	Sigma &Aldrich, Almanya
Etanol (HPLC kalite, $\geq\%99,8$)	Sigma &Aldrich, Almanya
Guanidino- β -CD polimer- epiklorohidrin HCl	CycloLab, Cyclodextrin R&D Ltd., Macaristan
Heptakis (6-deoksi-6-guanidino) β -CD Heptahidroklorür	CycloLab, Cyclodextrin R&D Ltd., Macaristan
Kolesterol kiti (MAK043)	Sigma &Aldrich, Almanya
Matrigel® Bazal membran	Corning, ABD
Penisilin/Streptomisin	Sigma, İsrail
Poli(2-hidroksietil metakrilat) (Poli-HEMA)	Sigma&Aldrich, ABD
Rituksimab	Biorbyt, ABD

Siklofosfamid	Sigma &Aldrich, Almanya
Survivin kiti (ab119607)	Abcam, Birleşik Krallık
Tetrahidrofurana (HPLC kalite \geq %99,8)	Sigma &Aldrich, Almanya
Tripan mavisi	Sigma&Aldrich, ABD
Tripsin-EDTA	Sigma &Aldrich, Almanya
Triton-X 100	Neofroxx, Almanya
TUNEL kiti (ApopTag®,S7101)	Millipore, ABD
WST-1 (Suda çözümlü tetrazolyum tuzu)	Roche, Almanya
Vinkristin	Sigma &Aldrich, Almanya

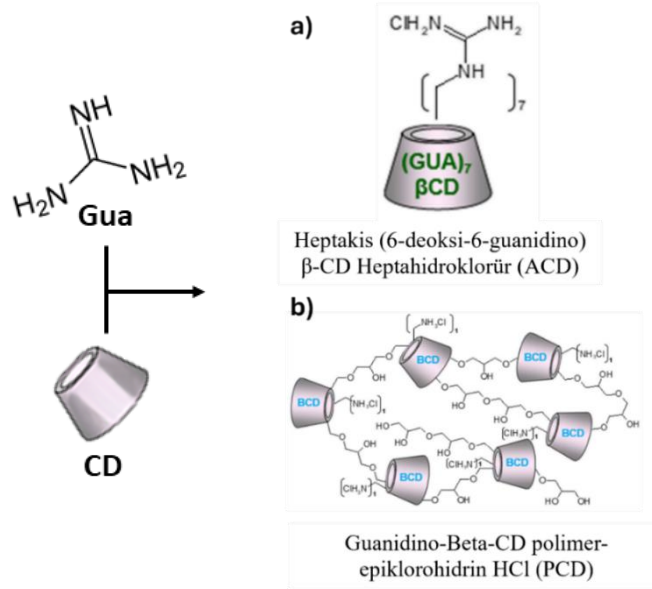
3.1.3. Kullanılan Biyolojik Materyaller

Fetal sığır serumu	Sigma, Almanya
İnsan Non-Hodgkin lenfoma hücre hattı (Daudi/CCL-213)	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
İnsan Non-Hodgkin lenfoma hücre hattı (BJAB/CRL-2230)	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
Fare fibroblast hücre hattı (L929)	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD

3.2. Siklodekstrinlerin Sentezlenmesi, Saflaştırılması ve Biyogüvenliliğinin Belirlenmesi

Tez kapsamında kullanılacak siklodekstrin türevleri siklodekstrin kimyası konusunda uzman bir firma olan CycloLab (CycloLab, Cyclodextrin R&D Ltd., Macaristan)'da Dr. Milo Malanga tarafından sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Bu amaçla kullanılması planlanan CD'ler, amfifilik β -CD (ACD) ve β -CD polimer (PCD) olup her iki türev de yapısında "guanidino" grubu içermektedir. Guanidino grubu CD nanopartiküllerin pozitif yüzey yüküne sahip olmasını ve bu sayede hücre membranı ile etkileşimin artmasını ve hücre içine girdikten sonra da NP'in mitokondriyi hedeflemesini sağlamaktadır. Bu sayede "sub-cellular" yani hücre altı hedefleme yapılarak RTX ile aktif hedeflendirilmiş NP'lere ikinci bir hedefleme stratejisi kazandırılmıştır. Kullanılan siklodekstrinlerin açık adları sırasıyla "Heptakis (6-deoksi-6-guanidino) β -CD Heptahidroklörür" ve "guanidino-Beta-CD polimer-epiklorohidrin HCl" dir.

Şekil 3.1 ile moleküler yapısı verilen GuaACD türevinin sentezi, CD'lerin primer yüzlerine guanidinoalkilamino ve aminoalkilamino grupları konfigürasyonu çalışmasına dayanmaktadır. Kısaca per(6-guanidino-6 deoksi) CD ile 1H-pirazol-1-karboksamidin HCl, DIPEA (N,N- diizopropil-etilamin) ve dimetilsülfoksit (DMSO) varlığında reaksiyona girmesi ile ACD türevi sentezlenmiştir (86). PCD sentezi ise siklodekstrin halkasına bağlı olan azotlu grubun türevlendirilmesiyle oluşturulmuştur. Başlangıç maddesi olan CD polimeri 1H-pirazol-1-karboksamidin-HCl ile DIPEA (N,N-diizopropil-etilamin) ve DMSO (dimetilsülfoksit) varlığında reaksiyona girmiştir ve ilgili PCD elde edilmiştir (59)



Şekil 3.1. Amfifilik (a) ve polimerik (b) CD türevlerinin yapısı

3.3. Dokсорubisinin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu

Tüm validasyon işlemi ICH Q2 (R2) kılavuzuna göre yapılmıştır. Analiz sırasında kullanılan yöntem ve parametreler aşağıda belirtilmektedir.

- **Sabit Faz:** C-18 oktadesil silika kolon. RP-18 (5 μm) 250 cm x 4,6 mm
- **Mobil Faz:** Asetonitril ve KH_2PO_4 (pH: 7.5'a ayarlanmış tampon) karışımı (30:70)
- **Enjeksiyon Hacmi:** 50 μL .
- **Mobil Faz Akış Hızı:** 1 mL/dakika.
- **Dedektör:** Floresan dedektör, 480 nm uyarım (EX) ve 560 nm emilim (EM) dalga boylarında.

Kalibrasyon Doğrusu:

DOX, mobil faz kullanılarak çözündürülmüş ve stok çözeltisi 500 $\mu\text{g/mL}$ olarak hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden, 8 farklı konsantrasyona mobil faz ile

seyreltmeler yapılmıştır: 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL ve 2 µg/mL (Şekil 4.1). Belirtilen yöntem parametreleri kullanılarak, HPLC ile analiz gerçekleştirilmiş ve ölçülen DOX miktarına karşılık gelen dedektör yanıtları grafiksel olarak düzenlenmiştir. Bu grafikten hareketle, "doğrusal regresyon formülü" ve "korelasyon katsayısı" hesaplanmıştır.

Doğrusallık:

DOX'in seri dilüsyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak kalibrasyon denklemi çizilmiş ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır.

Doğruluk:

Kalibrasyon doğrusu üzerinde belirtilen aralıkta yer alan en az üç konsantrasyon seviyesi (10 µg/mL, 50 µg/mL ve 200 µg/mL) kullanılarak HPLC analizleri 6 tekrar şeklinde yapılmıştır. Elde edilen geri kazanımların ortalaması, standart sapması (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır.

Kesinlik:

Tekrar edilebilirlik çalışmaları kapsamında, DOX'in 50 µg/mL'lik çözeltisi ile HPLC analizi 6 kez ardışık olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin ortalaması, SS ve VK hesaplanmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik testlerinde, stok DOX çözeltisinden 6 adet 50 µg/mL konsantrasyonlu çözeltisi hazırlanarak HPLC ile analiz yapılmış ve bu çözeltilerin ortalama, SS ve VK belirlenmiştir.

Günler arası farklılıkları değerlendirmek amacıyla, stok DOX çözeltisinden art arda 3 gün boyunca 50 µg/mL'lik konsantrasyonlu çözeltiler hazırlanmış ve her bir gün yapılan HPLC analizlerinin sonuçlarına göre ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır.

Duyarlılık:

2 µg/mL'lik DOX çözeltisinin HPLC spektrumunda sinyal/gürültü oranı hesaplanmıştır.

Özgüllük:

Yöntemin özgüllüğünü değerlendirmek için DOX miktar tayini yöntemi kullanılarak CYC ve VRC numunelerinden elde edilen pikler ile DOX'e ait pik arasında girişim olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.4. Siklofosfamidin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu

Tüm validasyon işlemi ICH Q2 (R2) kılavuzuna göre yapılmıştır. Analiz sırasında kullanılan yöntem ve parametreler aşağıdaki gibidir.

- **Sabit Faz:** C-18 oktadesil silika kolon. RP-18 (5 µm) 250 cm x 4,6 mm
- **Mobil Faz:** Asetonitril ve su karışımı (30:70, h/h).
- **Enjeksiyon Hacmi:** 20 µL.
- **Mobil Faz Akış Hızı:** 1 mL/dakika.
- **Dedektör:** 259 nm dalga boyunda diode-array dedektörü (DAD).

Kalibrasyon Doğrusu:

İlk olarak, CYC suda çözündürülüp 1000 µg/mL stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 9 farklı konsantrasyona seyreltme yapılmıştır: 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2 µg/mL ve 1 µg/mL (Tablo 4.4). Belirtilen parametreler kullanılarak HPLC analizi gerçekleştirilmiş ve ölçülen CYC miktarına karşılık gelen dedektör yanıtları grafiksel olarak düzenlenmiştir. Bu grafikten yola çıkarak, “doğrusal regresyon formülü” ve “korelasyon katsayısı” hesaplanmıştır.

Doğrusallık:

CYC'in seri dilüsyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak kalibrasyon denklemleri çizilmiş ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır.

Doğruluk:

Kalibrasyon doğrusu üzerinde belirtilen aralıkta yer alan en az üç konsantrasyon seviyesi (10 µg/mL, 50 µg/mL ve 200 µg/mL) kullanılarak HPLC analizleri 6 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerden elde edilen geri kazanımların ortalaması, standart sapması (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır.

Keskinlik:

Tekrar edilebilirlik çalışmaları için, CYC'in 50 µg/mL'lik çözeltisinin HPLC ile 6 kez ardışık olarak ölçümü yapılmış ve elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır. Ayrıca, tekrar elde edilebilirlik çalışmaları için stok CYC çözeltisinden 6 adet 50 µg/mL konsantrasyonlu çözeltisi hazırlanarak HPLC ile analiz gerçekleştirilmiş ve bu çözeltilerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı belirlenmiştir.

Günler arası farklılıkları değerlendirmek amacıyla, stok CYC çözeltisinden art arda 3 gün boyunca 50 µg/mL konsantrasyonlu çözeltiler hazırlanmış ve her gün yapılan HPLC analizlerinin sonuçlarına göre ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Duyarlılık:

Kromatogramda kullanılan en düşük konsantrasyon olan 1 µg/mL'lik ilaç çözeltisinin HPLC spektrumunda sinyal/gürültü oranı hesaplanmıştır.

Özgüllük:

Yöntemin özgüllüğünü değerlendirmek için CYC miktar tayini yöntemi kullanılarak DOX ve VRC numunelerinden elde edilen pikler ile CYC'e ait pik arasında girişim olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.5. Vinkristinin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu

Tüm validasyon işlemi ICH Q2 (R2) kılavuzuna göre yapılmıştır. Analiz sırasında kullanılan yöntem ve parametreler şu şekildedir:

- **Sabit Faz:** C-18 oktadesil silika kolon. RP-18 (5 µm) 250 cm x 4,6 mm
- **Mobil Faz:** NaH₂PO₄·2H₂O (pH: 7.0'e ayarlanmış tampon) ve Asetonitril karışımı (30:70)
- **Enjeksiyon Hacmi:** 20 µL.
- **Mobil Faz Akış Hızı:** 1 mL/dakika.
- **Dedektör:** 259 nm dalga boyunda diode-array dedektörü (DAD).

VRC, mobil faz kullanılarak çözündürülüp 500 µg/mL stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden, mobil faz ile seyreltme yapılarak 9 farklı konsantrasyon elde edilmiştir: 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2 µg/mL ve 1 µg/mL (Tablo 4.7). Yukarıda belirtilen parametreler kullanılarak HPLC analizi gerçekleştirilmiş ve ölçülen VRC miktarına karşılık gelen dedektör yanıtları grafiksel olarak düzenlenmiştir. Hazırlanan grafikten hareketle, "doğrusal regresyon formülü" ve "korelasyon katsayısı" hesaplanmıştır.

Doğrusallık:

VCR'in seri dilüsyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak kalibrasyon denklemi çizilmiş ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır.

Doğruluk:

Kalibrasyon doğrusu üzerinde belirtilen aralıkta yer alan en az üç konsantrasyon seviyesi (10 µg/mL, 50 µg/mL ve 200 µg/mL) kullanılarak HPLC analizleri 6 tekrar şeklinde yapılmış ve geri kazanımların ortalaması, standart sapması (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır.

Kesinlik:

Tekrar edilebilirlik çalışmalarında, VCR'in 50 µg/mL'lik çözeltisinin HPLC ile 6 kez ardışık olarak ölçümü yapılmış ve elde edilen verilerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik için ise stok VCR çözeltisinden 6 adet 50 µg/mL konsantrasyonlu çözeltisi hazırlanarak HPLC analizi gerçekleştirilmiş ve bu çözeltilerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı belirlenmiştir. Günler arası farklılıkları değerlendirmek amacıyla, stok VCR çözeltisinden art arda 3 gün boyunca 50 µg/mL konsantrasyonlu çözeltiler hazırlanmış ve her gün yapılan HPLC analizlerinin sonuçlarına göre ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Duyarlılık:

Standartlar arasında en düşük konsantrasyon olan 1 µg/mL'lik ilaç çözeltisinin HPLC spektrumunda sinyal/gürültü oranı hesaplanmıştır.

Özgüllük:

Yöntemin özgüllüğünü değerlendirmek için VRC miktar tayini yöntemi kullanılarak DOX ve CYC numunelerinden elde edilen pikler ile VRC'e ait pik arasında girişim olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.6. Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.6.1. Hemoliz

Gua-CD türevlerinin güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla yapılan ön çalışmada, bileşiklerin eritrositler üzerindeki hemolitik özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Etik Kurulu onayı (Karar no: 2021/04-10) ile sağlıklı gönüllülerden alınan kan örnekleri, sitrat tüplerinde 5000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında çökmüş eritrositler ayrılmış ve fosfat tamponlu çözeltisi (PBS) (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra, Gua-CD türevleri, NP hazırlığında kullanılacak konsantrasyonu da içeren çeşitli konsantrasyonlarda (2 mg/mL, 1 mg/mL ve 0.5 mg/mL) PBS'de çözündürülmüştür. Eritrosit süspansiyonundan (50 µL) alınan miktar, hazırlanan Gua-CD çözeltilerine (1 mL) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Ardından, örnekler 37 °C su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiş ve sonra 5000 rpm hızında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Toplanan süpernatantlar, hemoglobun içeriğini belirlemek için 543 nm'de spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Distile su uygulanan grup tam hemoliz (100%) geçirdiğinden, % hemoliz değerleri, toplam hemolize uğramış örneğin UV absorbansına göre aşağıdaki denklemle belirlenmiştir (89, 90)

$$\% \text{ Hemoliz} = \frac{\text{CD türevleri ile hemoliz edilmiş eritrositlerin absorbansı}}{\text{Distile su ile hemoliz edilmiş eritrositlerin absorbansı}}$$

$$\text{Distile su ile hemoliz edilmiş eritrositlerin absorbansı}$$

3.6.2. Biyolojik Sıvıda Stabilite

Boş Gua-CD nanopartiküllerinin biyolojik sıvıda stabilitesinin belirlenmesi amacıyla sığır serum albümini kullanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan Gua-CD nanopartikülleri, 45 mg/mL sığır serum albümini içeren fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) ile 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından oda sıcaklığına gelen NP

hidrodinamik çaplarındaki değişiklikler dinamik ışık saçılımı yöntemi kullanılarak 173° açı ve 25°C sıcaklıkta Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile ölçülmüştür.

3.6.3. Kompleman Aktivasyonu

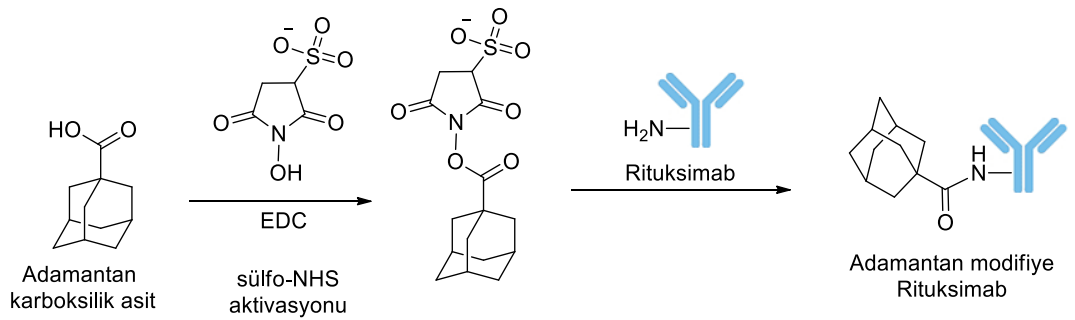
Sentezlenen Gua-CD türevlerinin biyogüvenlik çalışmaları kapsamında kompleman aktivasyonu çalışması yapılmıştır. Kompleman sistem, yabancı moleküller kan dokusuyla temas ettiğinde aktive olur ve bir dizi kimyasal reaksiyon sonucu enflamasyon oluşur. Sentezlenen CD türevlerinin kompleman sistemin aktivasyonu üzerindeki etkisi, kompleman sistemde en fazla bulunan protein olan C3a'nın miktarının, ticari immünassay kiti kullanılarak tayin edilmesiyle belirlenmiştir (Elabscience E-EL-H0818). Bu amaçla, sağlıklı gönüllülerden alınan serum, PBS veya PBS içinde Gua-CD çözeltileri ile 1:1 oranda (toplam hacim 50 µL) 45 dakika boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kit içinden çıkan standartlar ve serum örnekleri insan C3a proteinine spesifik antikor ile kaplı ELISA plakalarındaki kuyucuklara 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. 90 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra, kuyucuklar boşaltılmış ve her bir kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş C3a antikoruna eklenerek 60 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bağlanmayan antikor yıkama işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Enzimatik tespit için 100 µL streptavidin-HRP antikoruna eklenmiş ve 30 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak boya işaretli HRP substratı ile kuyucuklardaki bağlanma tespit edilmiş 450 nm dalga boyunda mikropilaya okuyucuyu ile ölçüm yapılmıştır. Standartlar kullanılarak belirlenen kalibrasyon doğrusu kullanılarak kalibrasyon denklemi çıkartılmış ve bu denklem kullanılarak PBS veya Gua-CD türevleriyle inkübe edilen serumda bulunan C3a miktarı hesaplanmıştır (92)

3.7. Mab ile Aktif Hedeflendirilmiş Antikanser İlaç Yüklü Gua-CD

Nanopartiküllerin Hazırlanması ve in vitro Karakterizasyonu

CD türevlerinin aktif hedeflendirilmesi işlemi CD20 proteinine özgü bir mAb olan RTX kullanılarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği

Bölümü araştırma laboratuvarında Doç. Dr. Sadık Kağa ile iş birliği yapılarak gerçekleştirilmiştir. RTX'in CD'lere konjugasyonu için öncelikle RTX, adamantan ile modifiye edilmiştir (Şekil 3.2). Adamantan karboksilik asidin aktivasyonu için EDC/sülfo NHS aktivasyonu kullanılmıştır (Thermo Fisher Scientific Inc., 2011). Çalışmada antikor konjugasyonu öncesi reaksiyon karışımı hazırlanması için, adamantan karboksilik asit (9 mg), EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide) (9,5 mg), sülfo-NHS (17,5 mg) tartılmış ve son hacim 10 mL olacak şekilde % 20 DMF çözeltisinde çözündürülmüştür ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.



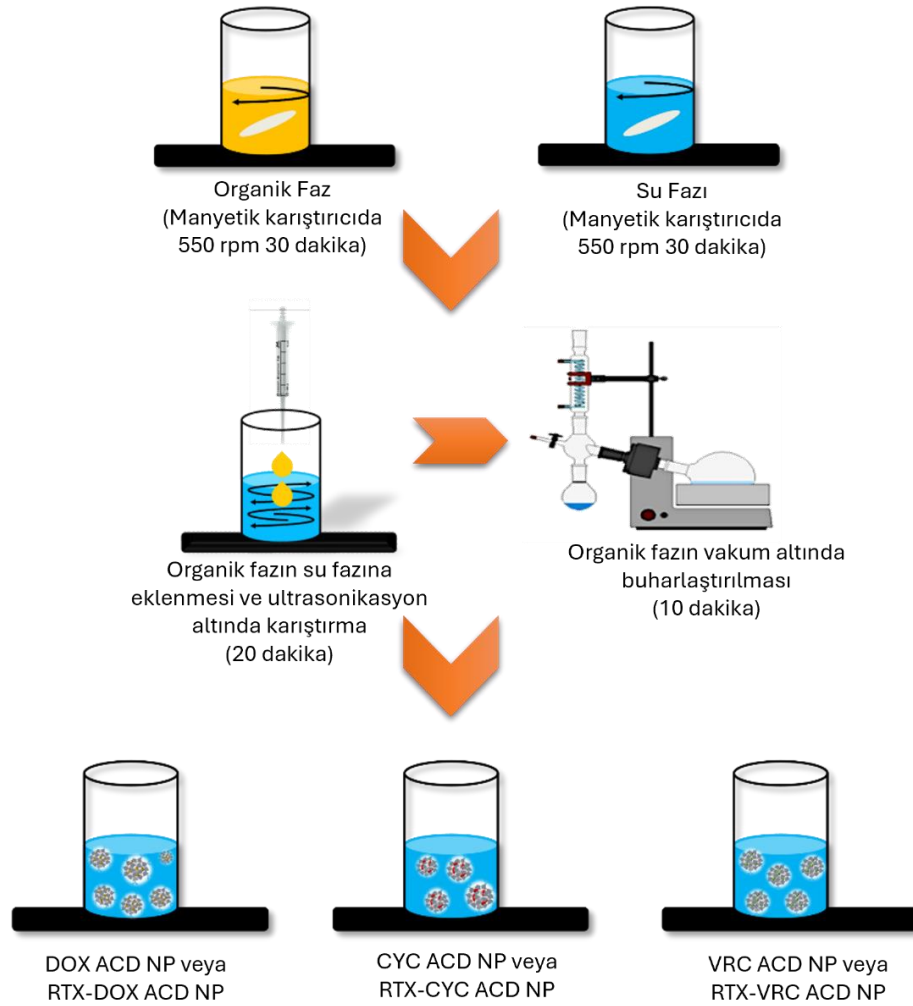
Şekil 3.2. Adamantan-Rituksimab konjugasyonu

İkinci basamakta ise adamantan karboksilik asit molekülü ile RTX üzerindeki amin gruplarının kararlı amid bağı ile birbirine bağlanması sağlanmıştır. Sülfo-NHS aktive adamantan karboksilik asit ile RTX konjugasyon reaksiyonunda protein denatürasyonu ve agregasyonu olmadan reaksiyonunun gerçekleştirilebilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Birinci reaksiyonda, NHS aktive adamantan (0,09 mg/mL) ve 1 mg/mL antikor, %20 DMF ortamında, oda sıcaklığında 3 saat inkübe edilmiştir. Buna ek olarak diğer örneklerde protein agregasyonunun düzeylerinin minimize edilmesi ve yüksek verimde konjugasyon reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için farklı reaksiyon ortamları uygulanmıştır. Literatürde %20 DMF içinde protein agregasyon düzeyinin azaltılması için gliserol kullanımı önerilmektedir. Bu nedenle çalışma ikinci örnek olarak konjugasyon reaksiyonu %20 DMF, %5 gliserol içeren ortamda gerçekleştirilmiştir. Üçüncü basamakta, protokolde EDC aktivasyonunu durdurmak için 2-merkaptolanol kullanımı opsiyonel olarak önerilmiştir. Konjugasyon reaksiyonu sırasında 2- merkaptolanolün antikor denatürasyonuna etkisini incelemek için 2-merkaptolanol içeren veya içermeyen

örnekler kullanılmıştır. Konjugasyon reaksiyonları sonrası 3 saat boyunca diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz membran (14.000 Da MWCO) kullanılarak reaksiyona girmemiş olan aktive adamantan karboksilli asit ve yan ürünler uzaklaştırılmıştır.

Adamantan konjugasyonu sonrası RTX antikoruna denatürasyon ve agregasyon testi, klasik SDS PAGE yöntemi ile analiz edilmiştir. Adamantan-mAb Konjugatı SDS PAGE analizi öncesi BCA assay yöntemi kullanılarak protein konsantrasyonları ölçülmüştür. SDS PAGE analizi için, her bir örnekten 20 µL alınıp ve 5 µL 4X SDS yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından örnekler %5 mini jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Örnek yükleme sonrası jeller, 1 saat boyunca, 250 voltta yürütülmüştür. Mavi belirteç jelin en alt kısmına gelince akım durdurulmuştur. Boyama işlemi için, SDS jel, 1 saat boyunca % 0.01 Coomassie R-250, % 30 metanol, % 10 asetik asit içeren boya solüsyonunda çalkalanmıştır. Boyama işlemi sonrası %8 asetik asit çözeltisinde 20 dk boyadan arındırılma yapılmış ve jel saf su ile yıkandıktan sonra görüntülenip, fotoğrafı çekilmiştir.

3.7.1. Nanopartiküllerin Hazırlanması



Şekil 3.3. Nanopresipitasyon yöntemi ile nanopartikül hazırlanması

Nanopartiküller (NP) hazırlanırken nanopresipitasyon yöntemi kullanılmıştır ve çeşitli parametreler değiştirilerek ortalama partikül boyutu daha küçük nanopartiküller elde edilmeye çalışılmıştır fakat elde edilen nanopartikül boyutlarının istenen başarı ölçütlerini sağlamamasından dolayı nanopresipitasyon yöntemi sonikatörde gerçekleştirilerek modifiye edilmiş (100) ve ultrasonikatör altında hazırlanmıştır. ACD ile hazırlanan NP'ler için: ACD, ultra saf su içinde (1 mg/mL) çözülmüştür. DOX, CYC veya VRC ayrı ayrı etanol (HPLC grade) içinde (0.1 mg/mL) çözülmüştür. Aktif hedeflenmiş NP formülasyonları elde etmek için, 1 mg/mL RTX-adamantan konjugasyonu organik fazda 0.05 mg/mL'ye seyreltilmiştir. Daha sonra, organik faz Gilson şırıngası ile damla damla su fazına eklenmiştir. Karıştırma,

ultrasonikasyon altında 20 dakika süreyle yapılmış ve ardından organik çözücü vakum altında buharlaştırılmıştır (Şekil 3.3).

PCD NP hazırlamak için ise PCD etanol:su (75:25) içinde çözüldürülmüştür (1 mg/mL). DOX, CYC ve VRC ise ultra saf suda (0,1 mg/mL) ayrı ayrı çözüldürülmüştür. Aktif hedefli NP formülasyonları elde etmek için 1 mg/mL RTX-adamantan konjugasyonu, etanol: tetrahidrofuran (1:1) içerisinde 0,05 mg/mL'ye seyreltilmiştir ve yukarıda açıklandığı gibi hazırlanmıştır (101, 102). Her ilacın ACD ve PCD NP'lere yüklenmesinden sonra nihai formülasyonu elde etmek amacıyla ilaç yüklü NP'ler uygulamadan önce fiziksel olarak karıştırılmıştır.

3.7.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yükünün Belirlenmesi

Nanopartiküllerin karakterizasyonu kapsamında ilk olarak geliştirilen farklı formülasyonlarda NP'lerin ortalama partikül büyüklüğü (PB) ve polidispersite indeksi (PDI) analizi Brown hareketlerinin ölçümüne dayanan dinamik ışık saçılımı (foton korelasyon spektroskopisi) yöntemi kullanılarak 173° açı ve 25°C sıcaklıkta Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. NP formülasyonlarının yüzey yükünün bir göstergesi olan zeta potansiyel (ZP) değeri mV cinsinden Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile 12,8° açı ve 25°C sıcaklıkta her bir formülasyon için ölçülmüştür (n=3) (103).

3.7.3. Fiziksel Stabilitenin Değerlendirilmesi

Hazırlanan etkin madde yüklü hedeflendirilmiş NP formülasyonlarının her birinin sudaki dispersiyonları +4°C'de buzdolabında 30 gün boyunca saklanmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (1., 5., 10. ve 30. günlerde) NP formülasyonlarının PB, PDI ve ZP değerleri belirlenerek zamana karşı fiziksel stabilite açısından değerlendirilmiştir (n=3).

3.7.4. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

Hazırlanan NP formülasyonları gece boyunca alüminyum bant ve stumb üzerinde kurutulmuştur ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) yöntemi ile yüzey özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla taze hazırlanan sıvı kolloidal formdaki formülasyonlar alüminyum bant üzerinde kurutularak bir gece bekletilmiş ve Gatan 682 Hassas Aşındırma ve Kaplama Sistemi (PECS) kullanılarak 10 nm kalınlığında altın/paladyum tabakası ile kaplanmıştır. Görüntüleme FEI Quanta 200 FEG ESEM cihazı ve Everhardt-Thornley SED dedektörü kullanılarak yapılmıştır (104).

3.7.5. Nanopartiküllerin Sterilizasyonu

Aseptik teknikle ve steril bir ortamda hazırlanan NP'ler, son olarak sıvı kolloidal dispersiyon formunda elde edilmiştir. Daha sonra, Class IIB laminar akış kabiniinde 0.22 µm por açıklığına sahip membran filtreden süzölmüş ve filtrasyon yoluyla sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası elde edilen NP'lerin verimi, filtrasyon öncesi ve sonrası sıvı kolloidal dispersiyonların ağırlıklarının karşılaştırılmasıyla yüzde olarak hesaplanmıştır (105). Tartım işlemi sırasında üstten yüklemeli terazi kullanılmıştır. Cam kaplar önce tartılmış, darası alınmış ardından son sıvı kolloidal dispersiyonlar tartılmıştır.

3.7.6. İlaç Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

DOX, CYC ve VRC yüklü NP'ler için ilaç yükleme etkinliği dolaylı yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Doğrudan belirleme yönteminin kullanılmamasının nedeni, suda çözünen ilaçların santrifüj veya diyaliz yoluyla doğrudan uzaklaştırılmamasıdır. Bu amaçla filtreli santrifüj tüpleri kullanılmıştır (MWCO: 10000 Da). 4500 devir/dakikada 40 dakika santrifüj edilen formülasyonlarda bulunan serbest ilaç filtreden geçerek aşağıda birikmiştir (106). Yükleme etkinliği, HPLC analizinin sonunda bulunan ilaç miktarının, hazırlama esnasında formülasyona eklenen ilaç miktarına oranı olarak hesaplanmıştır n=3.

RTX içeren formülasyonlardaki % RTX miktarı ise mikro BCA kiti ile belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak ticari temin edilen kit içinde bulunan protein standart kullanılarak PBS içinde seri seyreltme ile farklı protein konsantrasyonları hazırlanmış ve BCA kiti kullanılarak ölçümü yapılmıştır. Elde edilen verilerden kalibrasyon doğrusu ve denklemi hesaplanmıştır. Ardından RTX içeren formülasyonlar için aynı kit uygulanarak 30 dakika 37°C’de inkübasyona bırakılmış ve sonrasında protein miktarı açısından 562 nm’de mikropilaya okuyucu ile miktar tayini yapılmıştır (n=3) (69, 107, 108).

$$\% \text{ Yükleme Etkinliği} = \frac{\text{Hapsolan İlaç Miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Başlangıçtaki İlaç Miktarı } (\mu\text{g})} \times 100$$

3.7.7. İlaç Salm Profiline Belirlenmesi

İlaç yüklü ve aktif hedeflendirilmiş NP’lerin *in vitro* salım profili, diyaliz membran yöntemiyle belirlenmiştir. Nemlendirici görevi gören gliserolün ortadan kaldırılması, membranın akan su altında 3-4 saat süreyle durulanmasıyla sağlanmıştır. Sülfür bileşiklerinin uzaklaştırılması, membranın 80 °C’de 1 dakika boyunca %0,3 (a/h) sodyum sülfür çözeltisi ile yıkayarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sıcak su (60 °C) ile 2 dakika boyunca durulanmış, ardından %0,2 (v/v) sülfürik asit çözeltisi kullanılarak asitleştirilmiş ve ardından asidi nötralize etmek için sıcak su ile durulanmıştır. Daha sonra ilaç yüklü RTX hedeflendirilmiş veya hedeflendirilmemiş NP formülasyonları diyaliz membran içine (MWCO: 5000 Da) yerleştirilmiştir ve sonrasında diyaliz membran, sink koşulu sağlayacak miktarda PBS (pH 7.4) içeren ortama konulmuştur ve 37 °C’de 100 rpm’de su banyosunda inkübe edilmiştir. Belirtilen zaman aralıklarında (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 dakika ve 2, 4, 6, 12, 24 saat), PBS ortamından numuneler alınmış ve aynı miktarda-aynı sıcaklıkta taze PBS salım ortamına eklenmiştir. Numuneler daha sonra ilaç miktarı belirlenmek üzere HPLC ile analiz edilmiştir (n=3) (109, 110)

3.7.8. Nanopartikül Yapısındaki Rituksimab'ın Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi

Tezde aktif hedeflendirme amacıyla da kullanılan mAb olan RTX'ın, nanopartikül hazırlama işlemleri sırasında yapısal değişiklik açısından stabilitesini belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, örnekler 2X Laemmli numune yükleme tamponu [65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, %26,3 (a/h) gliserol, %2,1 SDS, %0.01 bromofenol mavisi] ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Her numuneden 25 µL alınarak %4–10 Bis-Tris akrilamid gradyan protein jeline (Biorad) yüklenmiştir. Numunelerin bağıl moleküler ağırlıklarını belirlemek için Precision Plus Protein Unstained Protein Standards (Biorad) kullanılmıştır. Örnekler, 30 dakika saat boyunca 100 V'de Tris-Glisin Yürüyen Tamponunda (25 mM Tris, 192 mM Glisin, %0,1 SDS, pH 8.3) yürütülmüştür. Jel görüntüleri, Biorad ChemiDOC MP Görüntüleme Sistemi ve ImageLab Görüntüleme Yazılımı sürüm 6.1 kullanılarak çekilmiştir (111)

Ayrıca Cenevre Üniversitesi'nde Sirküler Dikroizm ile çalışılmıştır. Ortam olarak su kullanılırken sıcaklık oda sıcaklığı derecesinde tutulmuştur. Çeşitli konsantrasyonlarda seyreltilen formülasyonlardan gelen absorbans farkı 205-250 nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür.

3.8. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemin Güvenliğinin ve Etkinliğinin Konvansiyonel Hücre Kültürü Çalışmalarında Belirlenmesi

3.8.1. Boş Nanopartiküllerin Güvenliğinin Belirlenmesi

İlaç içermeyen NP'lerin sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla, USP <87> Biological Reactivity Tests 2015 yönergelerine göre L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 µ/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin içeren DMEM ortamında kültüre edilmiştir. Kültürler, 75 cm² flasklarda, 37 °C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler, her bir kuyucuğa 100 µL DMEM içinde 1×10^3 hücre eklenerek 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına transfer edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sürecinin ardından, DMEM ortamı hücrelerden

uzaklaştırılmış ve DMEM ile seyreltilmiş boş ACD veya boş PCD NP'leri eklenmiştir. Hücreler, 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı, WST-1 testi (2-(4-İyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyumsodyum tuzu) ile değerlendirilmiştir. Bu işlemde, kuyucuklardan DMEM uzaklaştırılmış ve her kuyucuya 10 µL WST-1 içeren 100 µL taze besiyeri eklenerek yaklaşık 3 saat inkübe edilmiştir. Ardından, mikropilaka okuyucu ile 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmış ve hücre canlılığı kontrol grubuna göre yüzde olarak hesaplanmıştır. Deneylerde yalnızca DMEM ile inkübe edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır (n=6) (112)

3.8.2. İlaç Direnci Geliştirme Çalışmaları

Bjab insan lenfoma hücre hattı kullanılarak RTX dirençli hücreler geliştirilmiştir. Hücreler 37 °C'de %10 FBS ve %5 CO ile RPMI 1640 ortamında inkübe edilmiştir. 24 saat boyunca RTX'a (0,125-8 pg/ml) maruz bırakılmış ve 72 saat boyunca taze ortamda ile inkübe edilmiştir. Daha sonra RTX konsantrasyonu her deneyde iki katına çıkarılarak hücrelere haftada iki kez RTX ile inkübe edilmiştir (113)

3.8.3. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Etkinliğinin Belirlenmesi

Boş Gua-CD NP'lerin, DOX, CYC, VRC yüklü NP'lerin veya DOX/CYC/VRC ve RTX konjuge analoglarının kombinasyonunun antikanser aktivite çalışmaları, Daudi ve Bjab (RTX'a direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş) insan lenfoma hücre hatları üzerinde belirlenmiştir. Bu amaçla, hücreler ilk olarak %10 FBS ve %1 pen/strep içeren RPMI-1640 ortamında bulunan 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına eklenmiştir. Lenfoma hücreleri süspanse hücreler olduğundan, çoğalmak için hücre-hücre etkileşimlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle, hücreler deneylerden önce U tabanlı 96 kuyucuklu plakalarına eklenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucunda, hücre canlılığı WST-1 ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri ile inkübe edilen hücreler kullanılmış olup, test gruplarındaki hücre canlılığı, kontrol grubuna kıyasla hesaplama ile belirlenmiştir (114)

3.8.4. Antikora Bağımlı Hücresel Sitotoksitenin Belirlenmesi

NP formülasyonlarında bulunan adamantan-konjuge RTX'in biyolojik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla antikora bağımlı hücresel sitotoksitenin çalışması yapılmıştır. Bu amaçla hedef hücre olarak CD20+ Daudi ve Bjab (RTX'a direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş) lenfoma hücreleri ve efektör hücre olarak da makrofaj hücreleri kullanılmıştır. İlk olarak RAW hücreleri kullanılmıştır fakat kontaminasyon sebebiyle PBMC ile çalışılmıştır ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Efektör hücre: hedef hücre oranı 25:1 olacak şekilde her bir kuyucuğa 2.5×10^5 makrofaj ve 1×10^4 Daudi veya Bjab (RTX'a direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş) hücreleri 100 μ L besiyeri içinde 96 kuyucuklu U-tabanlı plakalara ekimi yapılmıştır. Daha sonra RTX çözeltisi ve RTX içeren CD NP formülasyonları ile 37°C'de 4 saat süreyle inkübe edilmiştir (113). Ardından ticari olarak temin edilen Laktat dehidrogenaz (LDH) kitindeki protokol uygulanarak belirlenmiştir (Biovision K-311). Bu amaçla inkübasyon sonunda mikrolaka santrifüjü kullanılarak hücreler 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından her bir örnekten 8 tekrar olacak şekilde 100 μ L süpernatant alınarak yeni 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir. Örnekler üzerine 100 μ L LDH deteksiyon boyası eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 495 nm'de mikrolaka okuyucu ile absorbanslar belirlenmiştir (115). Çalışma sırasında %1 TritonX-100 ile inkübe edilen hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve bu gruptan elde edilen absorbans %100 LDH salımı olarak kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır.

3.8.5. Kolesterol Ekstraksiyon Çalışması

İlaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmalarının yanı sıra, CD'ler farklı hücrelerdeki kolesterol kompozisyonunu değiştirmek amacıyla da kullanılmaktadır (89, 116). Membrandan kolesterol uzaklaştırma etkinliği, kullanılan CD türüne, konsantrasyonuna, hücreyle inkübasyon süresine, sıcaklığa ve hücre türüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Özellikle, β -CD'nin en etkili kolesterol uzaklaştırıcı CD türü olduğu gösterilmiştir (117). Bu proje kapsamında sentezlenen Gua-CD türevlerinin kanser hücrelerindeki kolesterol affinitesi belirlenmiştir. Bu amaçla, çeşitli Gua-CD türevleri ile inkübe edilmiş Daudi ve Bjab (RTX'a direnç

geliştirilmiş ve geliştirilmemiş) hücrelerindeki kolesterol miktarı, ticari olarak temin edilen kolesterol kiti kullanılarak ölçülmüştür (118). Karşılaştırma yapmak için, kolesterol uzaklaştırma etkinliği yüksek olan Metil- β -CD referans standart olarak kullanılmıştır.

3.8.6. Survivin Deneyi

Survivin, kanser hücrelerinde yüksek oranda sentezlenen anti-apoptotik bir gendir ve ekspresyonu nedeniyle oluşan survivin proteini, Kaspaz-9'un aktivasyonunu inhibe ederek hücrelerin apoptoza gitmesini engeller. Ayrıca NHL'de survivin ekspresyonunun artması nedeniyle hücre apoptozunun önlendiği ve proliferasyon nedeniyle ilaç direncinin arttığı literatürde gösterilmiştir (119, 120) Daudi ve Bjab (RTX'a direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş) hücreleri, CD türevleriyle hazırlanan ilaç yüklü ve aktif hedefli NP'lerle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda NP'lerin NHL hücrelerinde survivin geninin ekspresyonuna etkisi, ticari olarak temin edilebilen Human Survivin ELISA Kiti kullanılarak ve kitin önerdiği protokole uygun olarak belirlenmiştir. Sadece ortamla inkübe edilen hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu deneyi gerçekleştirmek için, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasının her kuyucuğuna, kuyucuk başına 5×10^3 hücre yoğunluğunda 100 μ L hücre eklenmiştir. 24 saat sonra, hücre kültürü ortamı, NP'ler içeren DMEM ile değiştirilmiştir. İlave 48 saatlik inkübasyonun ardından kit protokolü takip edilmiştir. Daha sonra, numunelerin absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüş ve örneklerdeki survivin proteininin konsantrasyonu, standart çözeltilerden elde edilen denklem kullanılarak belirlenmiştir (n=6) (121)

3.8.7. Mitokondri İzolasyonu

Tez kapsamında kullanılan Gua-CD türevleri yapılarında bulunan guanidin grupları sayesinde hücre mitokondrisini hedeflenme potansiyeline sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde, mitokondride biriken Gua-CD miktarlarını belirlemek amacıyla 20×10^6 Daudi ve Bjab (RTX'a direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş) hücreleri DOX

yüklü Gua-CD türevleri veya eşit miktarda DOX çözeltisi ile 24 saat 37°C'de %5 CO² ortamında inkübe edilmiştir (122). İnkübasyon sonrası hücrelerin mitokondrileri ticari mitokondri izolasyon kitindeki protokole uygun olarak izole edilmiştir (Thermo 89874). İnkübe edilen hücreler 5000 rpm'de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak hücreler üzerine kit içinden çıkan Reaktif A'dan 800 µL eklenerek 2 dakika buz üzerinde tutulmuştur. Ardından Reaktif B'den 10 uL eklenerek 5 dakika boyunca buz üzerinde tutulmuş ve her bir dakikanın içinde toplamda 5 kez vortekslenerek şekilde ile 10'ar saniye boyunca karıştırılmıştır. Sonrasında Reaktif C'den 800 uL eklenerek 700g'de +4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Sonrasında süpernatant toplanarak yeniden 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak mitokondrinin bulunduğu pellet 500 uL Reaktif C ile yeniden 12.000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Mitokondrinin olduğu pelet kısım alınarak DOX miktarı açısından floresans özellikli mikropilaka okuyucu ile eksitasyon ve emisyon dalga boyu sırasıyla 470 ve 560 nm olmak üzere ölçüm yapılmıştır (Spectramax ID3) (n=6).

3.8.8. P-gp İnhibisyonunun Belirlenmesi

CD türevlerinin ATPaz aktivitesi üzerinden neden olduğu P-gp inhibisyonu da ticari olarak temin edilecek hücre temelli ATPaz kiti ile kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla direnç gelişmiş ve gelişmemiş hücreler hazırlanan NPler ile inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonrası kit protokolü uygulanmıştır. Calcein AM ekstrüzyon deneyi, dirençli ve dirençsiz Bjab hücreleri üzerinde üretici talimatlarına uygun olarak yapılmıştır. Dirençli ve dirençsiz Bjab hücreleri 24-well plaklara 1×10^5 hücre/kuyu oranında ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler, daha sonra PBS, DOX formülasyonları veya Verapamil (2.5 µM) ile 37 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler 0.5 µM Kalsein AM ile 37 °C'de ek bir 30 dakika inkübe edilmiştir. PBS ile tedavi edilen hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından, hücreler soğuk PBS ile üç kez yıkanmış ve mikropilaka okuyucuda okunmuştur (ex: 495 nm em: 515 nm). Deney sırasında pozitif kontrol grubu olarak bilinen karakteristik bir Pgp substratı olan Verapamil kullanılmıştır (n=6).

3.9. 3B Tümör Modeli Çalışmaları

Daudi ve Bjab (RTX'a direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş) insan lenfoma hücre hatları ile 3B tümör modeli geliştirilebilmesi için yuvarlak tabanlı 96 kuyucuklu plakalar Poli-HEMA çözeltisi ile kaplanmıştır. Poli-HEMA 1,2 g 40 mL (%95'lik) etanolde çözündürülmüş ve her kuyucuğa 50 µL eklenmiştir. Gece boyunca bekletilen plakalara, hücre ekim ortamı %3 h/h oranında Matrigel® içerecek şekilde 200 µL içerisinde 5000 hücre/kuyucuk olarak ekim yapılmıştır. Ardından plakalar 1000 rpm'de 10 dakika olacak şekilde santrifüjlenmiştir. Her iki günde, besi yeri değiştirilmiştir. 3. günde sferoid yapısı olduğu görülmüş, ancak gelişimin devam etmesi için 5. günde formülasyonların etkinliğinin değerlendirilmesine geçilmiştir. Ardından hücreler üzerindeki besiyeri ilaç yüklü NP formülasyonları ve ilaçların çözeltileri ile 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu hücre yaşayabilirliği WST-1 analizi ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri ile inkübe edilmiş hücreler kullanılmış ve bu gruptaki hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir (n=6) (114).

3.10. Hücre Ölüm Mekanizmasının Belirlenmesi

Hazırlanan NP formülasyonlarının hücrelerdeki ölüm mekanizması akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Bu amaçla Daudi ve Bjab (RTX'a direnç geliştirilmiş ve geliştirilmemiş) insan lenfoma hücreleri ACD ve PCD NP formülasyonları ve ilaçların serbest çözeltileri ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu hücreler 5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL PI ile 15 dakika süreyle 37°C'de bekletilmiştir. Ardından apoptotik ve nekrotik hücrelerin oranı akış sitometresinde belirlenmiştir (n=3) (107)

3.11. Hayvan Çalışmaları

3.11.1. Serbest ve Nanopartiküle Bağlı İlaçların Plazma Profilinin Belirlenmesi

ACD ve PCD kullanılarak tasarlanan NP sistemlerden in vitro çalışmalar sonucu başarılı bulunan ve optimum formülasyonu belirlenen ACD kullanılarak hazırlanan hedeflendirilmiş ilaç yüklü ACD NP'lerin çözelti formları referans alınarak 7-8 haftalık erkek Balb-c fareler kullanılarak biyoyararlanım değerlendirmeleri yapılmıştır.

Antikanser ilaçların mg/kg olarak belirlenen dozları (DOX=1 mg/kg, VRC=2 mg/kg ve CYC=30 mg/kg, RTX= 2 mg/kg) sağlıklı Balb-c farelere i.v. olarak kuyruk veninden uygulanmıştır. Her bir etkin maddenin fare modelindeki biyolojik yarı ömürleri (DOX=10-15 sa, VRC=15 dk ve CYC=30 dk) göz önüne alınarak belirlenen kan alma zaman noktalarının her biri için her grupta 3 fare ile çalışılmıştır (n=3). Alınan örneklerdeki DOX, VRC ve CYC miktarları valide edilmiş LC/MS MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Elde edilen verilerden zamana bağlı derişim grafiğinden hareketle farmakokinetik (kd, t_{1/2}, Vd ve Cl) ve biyoyararlanım parametreleri (AUC, C_{maks} ve t_{maks}) hesaplanmıştır. LC/MS MS analizi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. 10'ar mg DOX, CYC ve VRC standartları hassas bir şekilde tartılmıştır. Metanolde çözündürülmüş ve kalibrasyon doğusu için değışen konsantrasyonlarda metanol:su (50:50) karışında hazırlanmıştır. (DOX için çalışma çözeltilerinin konsantrasyonları sırasıyla 4, 10, 20, 100, 400, 1000 ve 2000 ng/mL; CYC için 5, 12.5, 25, 125, 500, 1250 ve 2500 ng/mL; VRC için ise 6, 15, 30, 150, 600, 1500 ve 3000 ng/mL). Serum örneklerinden ise 50 uL alınmış 50 uL standart ekleniş ve 50 ul asetonitril ile çöktürülmüştür. Süpernatant alınıp LC/MS MS ile okunmuştur.

3.11.2. Güvenlilik Çalışması

Tez kapsamında sentezlenen Gua-CD türevlerinin canlı organizmada herhangi bir toksisiteye neden olup olmadığı boş Gua-CD NP ile yapılacak in vivo çalışmalarla belirlenmiştir. Bu amaçla boş Gua-CD NP sağlıklı Balb-c farelere klinikteki R-CHOP

uygulamasını yansıtmaya yönelik olarak tek doz ve tekrarlanan doz (2 günde 1 toplam 5 doz) intravenöz uygulama ile verilmiştir. Son uygulamayı takiben 24 saat sonra hayvanlardan alınan kan örneklerinde alkalın fosfataz ve alanin aminotransferaz gibi değişkenler ölçülerek toksisitenin olup olmadığı belirlenmiştir. Bu deney için her bir grupta 4 hayvan kullanılmıştır.

3.11.3. Antitümöral Etkinlik Çalışması

Antikanser ilaç yüklü ve aktif hedeflendirilmiş ACD NP'lerin tümöre karşı etkinliğinin belirlenmesi amacıyla, ilk olarak 11-12 haftalık erkek Balb-c farelere A20 fare lenfoma hücresi 100 ul PBS'te $2,5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde sağ flenkten subkütan olarak enjekte edilmiştir. Tümör gelişimi yaklaşık 4 hafta içerisinde tümör büyüklüğünün 0.5 cm olması ile belirlenmiştir. Ardından fareler her grupta 6 hayvan olacak şekilde uygulanacak NP formülasyonlarına göre uygun gruplara ayrılmıştır. Kontrol gruplarına sadece serum fizyolojik verilmiştir. Diğer gruplara ise tedavi formülasyonları haftada 2 kez olmak üzere 4 hafta boyunca kuyruk veninden verilmiştir. Farelere uygulanan NP formülasyonlarında RTX terapötik cevabı alabilmek için fare anti-CD20 olarak kullanılmış ve karakterizasyon işlemleri yapılmıştır. Antikanser ilaçların mg/kg olarak belirlenen dozları (DOX=1 mg/kg, VRC=100 mg/kg ve CYC=2 mg/kg) NP'e enkapsüle halde 2mg/kg antiCD20 içerecek dozda uygun şekilde serum fizyolojik ile seyreltilmiştir(123, 124). NP formülasyonları uygulamadan hemen önce aseptik koşullarda hazırlanmış ve 0.22 µm por açıklığına sahip membran filtreden süzülerek sterilize edilmiştir. Uygulama süresi boyunca hayvanlar vücut ağırlığı ve tümör boyutundaki değişim açısından takip edilmiştir. Uygulamalar sonrası hayvanlara yüksek doz anestezi ile ötenazi uygulanmıştır.

Farelere verilecek formülasyon grupları in vitro ve hücre/tümör kültürü ile optimize edilmiş en iyi Gua-CD türevi seçilerek aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir. Her grupta iv uygulama ile yapılacak tedaviler için 6'şar fare kullanılmıştır. 6 grup olacak şekilde fareler ayrıştırılmıştır. Gruplar aşağıdaki gibidir:

Serbest çözelti grubu: RTX, DOX, VRC, CYC çözeltisi (Serum fizyolojik içinde intravenöz)

Nanopartiküler ilaç grubu: RTX-DOX-ACD+RTX-VRC-ACD+RTX-CYC-ACD NP (Serum fizyolojik içinde intravenöz)

Rituximab çözelti ve nanopartiküler ilaç grubu: RTX iv çözelti ve DOX +VRC+CYC yüklü ACD NP (Serum fizyolojik içinde intravenöz)

Boş ACD nanopartikül (Serum fizyolojik içinde intravenöz)

RTX-konjuge boş ACD NP (Serum fizyolojik içinde intravenöz)

Serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu

3.11.4. Histopatolojik İnceleme

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra beyin, dalak, akciğer, karaciğer, timüs ve lenf nodları çıkarılmış histopatolojik inceleme için formalin ile fikse edilerek parafine gömülmüştür. 3-5 mikrometre kalınlığında kesitler alındıktan sonra, deparafinizasyon ve dereceli alkoller ile rehidratasyon sonrası tümöral ve yakın ve uzak peritümöral bölgelerdeki doku morfolojisini değerlendirebilmek ve mikroskopik alan ölçümü yapabilmek için hematoksilin eozin ile boyama gerçekleştirilmiştir (125)

3.12. İstatistiksel Analiz

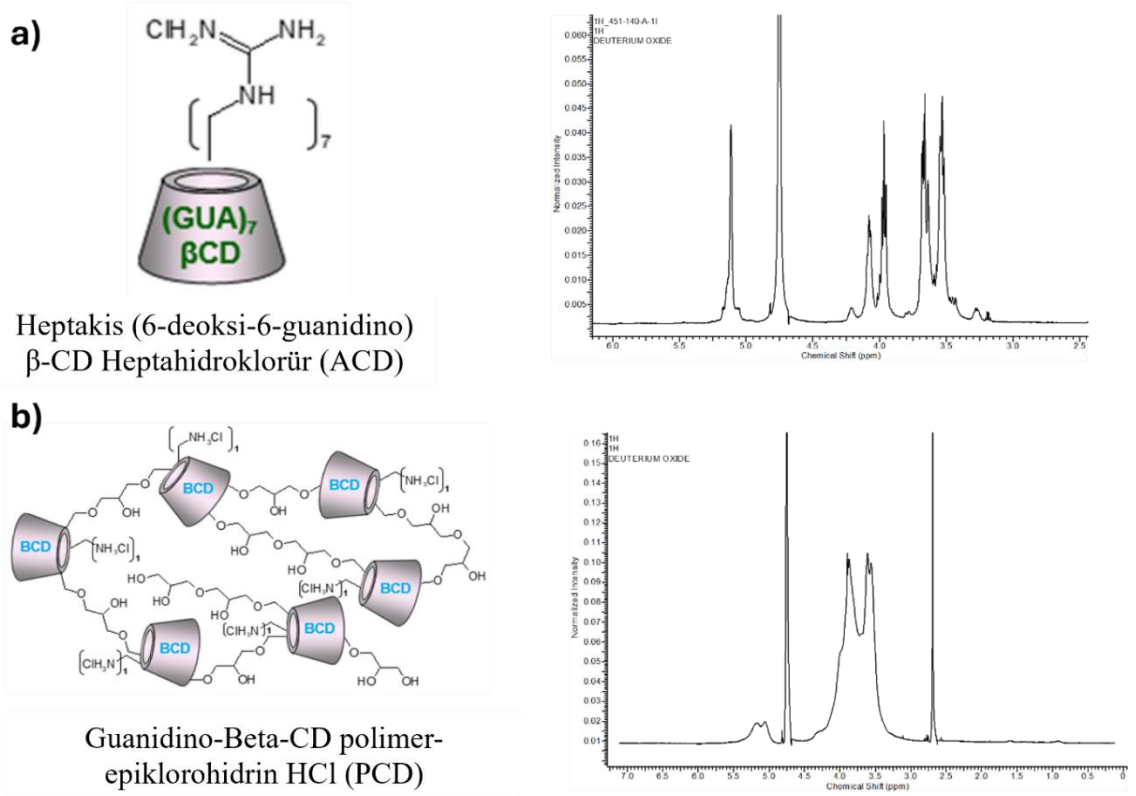
Hazırlanan boş ve ilaç yüklü NP formülasyonlarının her birinin in vitro karakterizasyonları yapılırken, ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel değeri, ilaç yükleme etkinliği ve ilaç salım profili çalışmalarının her biri en az 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular, uygun istatistik programı kullanılarak Student's t-testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası fark, $p < 0.05$ durumunda istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. 2B ve 3B hücre kültürü çalışmaları sırasında her bir grup için tekrar sayısı en az 6 olacak şekilde çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen bulgular Student's t testi ile değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kontrol grubu olarak sadece besiyeri ile inkübe edilmiş hücreler kullanılmış ve formülasyonların kontrol grubuna ve/veya birbirlerine göre değerlendirmeleri yapılmış, gruplar arası farklılık $p < 0.05$ durumunda istatistiksel

olarak anlamlı kabul edilmiştir. In vivo etkinlik çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular uygun bir istatistik programı kullanılarak çift yönlü ANOVA ile değerlendirilmiş, formülasyonların kontrol grubuna ve/veya birbirlerine göre değerlendirmeleri yapılmış ve gruplar arası farklılık $p < 0.05$ durumunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$)

4. BULGULAR

4.1. Siklodekstrinlerin Sentezlenmesi Saflaştırılması ve Biyogüvenliliğinin Belirlenmesi

Sentezlenen ve NP'lerin hazırlanmasında kullanılan ACD ve PCD türevlerine ait saflıklarının ve yapılarının belirlenmesine yönelik yapılan NMR sonuçları Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Amfifilik ve polimerik siklodekstrin türevlerinin yapısı ve NMR sonuçları
(MA_{ACD} : 1677.6 MA_{PCD} : 26000)

4.2. Doksorubisinin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu

Kalibrasyon Doğrusu:

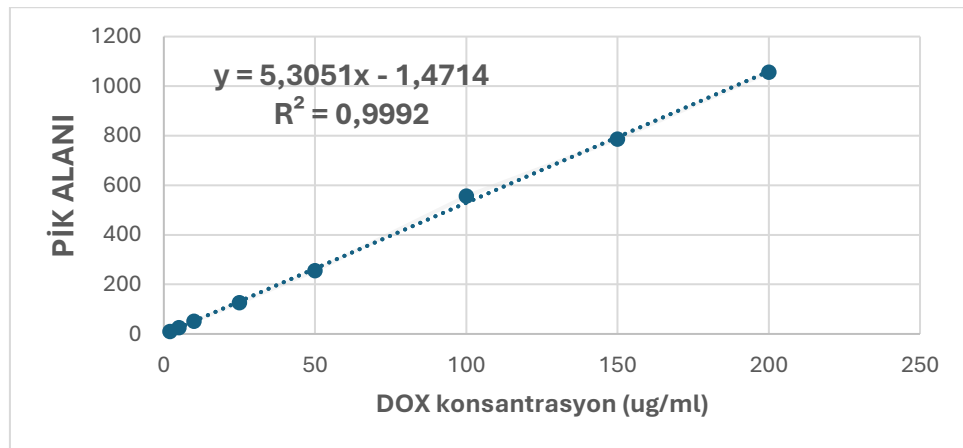
Elde edilen kalibrasyon doğrusu değerleri ve kalibrasyon denklemi Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. DOX'e ait konsantrasyon ve kromatogram alan değerleri

DOX KONSANTRASYON (ug/mL)	PİK ALANI
200	1055,6
150	785,7
100	555,9
50	254,5
25	125,5
10	51,3
5	25,1
2	10

Doğrusallık:

DOX'in seri dilüsyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak kalibrasyon denklemi çizilmiş ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır. Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. DOX'e ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi

Doğruluk:

Elde edilen geri kazanımların ortalaması, standart sapması (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır. Tablo 4.2 'de gösterilmiştir.

ÖRNEK	% GERİ KAZANIM		
	200 ug/mL	50 ug/mL	10 ug/mL
1	90,044	94,499	94,264
2	87,834	95,345	93,088
3	90,738	95,110	92,853
4	90,526	94,969	93,794
5	90,350	94,264	94,499
6	90,232	94,264	92,618
ORTALAMA	89,954	94,742	93,519
SS	1,0654	0,462	0,778
%VK	1,184	0,487	0,832

Tablo 4.2. DOX'in geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayıları (n=6)

Kesinlik:

Kesinlik parametresi için yapılan ölçümler Tablo 4.3 ile gösterilmiştir.

ÖRNEK	KESİNLİK (50 ug/mL)		
	TEKRAR EDİLEBİLİRLİK (ug/mL)	TEKRAR ELDE EDİLEBİLİRLİK (ug/mL)	GÜNLER ARASI FARK
1	45,345	44,428	50 ug/mL
2	45,698	46,379	45,886
3	46,121	46,074	45,815
4	45,721	45,392	46,944
5	45,980	46,003	
6	46,097	46,003	
ORTALAMA	45,827	45,713	46,215
SS	0,297	0,706	0,632
%VK	0,649	1,545	1,367

Tablo 4.3. DOX'e ait kesinlik parametresi değerleri (n=6)

Duyarlılık:

2 µg/mL'lik ilaç çözeltisinin HPLC spektrumunda sinyal/gürültü oranı 25.0 olarak bulunmuştur.

sinyal/gürültü=3 olarak oranladığımızda LOD değeri 0,24 ug/mL

sinyal/gürültü=10 olarak oranladığımızda LOQ değeri 0,8 ug/mL olarak bulunmuştur.

4.3. Siklofosfamidin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu

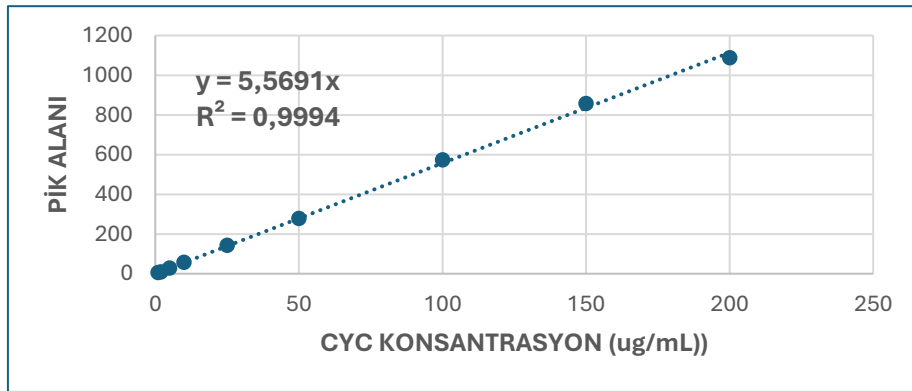
Belirtilen parametreler kullanılarak HPLC analizi gerçekleştirilmiş ve ölçülen CYC miktarına karşılık gelen dedektör yanıtları grafiksel olarak düzenlenmiştir. Bu grafikten yola çıkarak, “doğrusal regresyon formülü” ve “korelasyon katsayısı” hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusu değerleri ve kalibrasyon denklemi Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. CYC'e ait konsantrasyon ve kromatogram alan değerleri

CYC KONSANTRASYON (ug/mL)	PİK ALANI
200	1088,5
150	857,3
100	573,4
50	278,6
25	143
10	58
5	27,9
2	9,3
1	5,8

Doğrusallık:

CYC'in seri dilüsyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak kalibrasyon denklemi çizilmiş ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. CYC'e ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi

Doğruluk:

Elde edilen geri kazanımların ortalaması, standart sapması (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır. Tablo 4.5 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. CYC'in geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayıları (n=6)

ÖRNEK	% GERİ KAZANIM		
	200 ug/mL	50 ug/mL	10 ug/mL
1	91,68	93,05	86,73
2	91,69	97,75	88,52
3	92,39	95,10	87,27
4	92,26	93,23	90,68
5	95,03	93,84	87,27
6	91,97	95,10	89,96
ORTALAMA	92,51	94,68	88,40
SS	1,27	1,75	1,61
%VK	1,37	1,85	1,82

Kesinlik:

Kesinlik parametresi için yapılan ölçümler Tablo 4.6'te gösterilmiştir.

Tablo 4.6. CYC'e ait kesinlik parametresi değerleri (n=6)

ÖRNEK	KESİNLİK (50 ug/mL)		
	TEKRAR EDİLEBİLİRLİK (ug/mL)	TEKRAR ELDE EDİLEBİLİRLİK (ug/mL)	GÜNLER ARASI FARK
1	42,538	45,698	50 ug/mL
2	43,436	45,519	43,741
3	43,166	44,495	42,951
4	44,226	45,429	42,610
5	44,064	45,860	
6	43,4001	43,525	
ORTALAMA	43,4720	45,088	43,100
SS	0,6150	0,901	0,580
%VK	1,414	1,999	1,346

Duyarlılık:

1 µg/mL'lik ilaç çözeltisinin HPLC spektrumunda sinyal/gürültü oranı 1.0 olarak bulunmuştur.

sinyal/gürültü=3 olarak oranladığımızda LOD değeri 3 ug/mL

sinyal/gürültü=10 olarak oranladığımızda LOQ değeri 10 ug/mL olarak bulunmuştur.

4.4. Vinkristinin HPLC Yöntemi ile in vitro Miktar Tayini ve Validasyonu

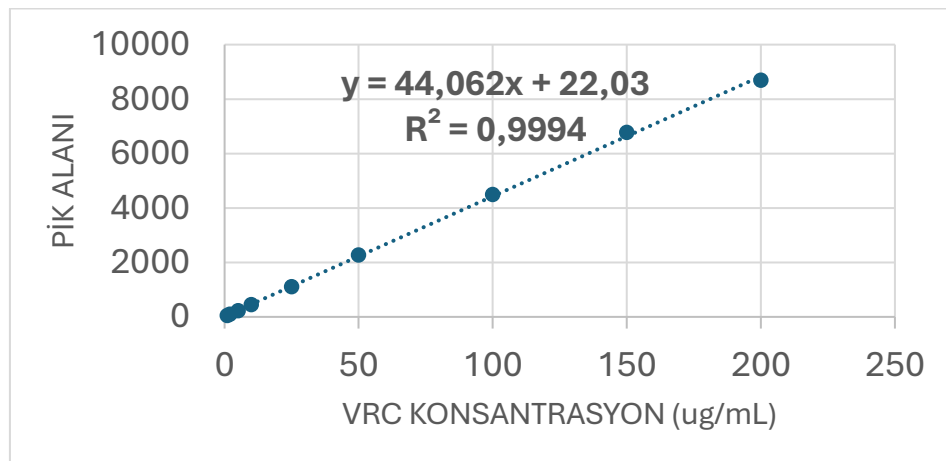
Elde edilen kalibrasyon doğrusu değerleri ve kalibrasyon denklemi Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. VRC'e ait konsantrasyon ve kromatogram alan değerleri

VRC KONSANTRASYON (ug/mL)	ALAN
200	8689,1
150	6771,8
100	4495,2
50	2270,4
25	1099,5
10	444,6
5	220,7
2	88
1	44,7

Doğrusallık:

VRC'in seri dilüsyonu ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak kalibrasyon denklemi çizilmiş ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır. Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. VRC'e ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi

Doğruluk:

Elde edilen geri kazanımların ortalaması, standart sapması (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır. Tablo 4.8 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. VRC'in geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayıları (n=6)

ÖRNEK	% GERİ KAZANIM		
	200 ug/mL	50 ug/mL	10 ug/mL
1	98,41	102,40	95,93
2	98,42	102,33	96,38
3	98,62	102,43	96,15
4	98,55	102,42	96,38
5	98,57	102,47	97,06
6	98,51	102,69	96,27
ORTALAMA	98,51	102,46	96,36
SS	0,08	0,12	0,38
%VK	0,09	0,12	0,40

Kesinlik:

Kesinlik parametresi için yapılan ölçümler Tablo 4.9'te gösterilmiştir.

Tablo 4.9. VRC'e ait kesinlik parametresi değerleri (n=6)

ÖRNEK	KESİNLİK (50 ug/mL) n=6			
	TEKRAR EDİLEBİLİRLİK (ug/mL)	TEKRAR ELDE EDİLEBİLİRLİK (ug/mL)	GÜNLER ARASI FARK (3 gün)	
1	51,52	47,10	50 ug/mL	100 ug/mL
2	51,86	47,26	50,25	98,02
3	51,43	48,12	51,35	99,28
4	51,47	47,44	52,33	100,63
5	51,48	46,87		
6	51,49	46,91		
ORTALAMA	51,54	47,28	51,31	99,31
SS	0,16	0,46	1,04	1,30
%VK	0,31	0,98	2,03	1,31

Duyarlılık:

1 µg/mL'lik ilaç çözeltisinin HPLC spektrumunda sinyal/gürültü oranı 46.0 olarak bulunmuştur.

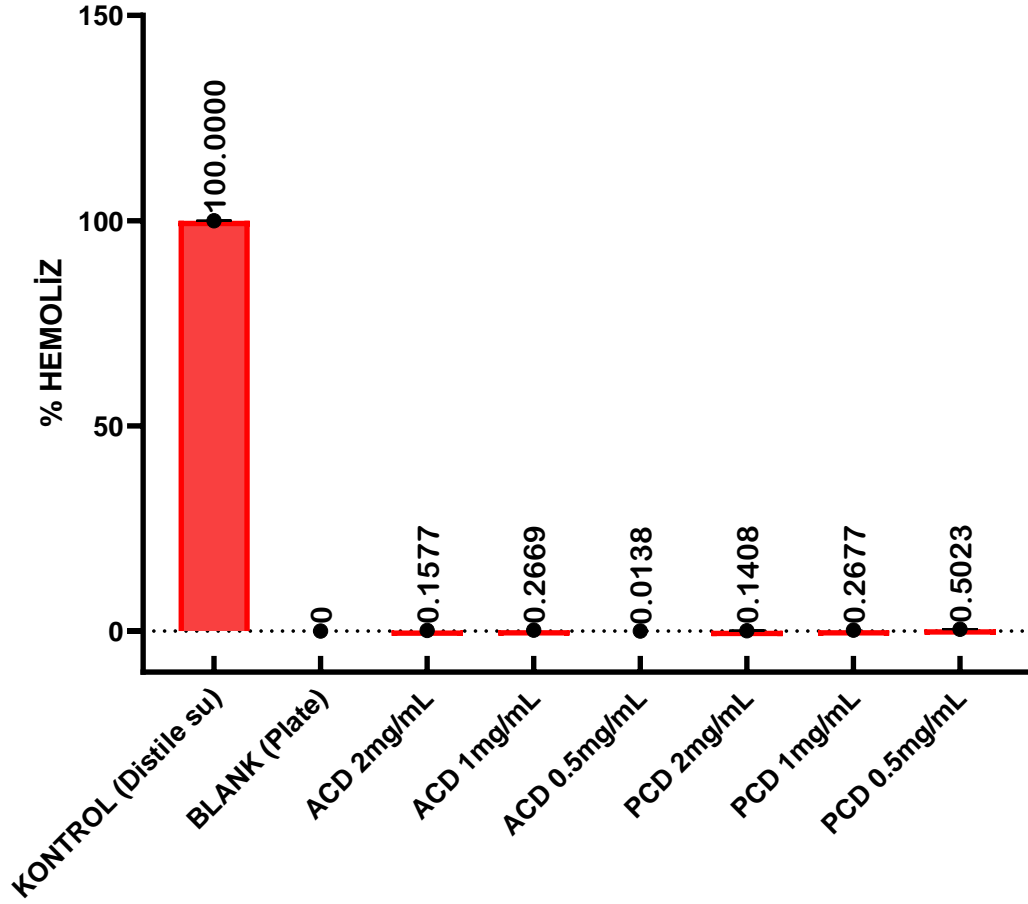
sinyal/gürültü=3 olarak oranladığımızda LOD değeri 0,06 ug/mL

sinyal/gürültü=10 olarak oranladığımızda LOQ değeri 0,21 ug/mL olarak bulunmuştur.

4.5. Gua-CD Türevlerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

4.5.1. Hemoliz

Kontrol grubu olarak eritrositler üzerinde hemolize neden olan su kullanılmıştır. Ancak CD türevleri ile karşılaştırıldığında hemolize eritrosit görülmemiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5 Boş ACD ve PCD'nin farklı konsantrasyonlarda 30 dakikalık inkübasyondan sonra hemoliz değerleri (n=3 ±SD)

4.5.2. Biyolojik Sıvıda Stabilite

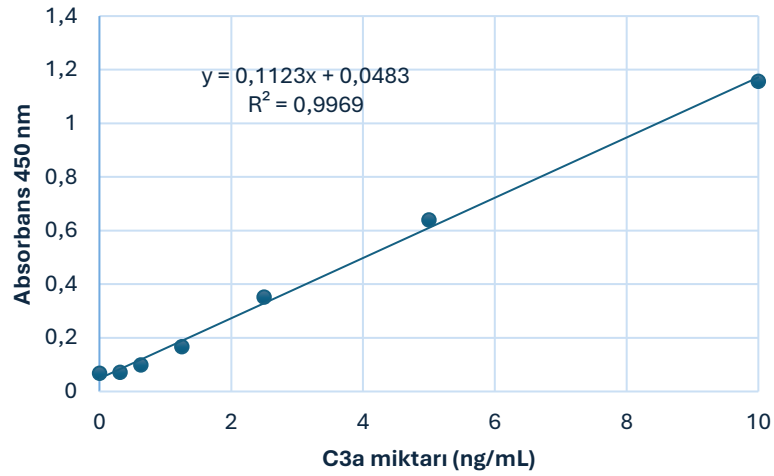
Yapılan stabilite çalışmaları sonucu hem amfifilik türev ile hazırlanan hem de CD polimer ile hazırlanan NP'lerin ortalama partikül büyüklüğü değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik belirlenmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. ACD ve PCD boş NP stabilite testi öncesi ve sonrasına ait partikül boyutu (PB), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (ZP) değerleri (n=3±SS)

Nanopartikül	PB ± SS	PDI ± SS	ZP ± SS
Boş ACD inkübasyon öncesi	133,70 ± 14,40	0,40 ± 0,01	4,58 ± 0,21
Boş ACD inkübasyon sonrası	303,10 ± 51,30	0,48 ± 0,20	-0,99 ± 0,42
Boş PCD inkübasyon öncesi	514,70 ± 19,70	0,44 ± 0,03	-11,70 ± 0,22
Boş PCD inkübasyon sonrası	398,60 ± 46,20	0,39 ± 0,02	-6,57 ± 1,63

4.5.3. Kompleman Aktivasyonu

Formülasyonların neden olduğu kompleman aktivasyonu derecesinin belirlenebilmesi açısından ticari kit ile oluşturulan kalibrasyon doğrusu ve denklemden elde edilen C3a miktarları şekil 4.6 ve tablo 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. 450 nm dalga boyunda ölçülen C3a miktarları ile oluşturulan kalibrasyon doğrusu

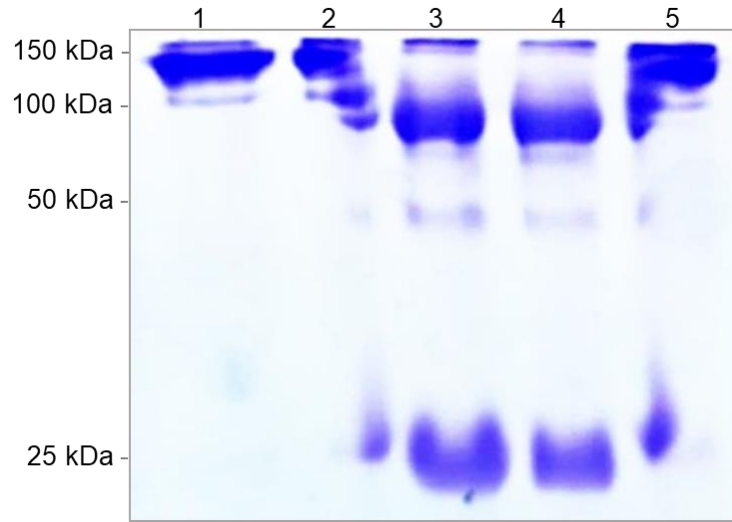
Tablo 4.11. Amfifilik ve polimerik CD NP'lerin neden olduğu kompleman aktivasyonuna ait kalibrasyon denkleminde elde edilen C3a miktarları

Formülasyon	C3a miktarı (ng/mL) \pm SS
PBS	0,08 \pm 0,005
ACD NP	0,075 \pm 0,005
PCD NP	0,071 \pm 0,010

4.6. Mab ile Aktif Hedeflendirilmiş Antikanser İlaç Yüklü Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve in vitro Karakterizasyonu

4.6.1. Rituksimab Adamantan Modifikasyonu:

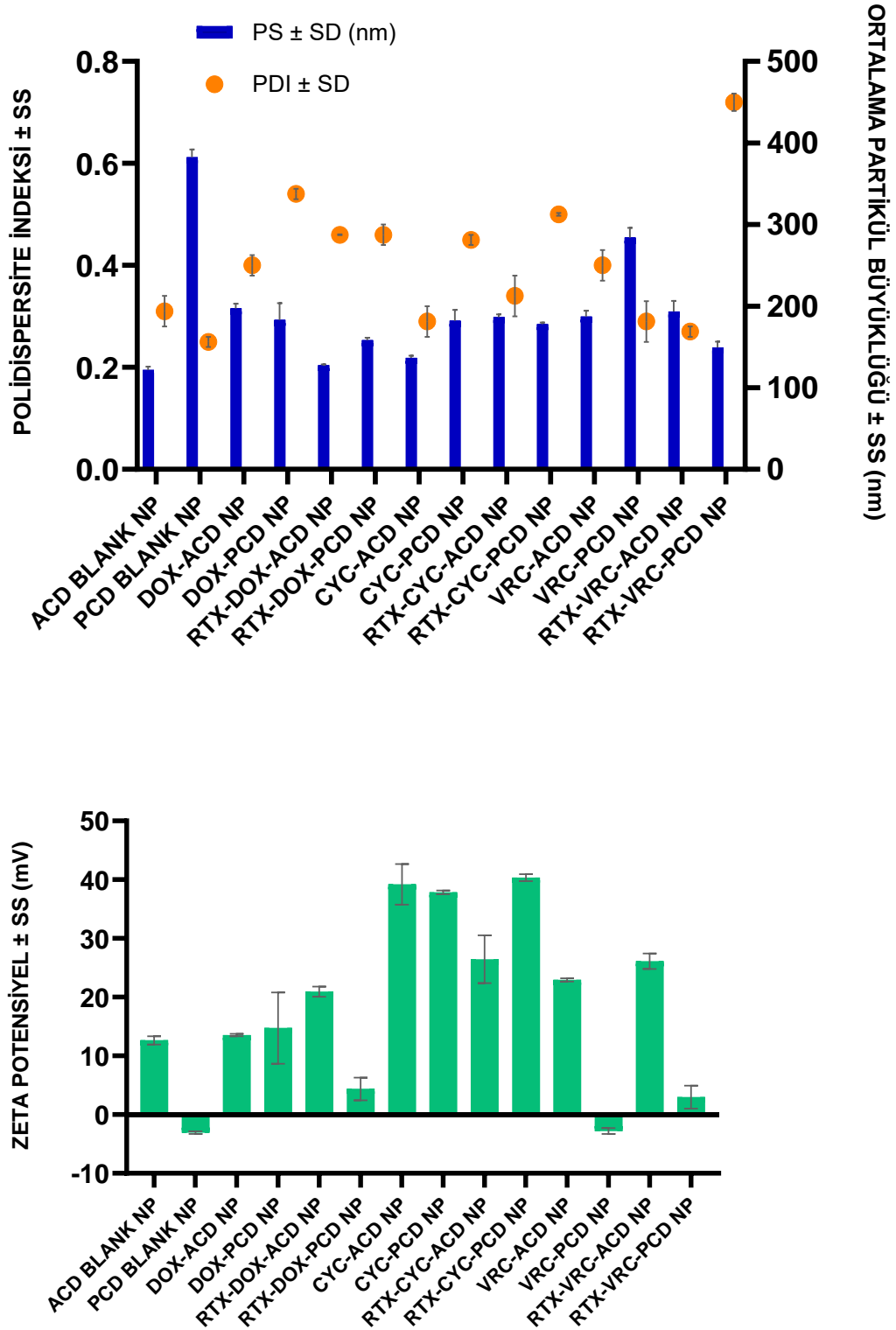
Adamantan-mAb konjugatı denatürasyon ve agregasyon testi SDS PAGE analizi ile yapılmıştır (Şekil 4.7). SDS PAGE jelinin her bir kuyucuğuna sırası ile örnekler uygulanmıştır. Bir ve iki numaralı kuyucuğa yüklenmiş olan örnek 1 ve örnek 2 jel görüntüsü incelendiği zaman konjugasyon reaksiyonunun % 20 DMF ortamında veya % 20 DMF, % 5 gliserol ortamında başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve kontrolle (örnek 5) karşılaştırıldığı zaman antikorun (150 kDa) herhangi bir denatürasyona uğramadığı gösterilmiştir. Bir ve iki numaralı kuyucuğa yüklenmiş olan örnek 3 ve örnek 4 jel görüntüsü incelendiği zaman konjugasyon reaksiyonunun % 20 DMF ortamında veya % 20 DMF, % 5 gliserol ortamına iken 2-mekaptoetanol eklendiği zaman, denatürasyon gerçekleştiği ve denatürasyon sonrası 100 kDa ve 50 kDa, 25 kDa moleküler ağırlığa sahip antikor fragmentlerinin oluştuğu gösterilmiştir



Şekil 4.7. Adamantan-mAb konjugatı SDS PAGE analizi, Örnek 1 (kuyucuk 1), Örnek 2 (kuyucuk 2), Örnek 3 (Kuyucuk 3), Örnek 4 (Kuyucuk 4), Örnek 5 (Kuyucuk 5). Örnek 1; NHS aktive adamantan (0,09 mg/mL), 1 mg/mL mAb, % 20 DMF, Örnek 2; NHS aktive adamantan (0,09 mg/ml), 1 mg/mL mAb, % 20 DMF % 5 gliserol, Örnek 3; NHS aktive adamantan (0,09 mg/ml), 1 mg/mL mAb, % 20 DMF, 20 mM 2- merkaptotanol, Örnek 4; NHS aktive adamantan (0,09 mg/ml), 1 mg/mL mAb, % 20 DMF % 5 gliserol, 20 mm 2-merkaptotanol ve Örnek 5; 1 mg/ml mAb (PBS)

4.6.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yükünün Belirlenmesi

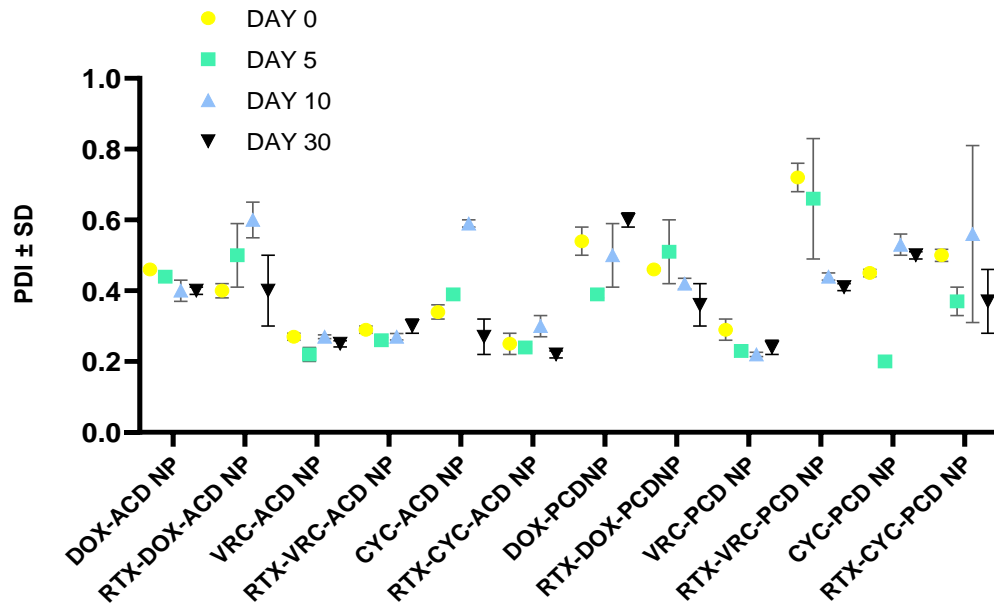
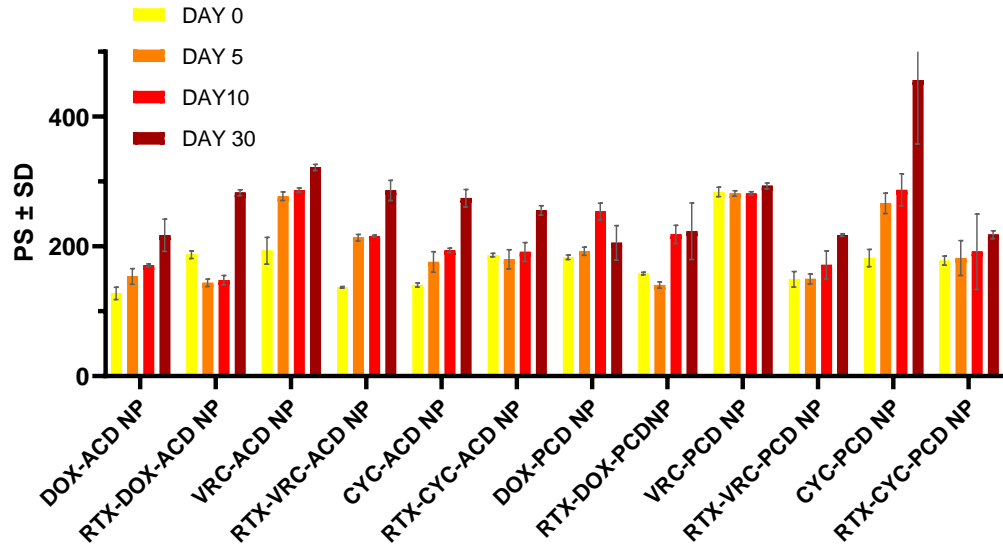
RTX'in formülasyona dahil edilmesiyle DOX yüklü ACD formülasyonları dışında genellikle daha küçük partikül boyutları elde edilmiştir. Bununla birlikte, Şekil 4.8'de görüldüğü gibi, tüm ilaç yüklü NP formülasyonları 200 nm'den küçüktür ve çoğunluğu pozitif yüklüdür.

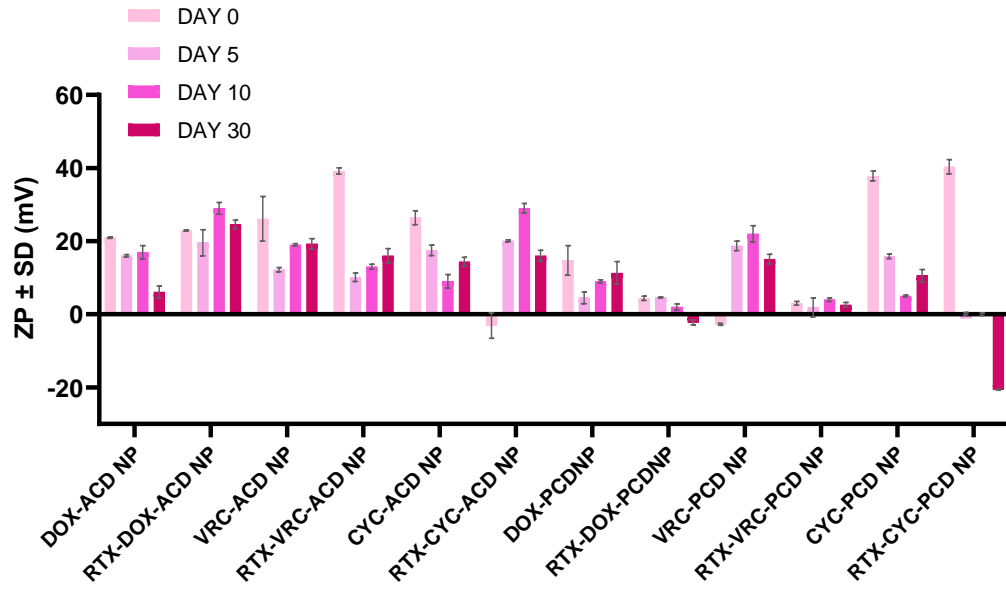


Şekil 4.8. NP'lerin ortalama partikül büyüklüğü (PS), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli (ZP) sonuçları (n=3 ±SD)

4.6.3. Fiziksel Stabilitenin Değerlendirilmesi

Şekil 4.9'te sunulan sonuçlara göre, taze hazırlanan partiküllerin özelliklerinde 5. güne kadar önemli bir değişiklik görülmemektedir.

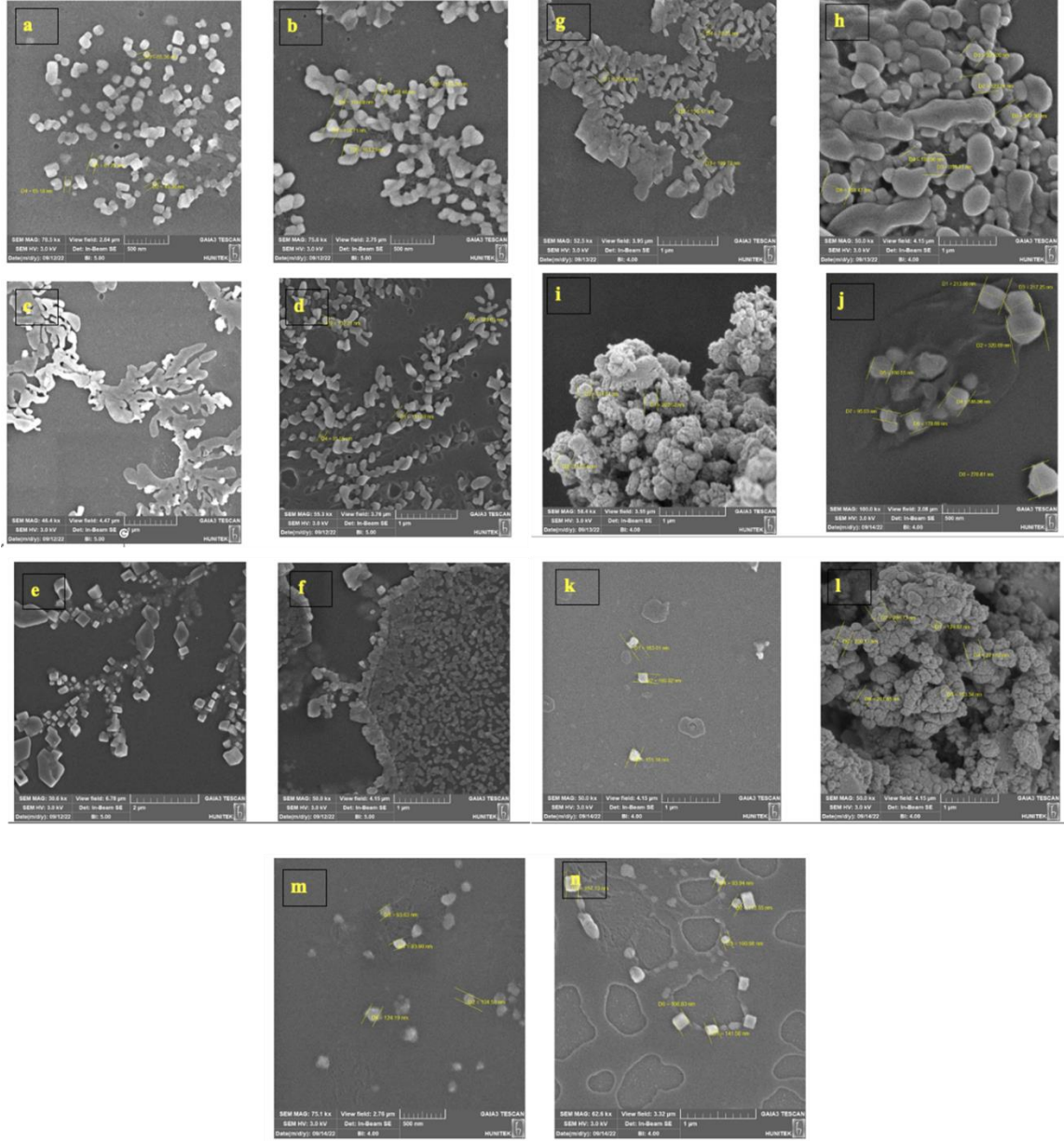




Şekil 4.9. Belirlenen zaman aralıklarında (5., 10. ve 30. günlerde) nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri

4.6.4. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

NP'lerin morfolojik görüntüleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Nanopartiküllere ait SEM görüntüleri a) BOŞ ACD NP, b) DOX-ACD NP, c) VRC-ACD NP, d) CYC-ACD NP, e) RTX-DOX-ACD NP, f) RTX-VRC-ACD NP, g) RTX-CYC-ACD NP, h) BOŞ PCD NP, i) DOX-PCD NP, j) VRC-PCD NP, k) CYC-PCD NP, l) RTX-DOX-PCD NP, m) RTX-VRC-PCD NP, n) RTX-CYC-PCD NP

4.6.5. Nanopartiküllerin Sterilizasyonu

Tablo 4.12'de görüldüğü gibi formülasyon kayıp hacmi %20'den azdır.

Tablo 4.12. Sterilizasyon işleminden önce ve sonra NP formülasyonu sulu kolloidal dispersiyon miktarı.

NANOPARTİKÜL	FİLTRASYON ÖNCESİ MİKTAR (g)	FİLTRASYON SONRASI MİKTAR (g)	% VERİM
RTX-DOX-ACD NP	1,1786	1,1701	99,28
RTX-VRC-ACD NP	1,0945	0,9906	90,50
RTX-CYC-ACD NP	0,6324	0,5247	82,96
RTX-DOX-PCD NP	1,0790	1,0547	97,74
RTX-CYC-PCD NP	0,8314	0,7828	94,16
RTX-VRC-PCD NP	1,0101	0,9635	95,39

4.6.6. İlaç Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

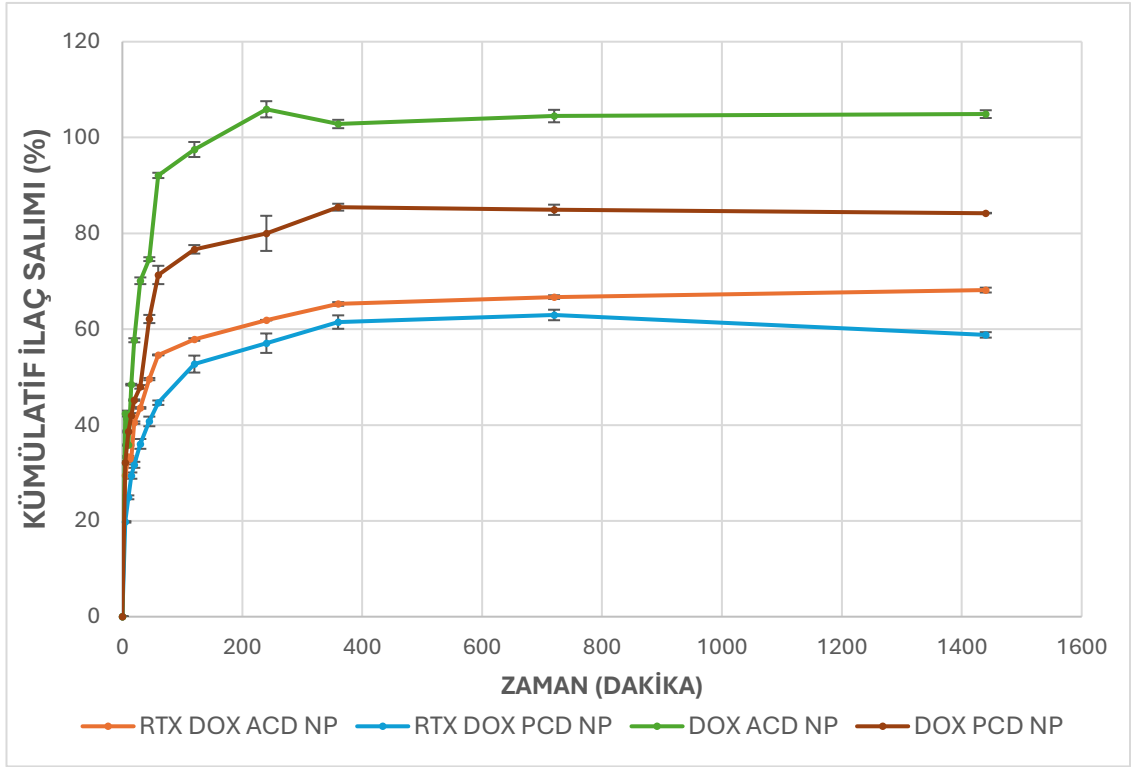
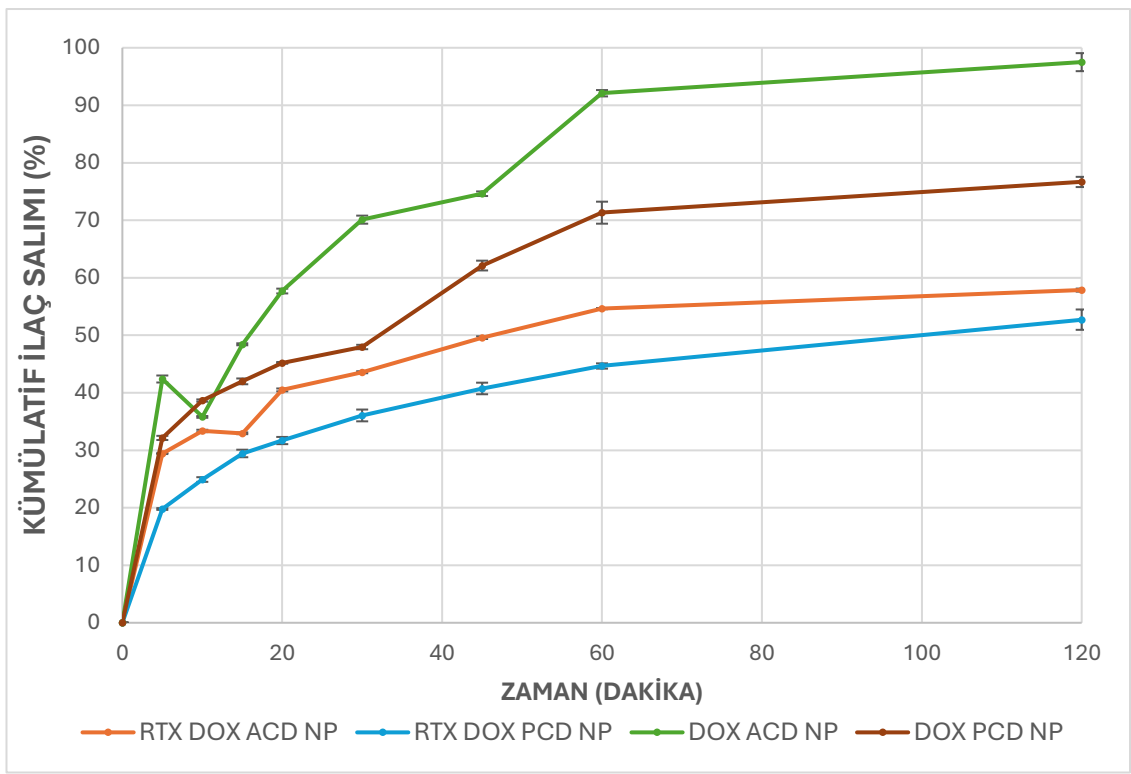
Yükleme etkinliği, HPLC analiziyle ölçülen ilaç miktarının, başlangıçta formülasyonda kapsüllenen antikanser ilaçlarının miktarına oranıyla belirlenmiştir. Formülasyondaki RTX içeriğini ölçmek için bir BCA kiti kullanılmıştır. Sonuçlar tablo 4.13'de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.13. Hazırlanan nanopartiküllere ait % yükleme etkinliği sonuçları

NANOPARTİKÜL	ANTİKANSER İLAÇ YÜKLEME ETKİNLİĞİ (%)	RTX YÜKLEME ETKİNLİĞİ (%)
DOX-ACD NP	60,27 ± 0,1	-
RTX-DOX-ACD NP	83,64 ± 0,15	99,4 ± 0,03
VRC-ACD NP	73,73 ± 0,23	-
RTX-VRC-ACD NP	74,69 ± 0,08	92,7 ± 0,02
CYC-ACD NP	56,43 ± 0,20	-
RTX-CYC-ACD NP	58,72 ± 0,07	94,7 ± 0,002
DOX-PCD NP	62,11 ± 0,43	-
RTX-DOX-PCD NP	46,49 ± 0,8	94,1 ± 0,01
CYC-PCD NP	65,18 ± 1,30	-
RTX-CYC-PCD NP	59,53 ± 2,5	91,9 ± 0,008
VRC-PCD NP	91,77 ± 0,5	-
RTX-VRC-PCD NP	85,16 ± 0,94	101,4 ± 0,006

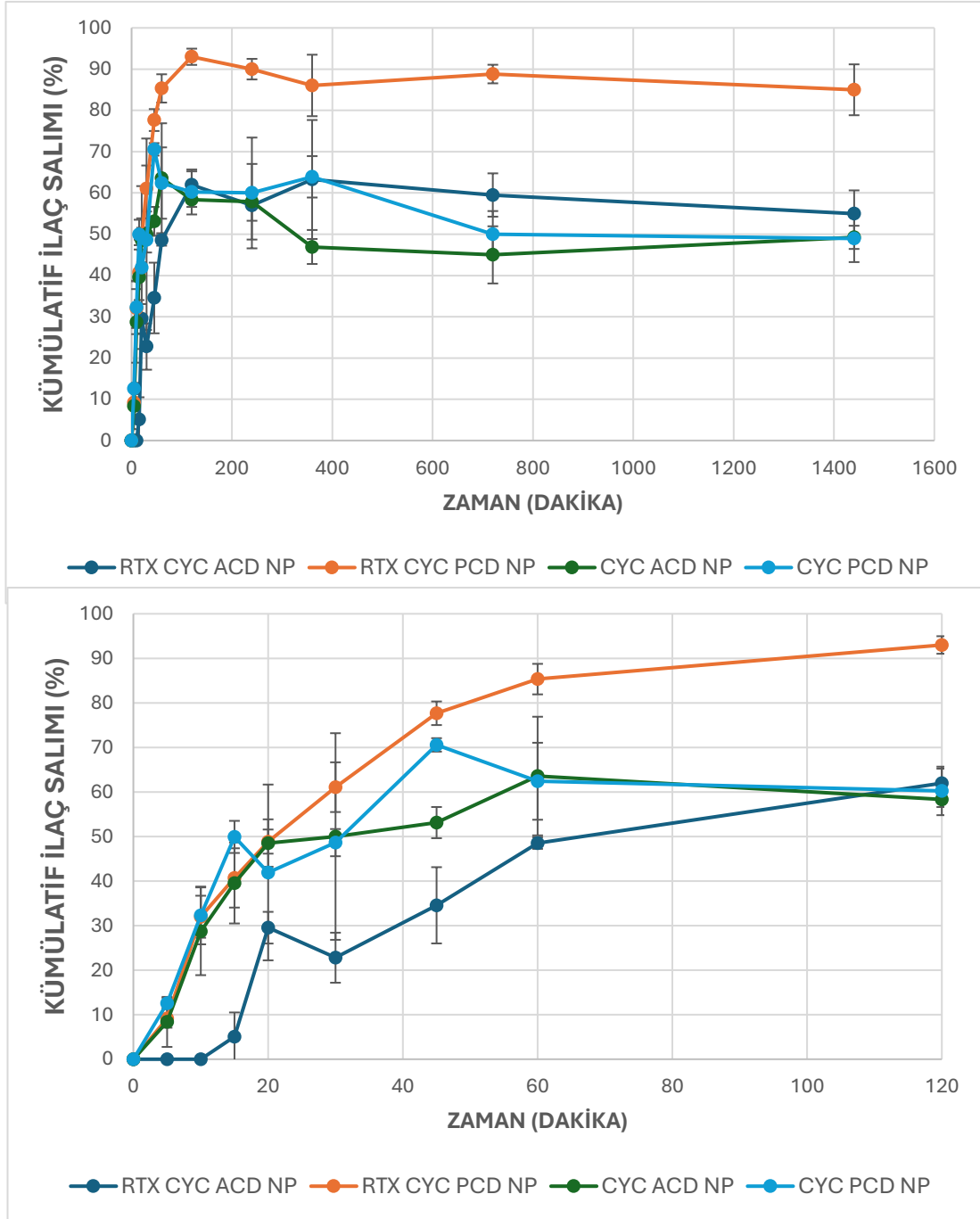
4.6.7. İlaç Salım Profilinin Belirlenmesi

In vitro salım profilleri, formülasyonları karşılaştırmak ve NP'lerin in vivo salım kinetiğini tahmin etmek için değerli bilgiler sağlamıştır ve aynı zamanda bir kalite kontrol ölçüsü olarak da hizmet etmiştir. Şekil 4.11'te gösterilen DOX salım sonuçları verilmiştir.



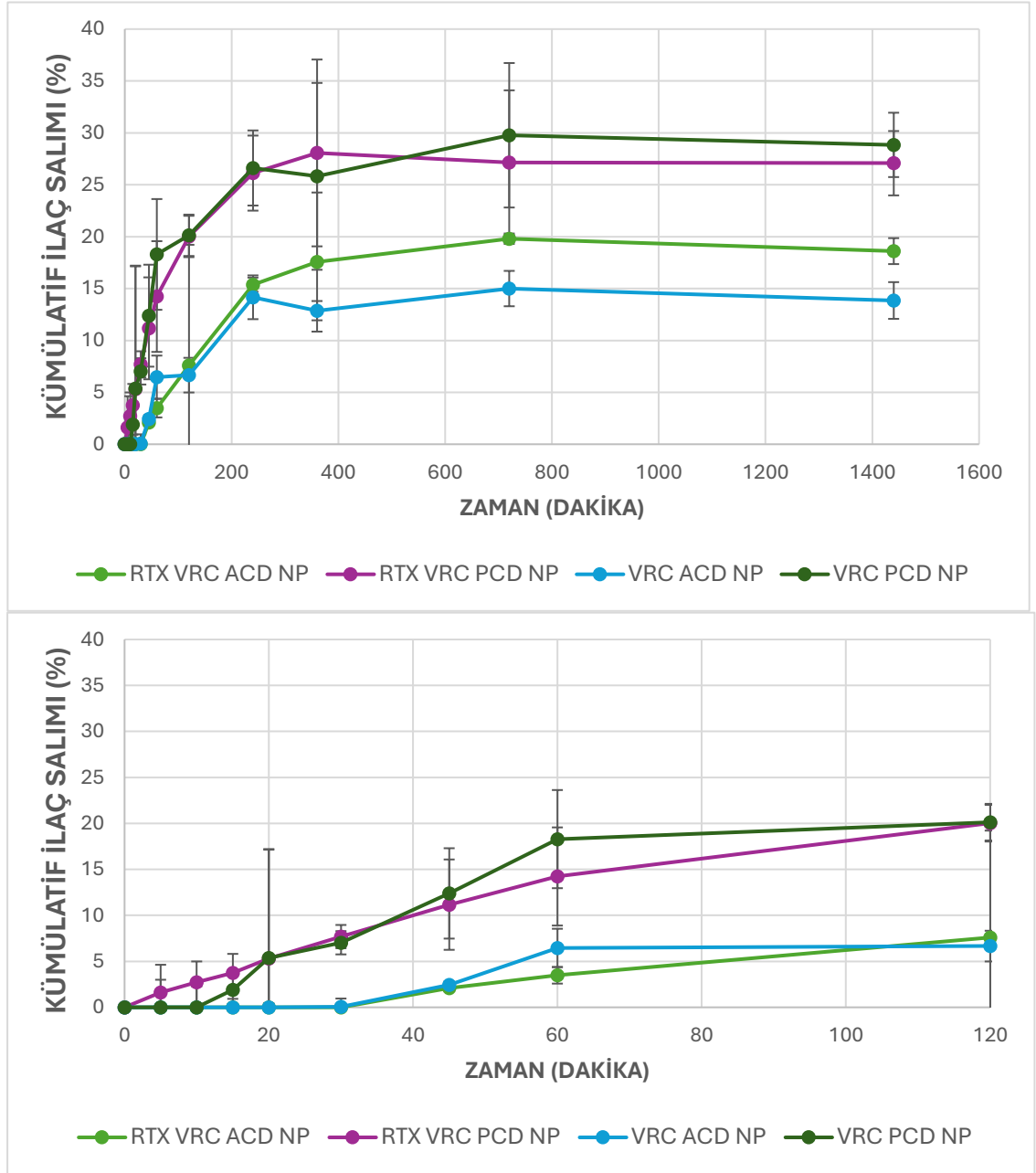
Şekil 4.11. PBS'de (pH 7.4) DOX'un ($n=3 \pm SD$) zamana bağlı salım sonuçları, 37 °C'de 100 rpm'de su banyosunda inkübe edildi. Aşağıdaki grafik ilk 120 dakikanın genişletilmiş halidir.

Şekil 4.12'de ise CYC'nin salım profili sonuçları görülmektedir



Şekil 4.12. PBS'de (pH 7.4) CYC'un ($n=3 \pm SD$) zamana bağlı salım sonuçları, 37 °C'de 100 rpm'de su banyosunda inkübe edildi. Aşağıdaki grafik ilk 120 dakikanın genişletilmiş halidir.

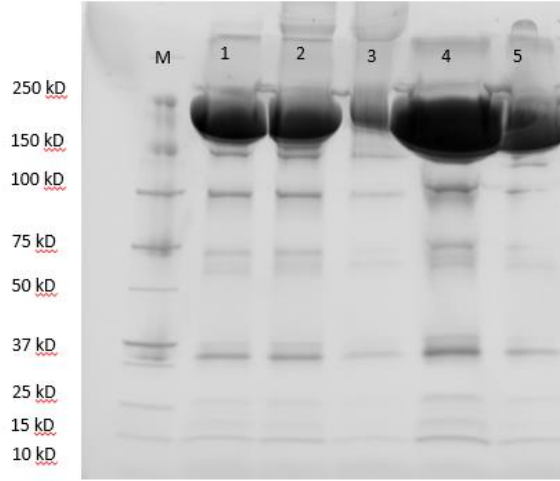
Şekil 4.13'te VRC'e ait salım sonuçları yer almaktadır.



Şekil 4.13. PBS'de (pH 7.4) VRC'un (n=3 ±SD) zamana bağlı salım sonuçları, 37 °C'de 100 rpm'de su banyosunda inkübe edildi. Aşağıdaki grafik ilk 120 dakikanın genişletilmiş halidir.

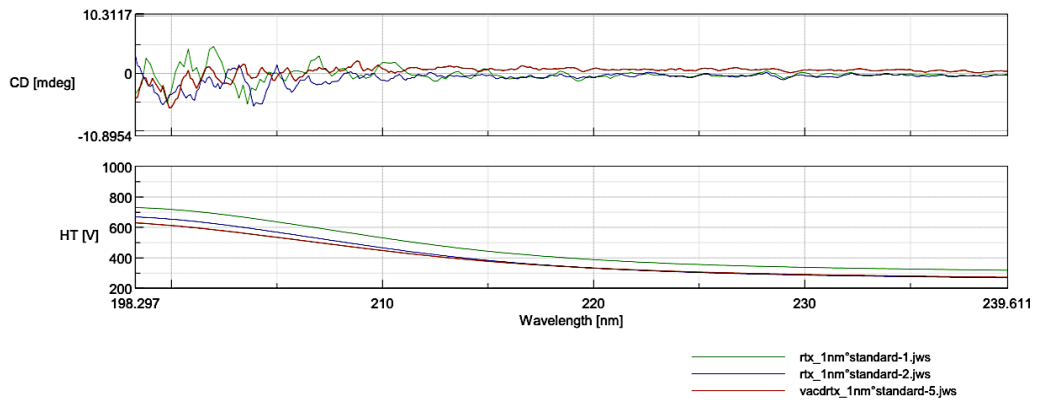
4.6.8. Nanopartikül Yapısındaki Rituksimab'ın Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi

Şekil 4.14'te belirtildiği gibi ACD ve PCD türevleriyle hazırlanan NP formülasyonlarındaki RTX, serbest RTX ile aynı bantları göstermektedir.



Şekil 4.14. CD nanopartiküllerindeki RTX'in yapısal bütünlüğünü belirlemek için doğal koşullar altında SDS-PAGE analizi sonuçları. Hat M: Precision Plus Protein Unstained Protein Standards; Hat 1: Rituksimab standardı; Hat 2: RTX-ACD NP; Hat 3: RTX-PCD NP; Hat 4: RTX-ilaç yüklü ACD NP ; Hat 5: RTX-ilaç yüklü PCD NP

Cenevre Üniversitesi'nde gerçekleştirilen sirküler dikroizm çalışmasına ait sonuçlar şekil 4.15'te verilmiştir.

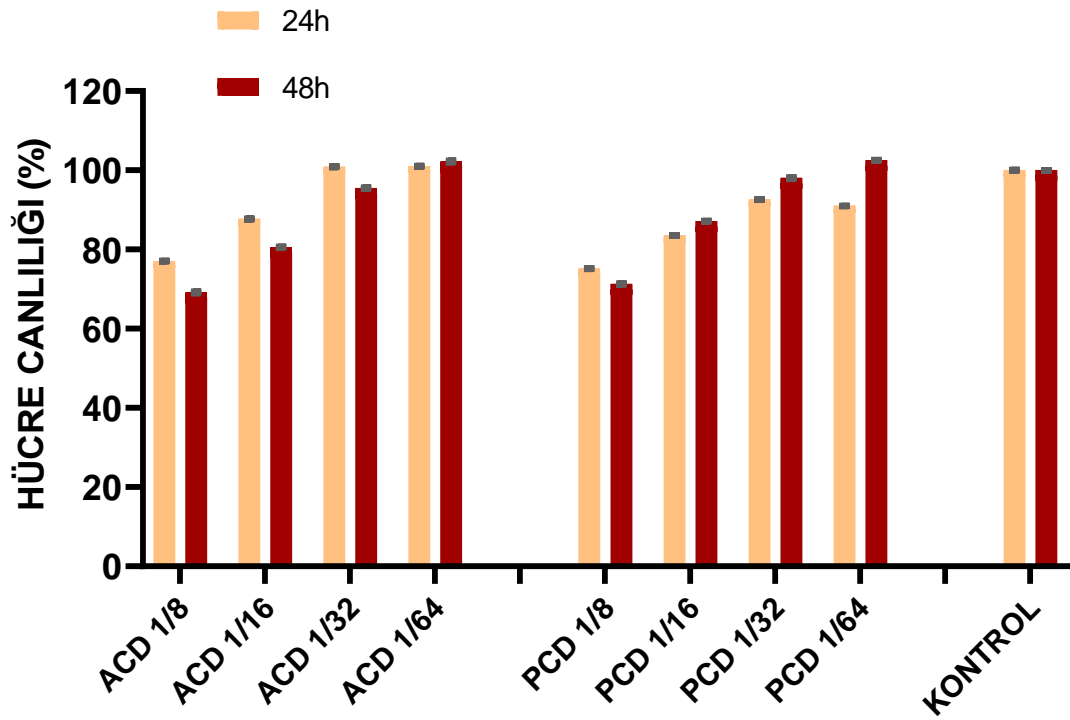


Şekil 4.15. Serbest RTX ve NP'e bağlı RTX'e ait sirküler dikroizm spektrumları

4.7. Nanopartiküler Sistemin Güvenliğinin ve Etkinliğinin Konvansiyonel Hücre Kültürü Çalışmalarında Belirlenmesi

4.7.1. Boş Nanopartiküllerin Güvenliğinin Belirlenmesi

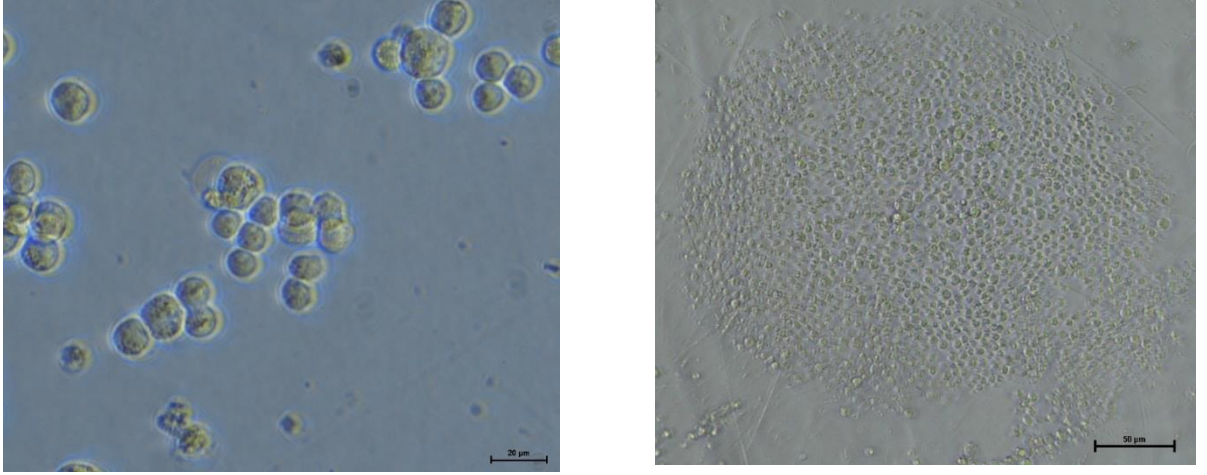
Formülasyonlarında kullanılan CD türevlerinin konsantrasyonları belirli oranlarda DMEM ile seyreltilerek L929 hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 4.16, çeşitli CD seyreltilerine maruz bırakılan L929 hücrelerinin canlılık yüzdesini göstermektedir.



Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda Gua-CD'lerin L929 sağlıklı fibroblast hücrelerinde 24 saat ve 48 saat ($n=6 \pm SD$) boyunca hücre canlılığı üzerindeki etkisi. CD solüsyonları seyreltilerek hazırlanmıştır.

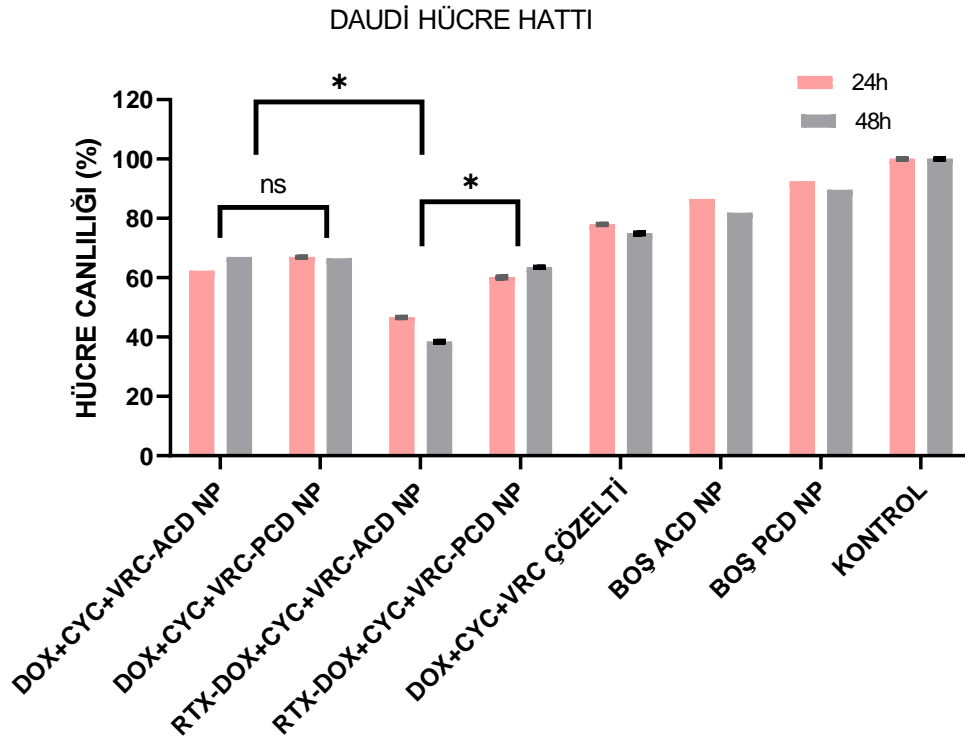
4.7.2. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Etkinliğinin Belirlenmesi

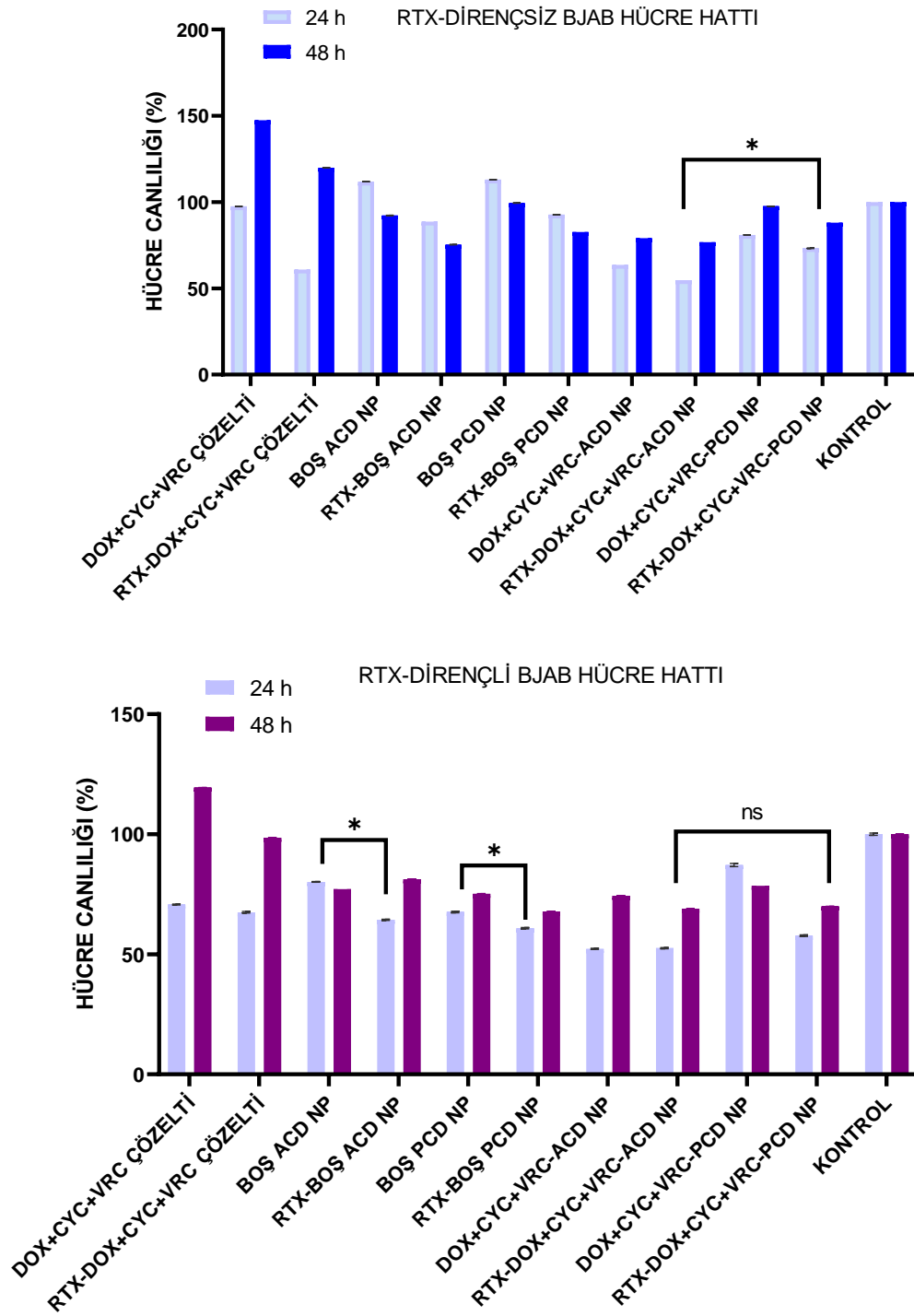
Daudi hücrelerinin flask içinde ve kuyucuk içindeki mikroskopik görüntüleri Şekil 4.17 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Daudi insan lenfoma hücrelerinin mikroskopik görüntüleri

Daudi ve Bjab (Direnç gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücre hatları üzerinde belirlenmiştir ve insan lenfoma hücreleri ve ile yapılan 24 ve 48 saatlik hücre canlılık analizlerinin sonuçları Şekil 4.18'de gösterilmiştir.

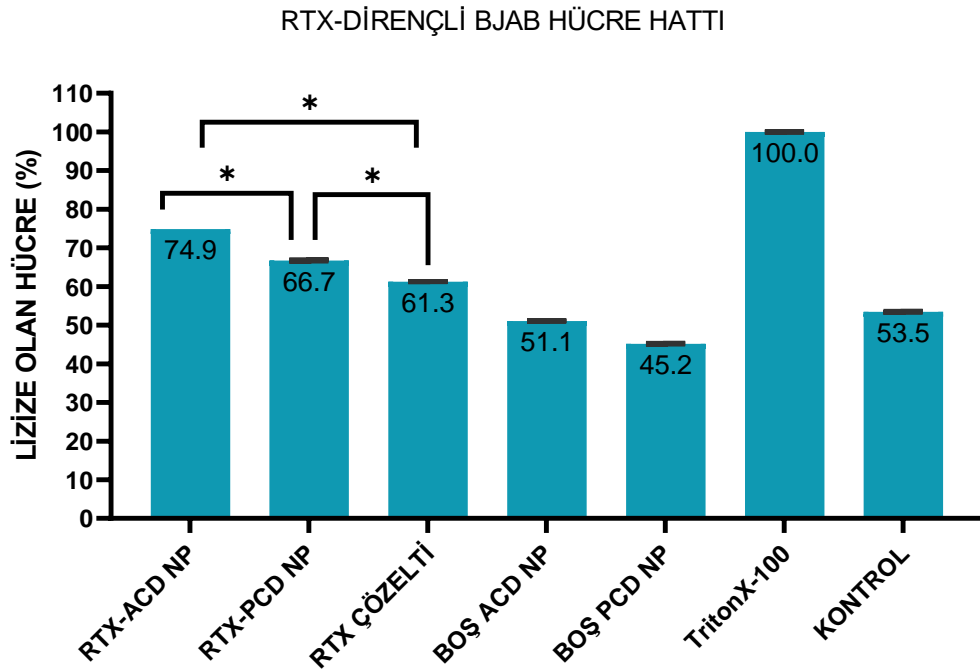
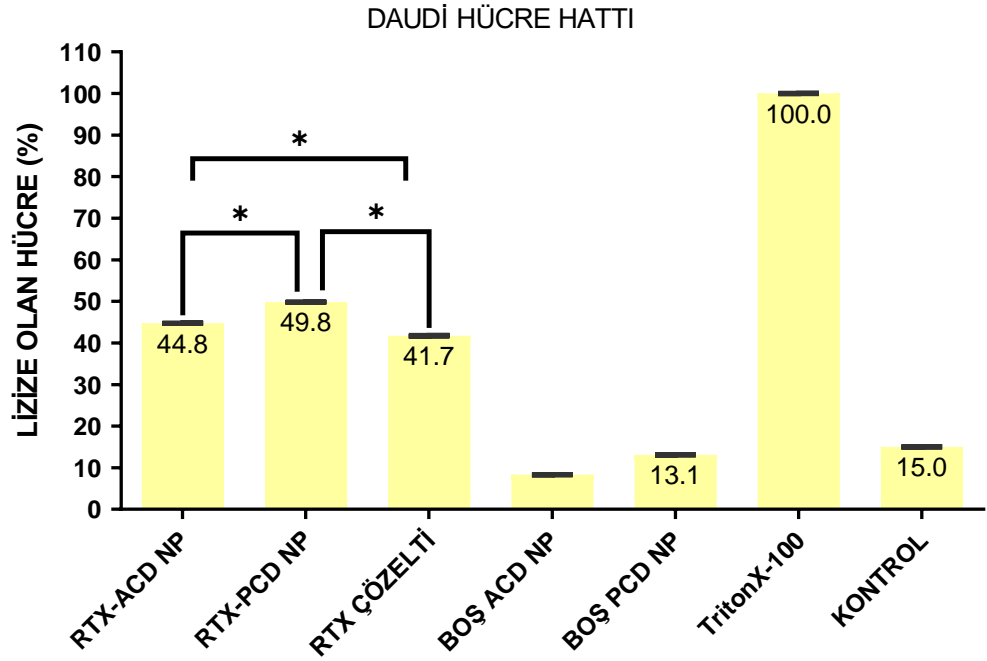


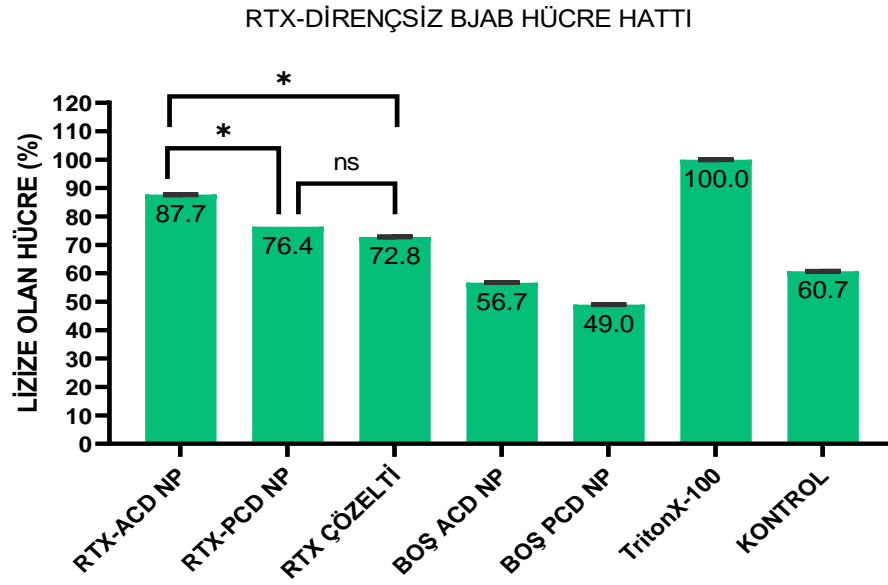


Şekil 4.18. Daudi ve Bjab (Direnç gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücreleri ile 24 saat ve 48 saat inkübe edilen farklı NP formülasyonları (DOX, VRC, CYC yüklü üç farklı antikanser ilacı), boş CD NP'leri ve üç farklı ilaç çözeltisi kullanılarak hücre canlılığı (%) (n=3, ±SD) değerlendirildi. p<0.05. Hücre canlılığı WST-1 testi ile değerlendirildi.

4.7.3. Antikora Bağımlı Hücrel Sitotoksitenin Belirlenmesi

Şekil 4.19 ile gösterilen sonuçlara göre, RTX içeren GuaCD nanopartiküllerin her ikisinde de en az serbest RTX kadar efektör hücreyi uyardığı belirlenmiştir.

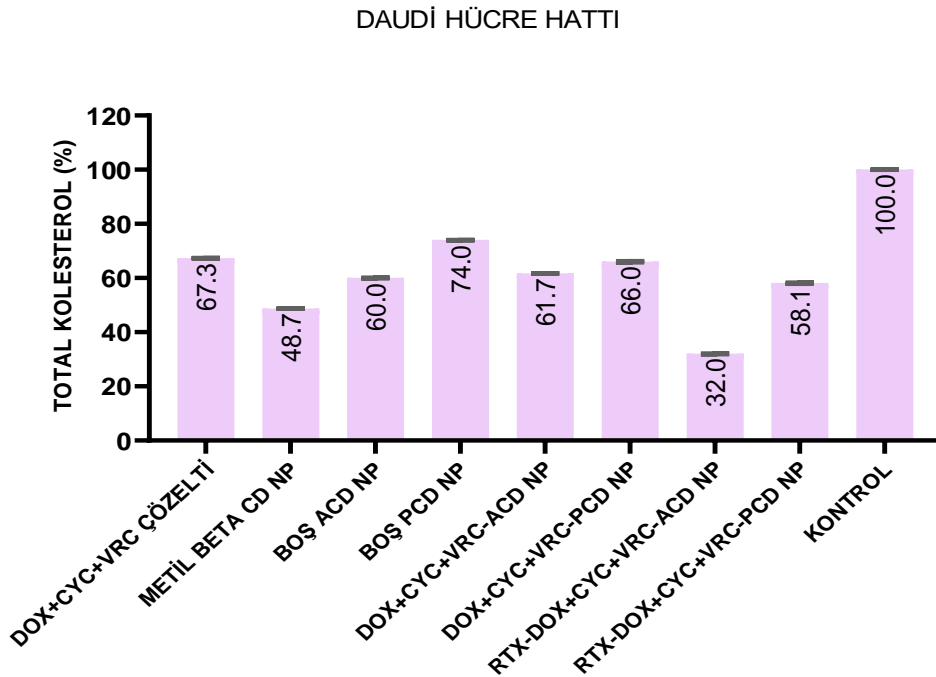




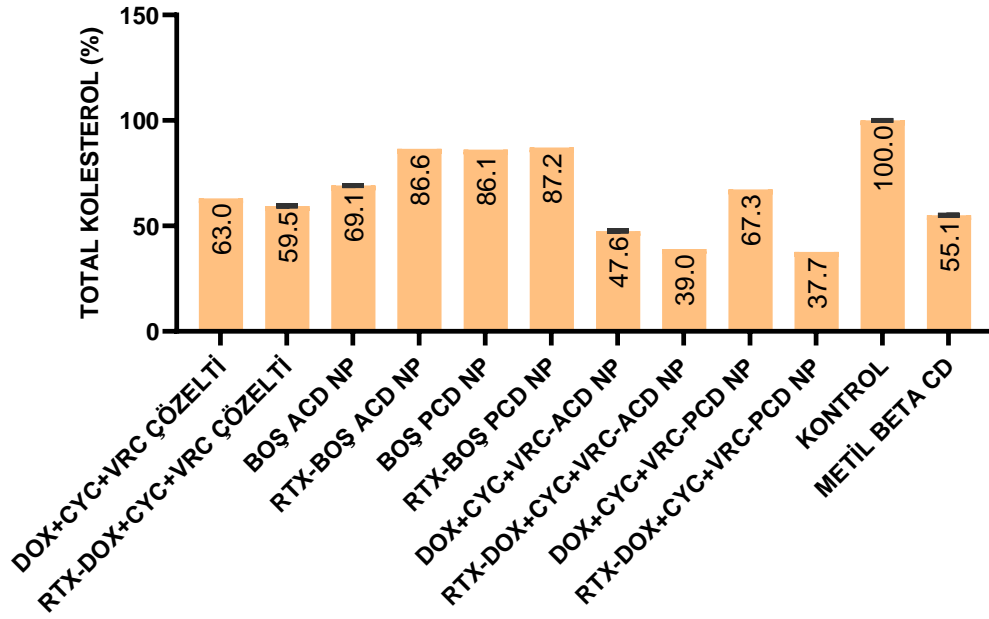
Şekil 4.19. Farklı nanopartikül formülasyonları ve ilaç çözeltileri ile inkübe edilen Daudi ve Bjab lenfoma hücrelerde yüzde lizise oranı (n=8 ± SS)

4.7.4. Kolesterol Ekstraksiyon Çalışması

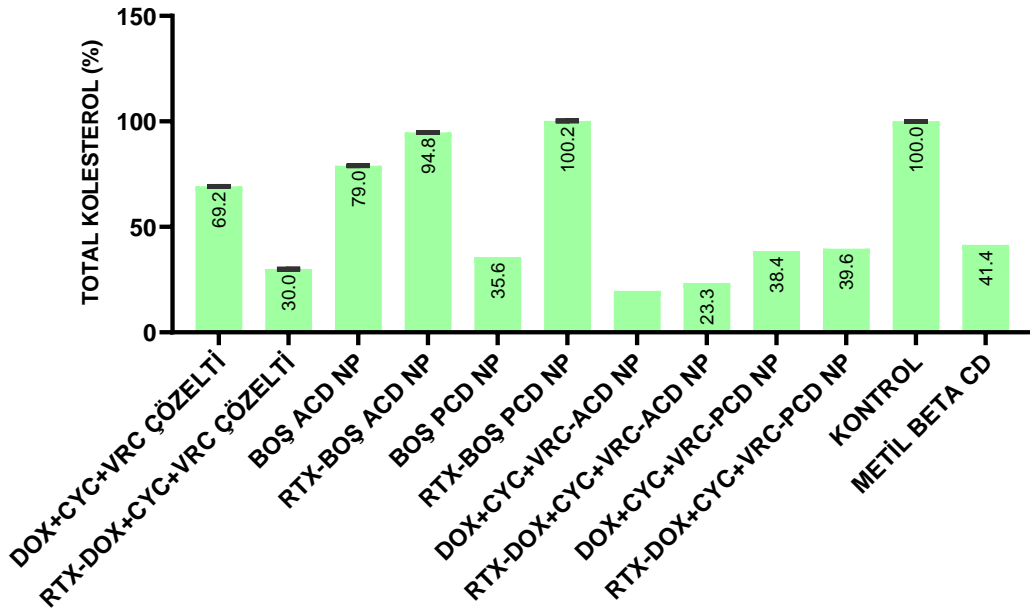
Kolesterol ekstraksiyon çalışmaları sonucu elde edilen bulgular Şekil 4.20 ile gösterilmiştir.



RTX-DİRENÇLİ BJAB HÜCRE HATTI



RTX-DİRENÇSİZ BJAB HÜCRE HATTI



Şekil 4.20. Üç farklı antikanser ilaç yüklü (DOX, CYC, VRC) yüklü farklı NP formülasyonları, boş CD NP ve üç farklı ilaç çözeltileri ile inkübe edilen Daudi, ve Bjab) insan lenfoma hücrelerindeki kolesterol miktarı yüzdesi (n=3, ±SS)

4.7.5. Survivin Deneyi

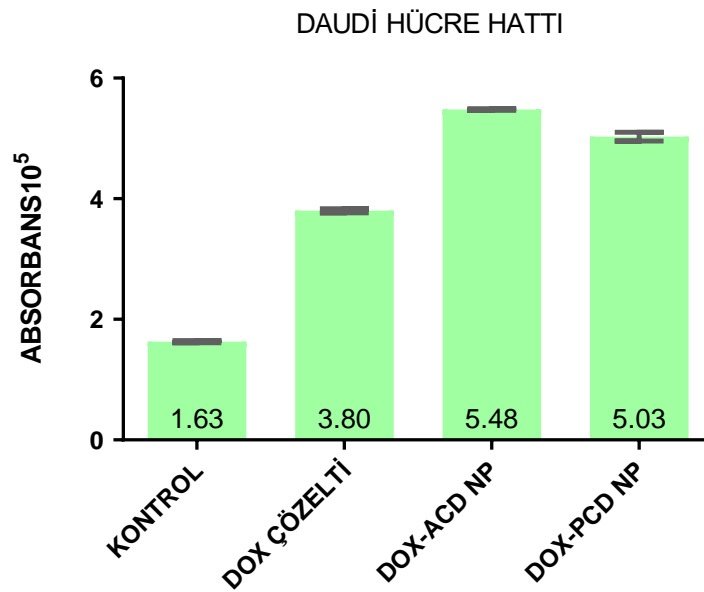
Daudi hücrelerindeki survivin miktarındaki değişim sonuçları Tablo 4.14 ile gösterilmiştir.

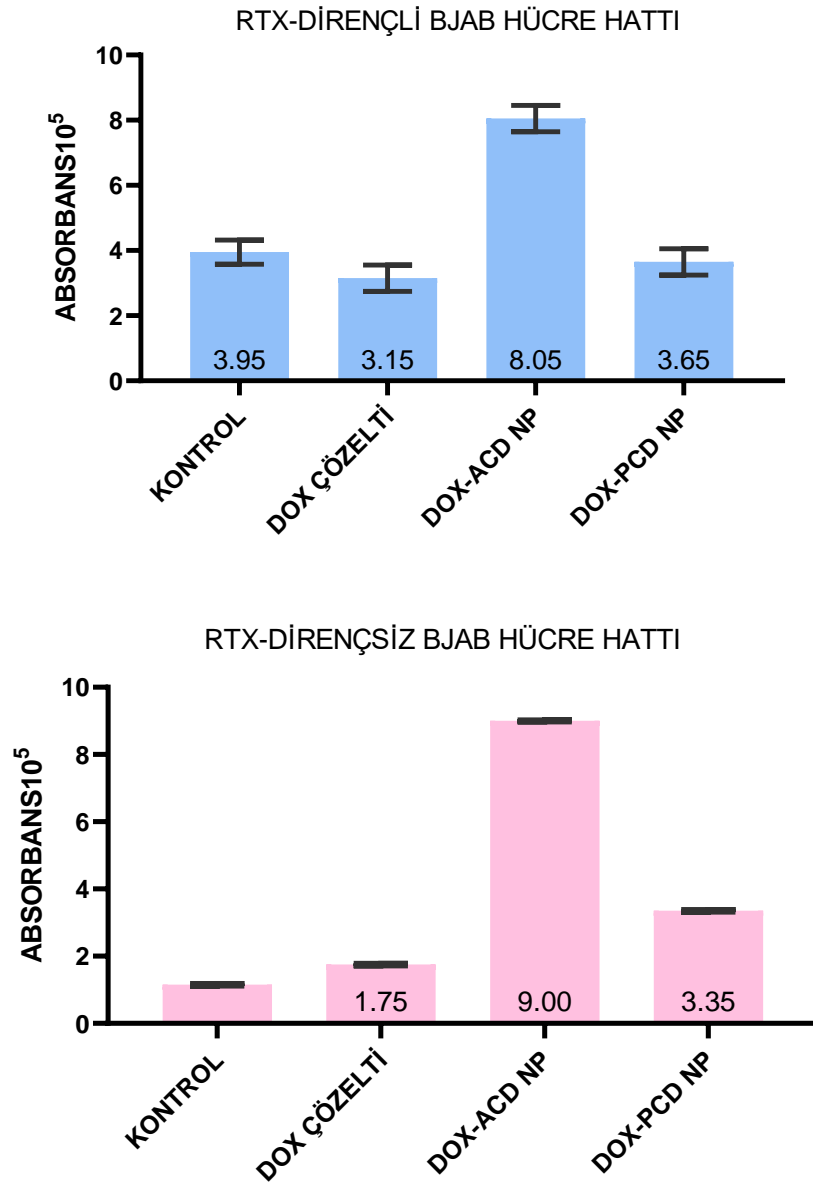
NANOPARTİKÜL	SURVIVIN PROTEİN MİKTARI (ng/mL)	% SURVIVIN MİKTARI
RTX-DOX+CYC+VRC-ACD NP	3178 ± 0,22	11,3
RTX-DOX+CYC+VRC-PCD NP	10818 ± 0,09	38,3
DOX+CYC+VRC-ACD NP	5213 ± 0,05	18,5
DOX+CYC+VRC-PCD NP	8421 ± 0,08	29,8
BOŞ ACD NP	17623 ± 0,06	62,5
BOŞ PCD NP	21765 ± 0,08	77,1
DOX+CYC+VRC ÇÖZELTİ	20421 ± 0,11	72,4
KONTROL	28219 ± 0,04	100

Tablo 4.14. Farklı nanopartikül formülasyonları ve ilaç çözeltileri ile inkübe edilen Daudi hücrelerindeki Survivin protein miktarı

4.7.6. Mitokondri İzolasyonu

Şekil 4.21’de gösterilen mitokondri izolasyon analizi sonuçlarına göre her iki GuaCD türevinin de daha fazla miktarda DOX’i çözelti formuna göre mitokondriye ulaştırdığı söylenebilir.

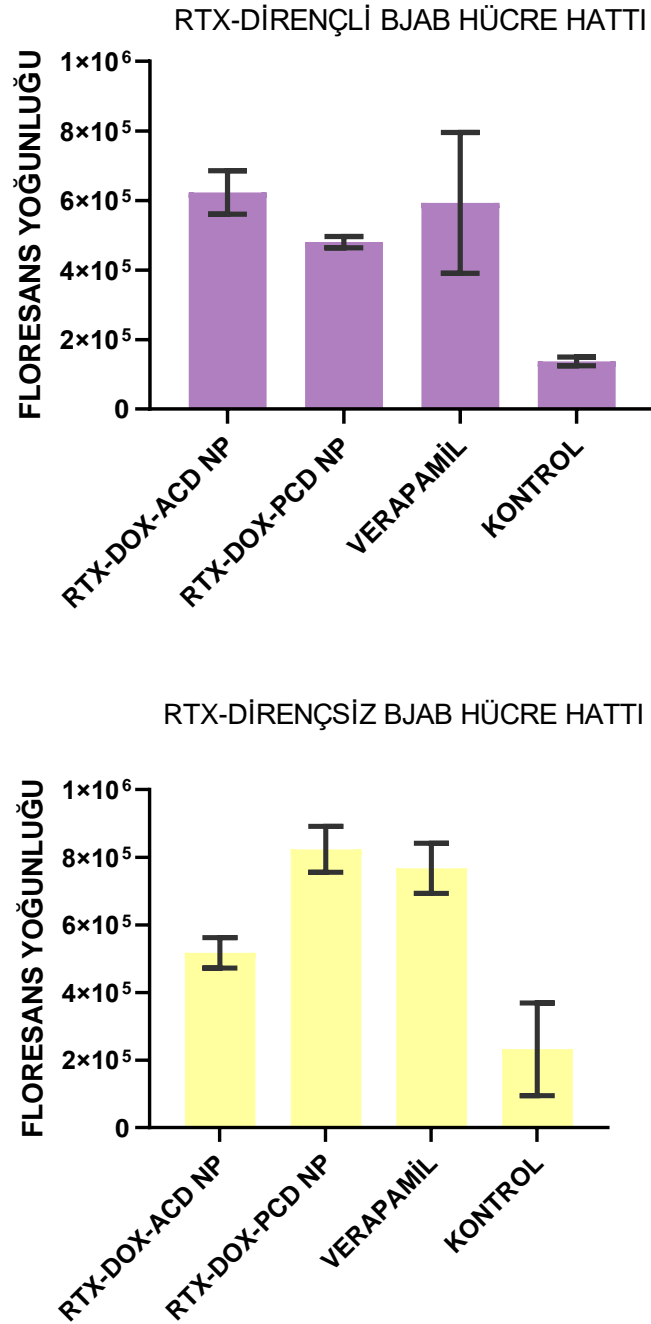




Şekil 4.21. DOX yüklü CD nanopartikülleri ve DOX çözeltisi ile inkübe edilen Daudi ve Bjab (Direnc gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücrelerinde mitokondride detekt edilen doksorubisin miktarı (n=8, \pm SS)

4.7.7. P-gp İnhibisyonunun Belirlenmesi

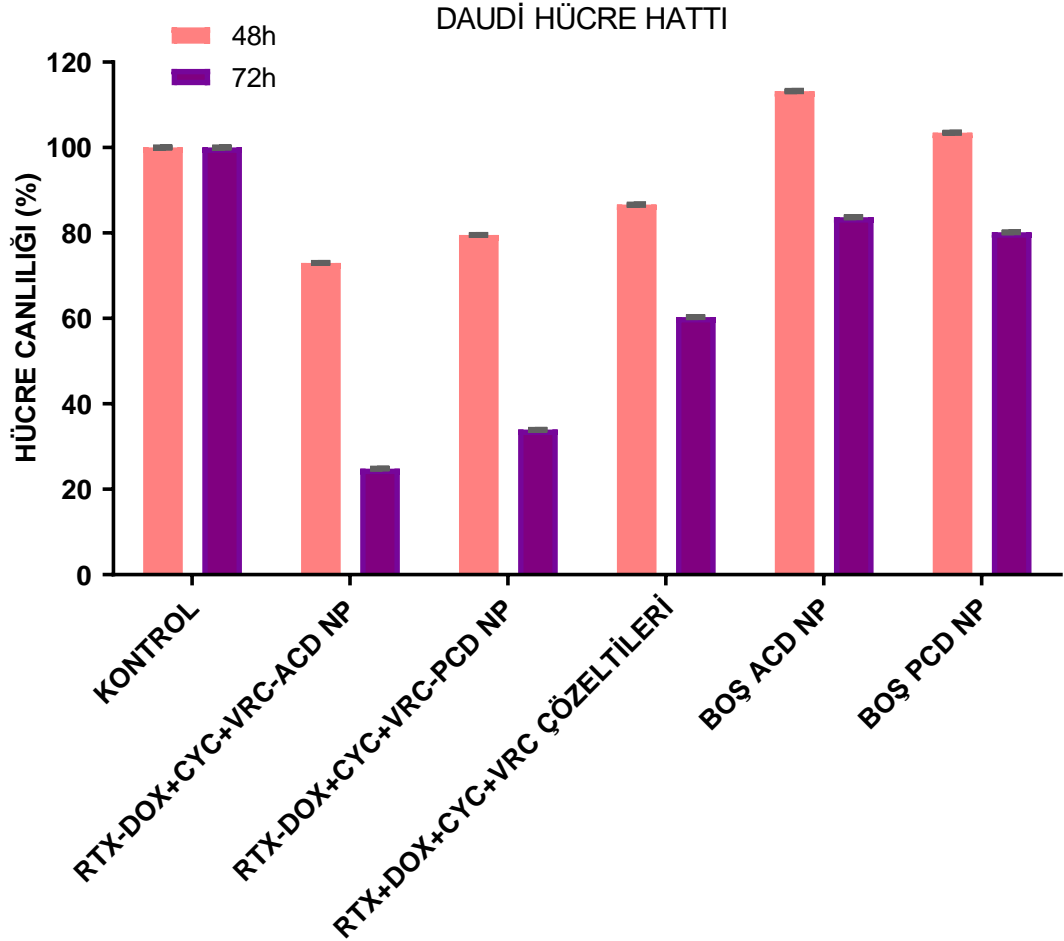
Şekil 4.22’de ACD, PCD ve pozitif kontrol grubu olarak kullanılan Verapamil ile inkübe edilmiş Bjab (Direnç gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücrelerinde akümüle olan Kalsein miktarı (n=3 ±SS)



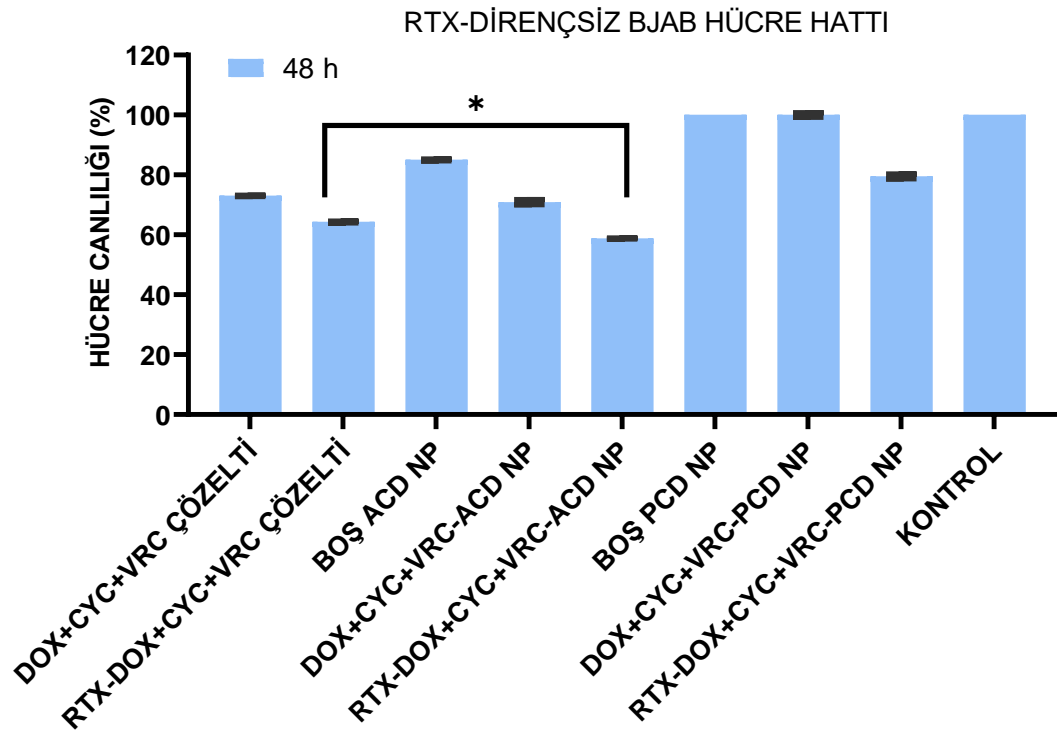
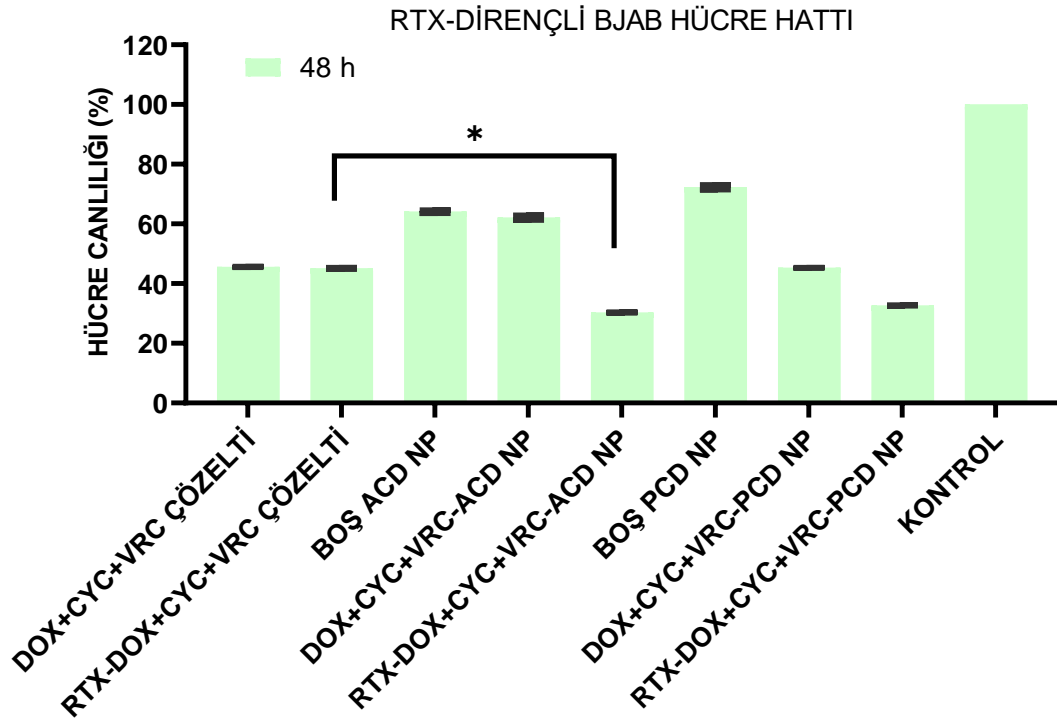
Şekil 4.22. RTX-DOX-ACD NP formülasyonları ve Verapamil ile inkübe edilen Bjab (Direnç gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücrelerinde akümüle olan Kalsein miktarı (n=3 ±SS)

4.8. 3B Tümör Modeli Çalışmaları

Şekil 4.23 ve 4.24'te gösterilen bulgulara göre 48 saatlik inkübasyon sonunda ilaç yüklü nanopartiküllerde ve ilaç çözeltilerinde %70'in üzerinde hücre canlılığı gözlenmiştir.

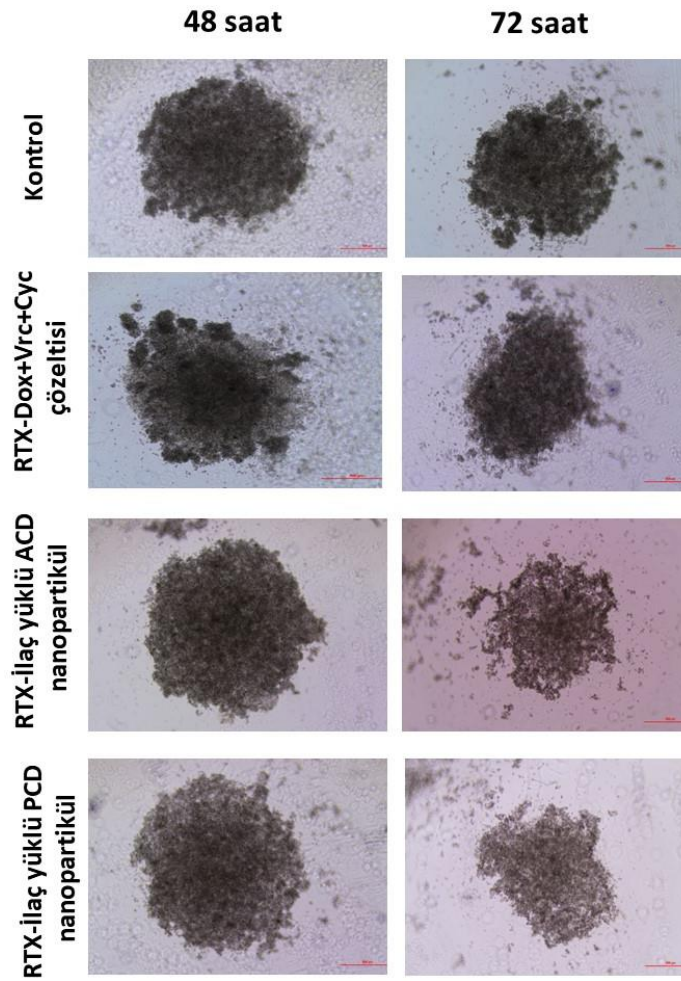


Şekil 4.23. Farklı formülasyonlarla inkübe edilen Daudi 3B lenfoma sferoidlerinde 48 ve 72 saat sonunda hücre canlılığı ($n=6 \pm SS$)



Şekil 4.24. Farklı formülasyonlarla inkübe edilen Bjab (Direnç gelişmiş ve gelişmemiş) 3B lenfoma sferoidlerinde 48 saat sonunda hücre canlılığı (n=6 ± SS)

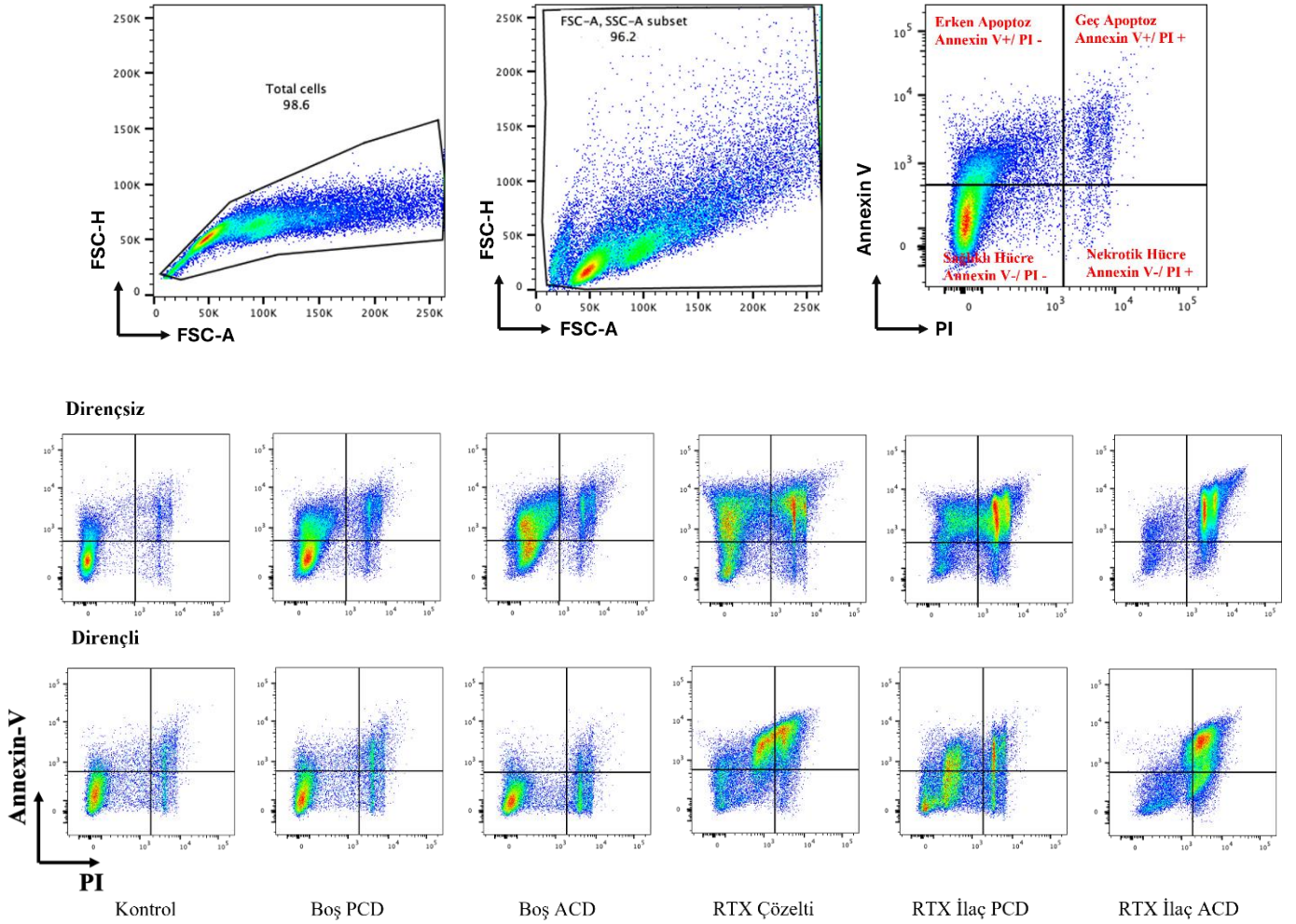
Eş zamanlı olarak sferoidler mikroskopik olarak görüntülenerek değişiklikler izlenmiştir. Elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 4.25 ile gösterilmiştir.



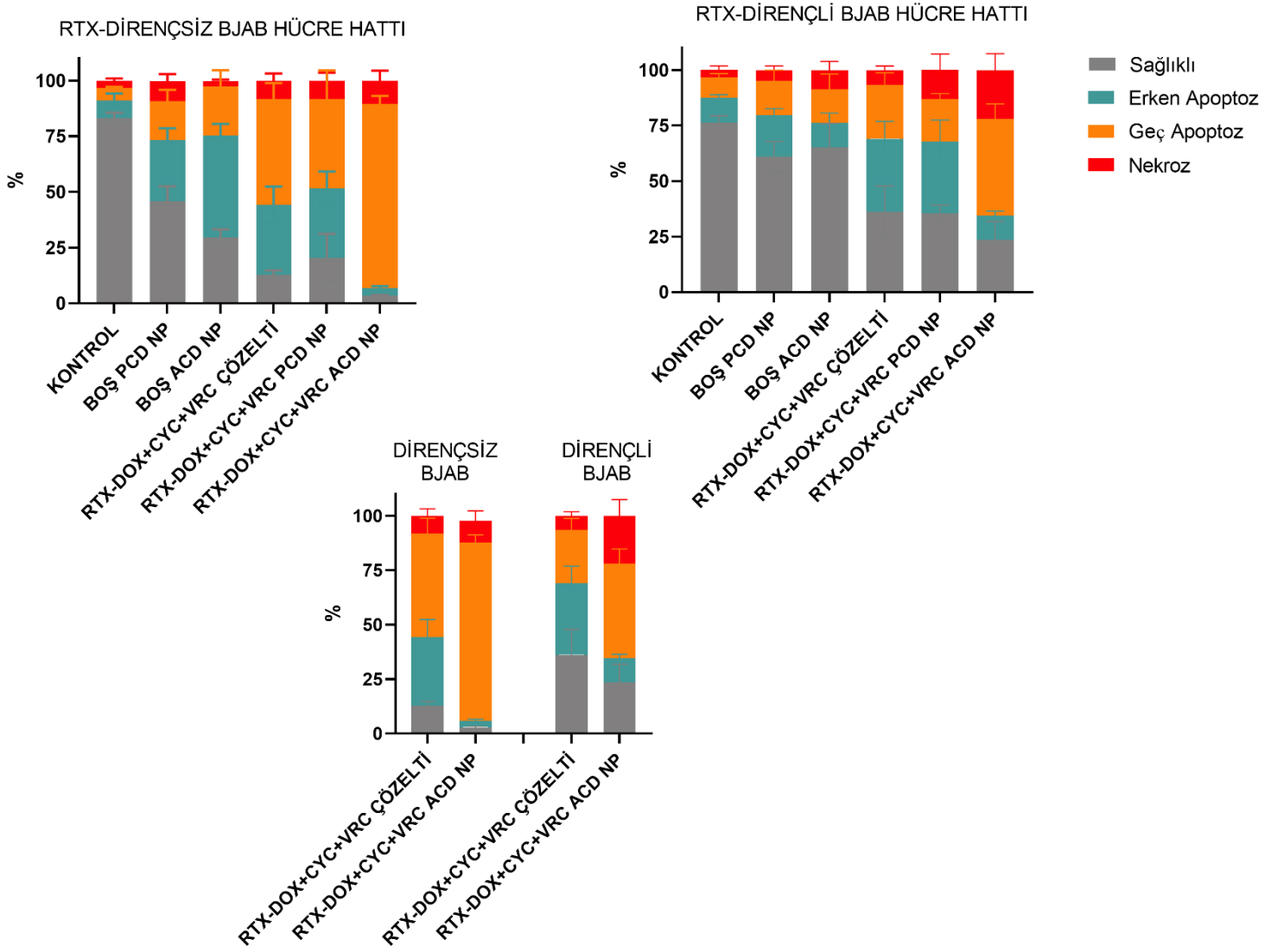
Şekil 4.25. Şekil 18. 48 ve 72 saat sonra farklı formülasyonlarla inkübe edilen 3B lenfoma sferoidlerinin mikroskop görüntüleri. Işık mikroskobu altında sferoidlerin morfolojik yapısı gözlenmiştir.

4.9. Hücre Ölüm Mekanizmasının Belirlenmesi

Dirençli ve dirençsiz Bjab hücre hatlarında hazırlanan farklı formülasyonlar ile çalışıldığında hücelere ait ölüm mekanizmaları şekil 4.26 ve 4.27’de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.26. Dirençli ve dirençsiz Bjab hücre hatlarında hazırlanan farklı formülasyonlar ile çalışıldığında hücelere ait ölüm mekanizmaları

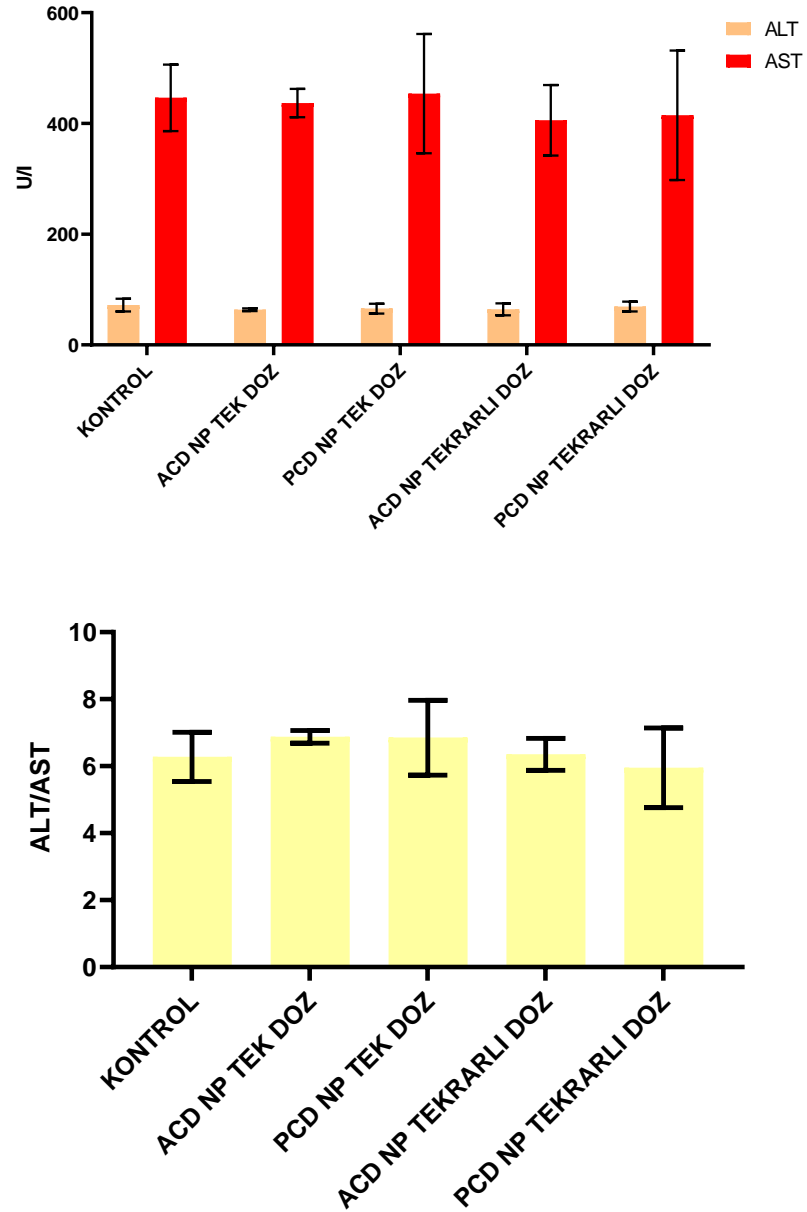


Şekil 4.27. Dirençli ve dirençsiz Bjab hücre hatlarında hazırlanan farklı formülasyonlar ile çalışıldığında hücelere ait ölüm mekanizmalarının yüzde olarak ifadesi

4.10. Hayvan Çalışmaları

4.10.1. Güvenlilik Çalışması

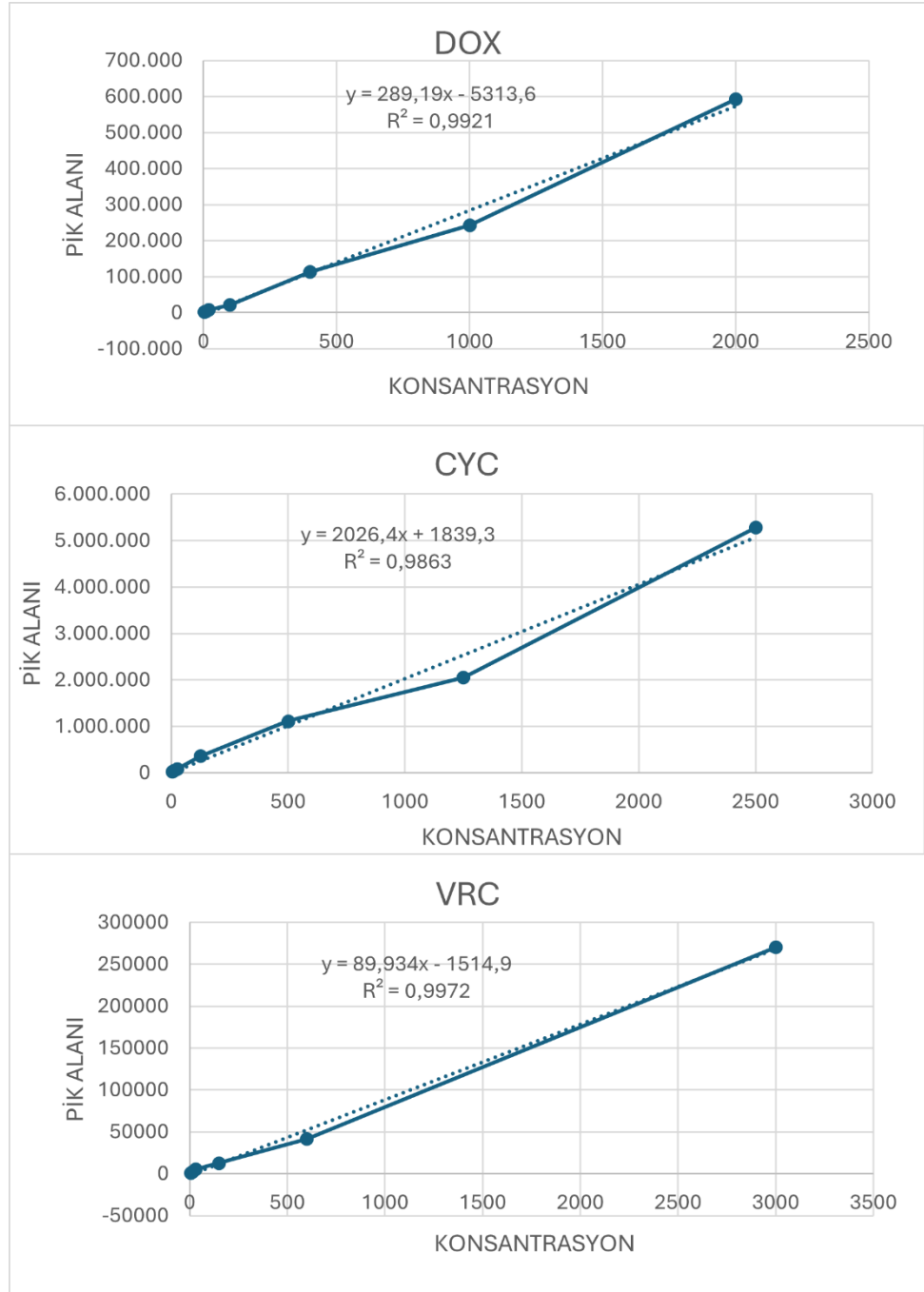
Şekil 4.28'te gösterilen güvenlilik çalışması sonuçları, sağlıklı Balb/c farelerden alınan serum örneklerinden hareketle Kobay A.Ş.'de analizinin yapılmasıyla elde edilmiştir.



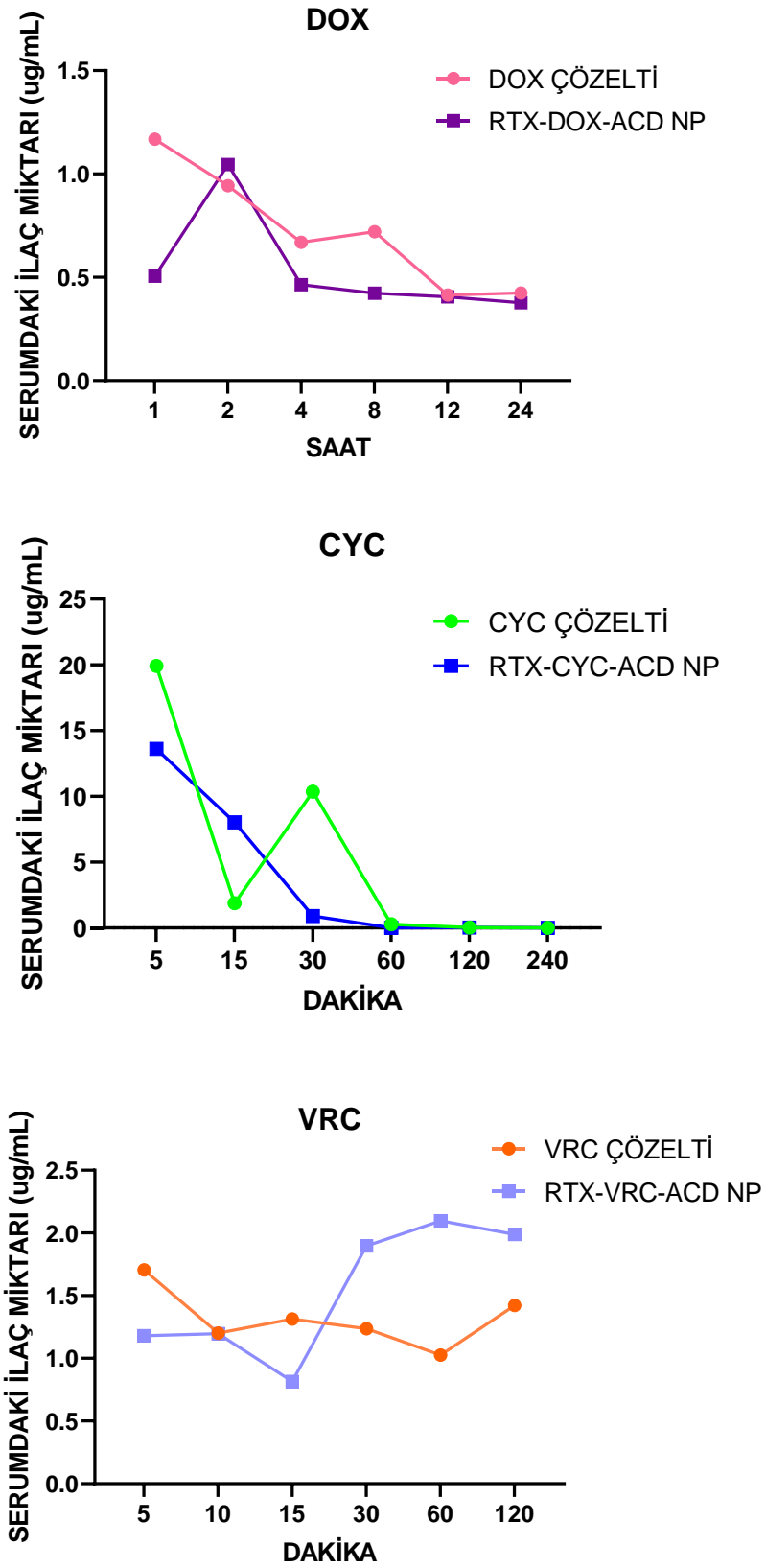
Şekil 4.28. Sağlıklı Balb/c farelere tek/tekrarlı doz şeklinde uygulanan boş nanopartiküller sebebiyle serumdan elde edilen ALT, AST miktarları ve oranları (n=4)

4.10.2. Plazma Profili Belirlenmesi

LC/MSMS analizi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Her bir etkin madde için kalibrasyon doğrusu belirlenmiştir (Şekil 4.29) ve kalibrasyon denkleminde serum bulunan ilaç miktarları hesaplanmıştır (Şekil 4.30).



Şekil 4.29. Etkin maddelere ait LC/MSMS kalibrasyon doğruları



Şekil 4.30. Balb/c serum örneklerinden elde edilen ilaç miktarları

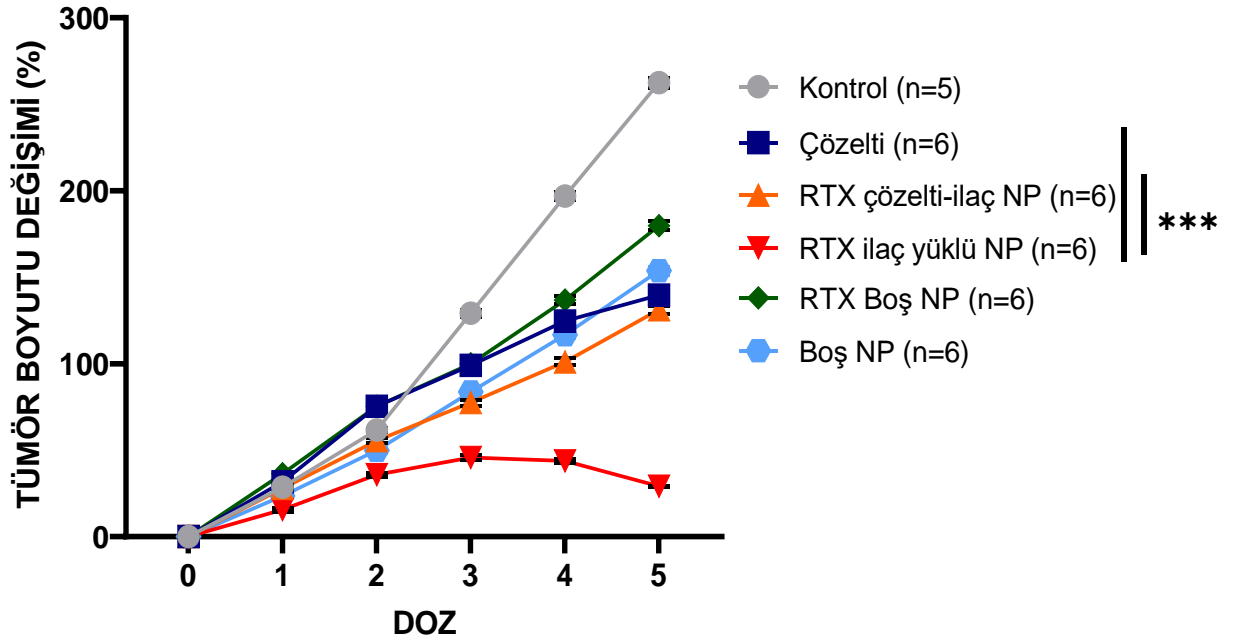
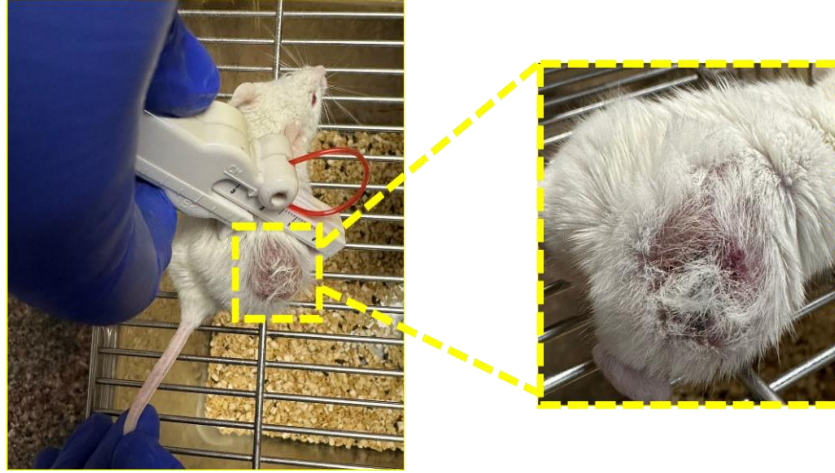
Grafiklerden hareketlerde farmakokinetik parametreler incelendiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 4.15. Formülasyon çözelti ve nanopartikül formülasyonlarına ait farmakokinetik parametreler

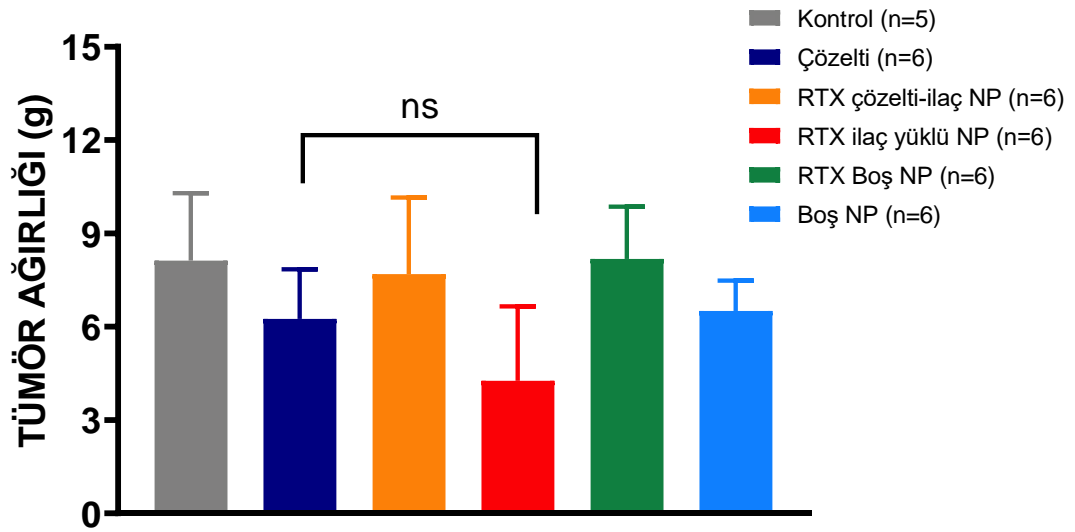
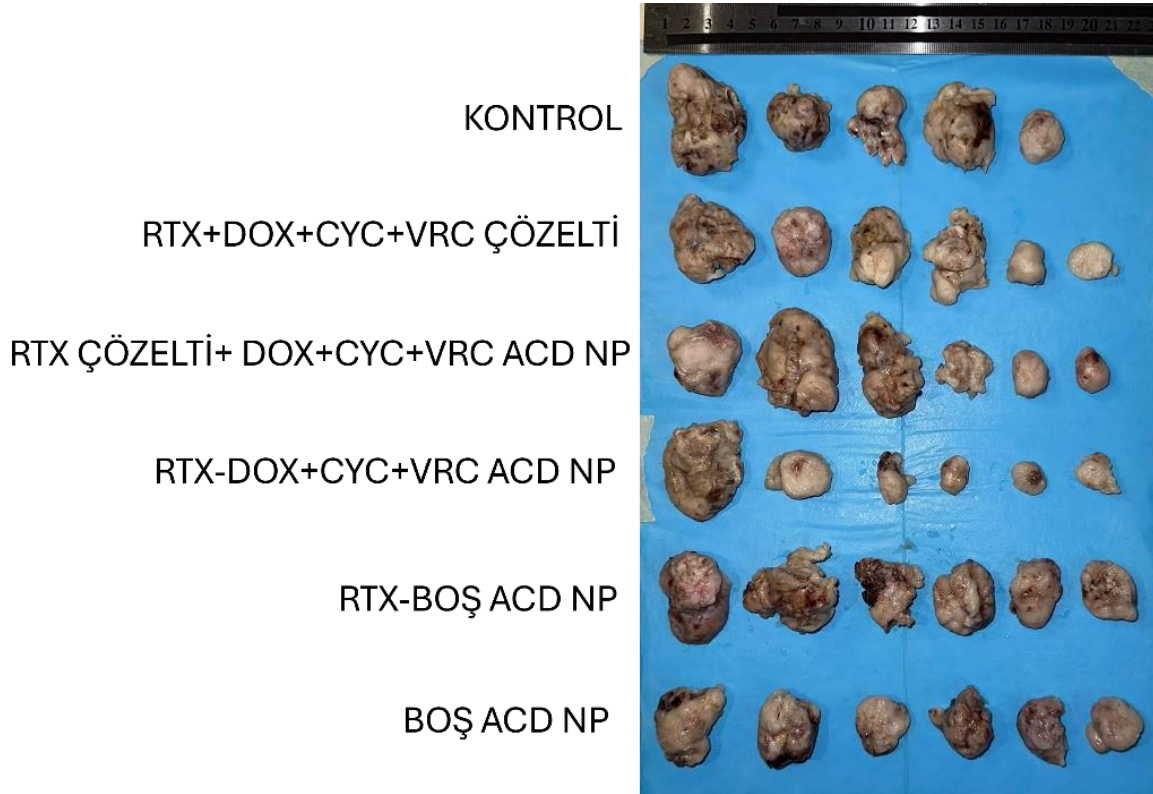
FARMAKOKİNETİK PARAMETRELER	DOX ÇÖZELTİ	RTX-DOX-ACD-NP	CYC ÇÖZELTİ	RTX-CYC-ACD-NP	VRC ÇÖZELTİ	RTX-VRC-ACD-NP
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{dk}/\text{mL}$)	12,7	10,4	6,2	3,2	2,3	3,6
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1,16	1,04	19,92	13,6	1,75	1,89
tmax (sa)	1	2	0,083	0,083	0,083	0,5
Cl (mL/dk)	0,78	0,96	32,15	62,26	17,14	11,22
Vd (mL)	8,55	19,75	10,03	14,69	23,46	33,88
t1/2 (sa)	7,56	14,25	0,21	0,16	0,94	2,09

4.10.3. Antitümöral Etkinlik

Şekil 4.31’de Balb/c farelerde oluşturulmuş NHL tümörlerine ait her enjeksiyon öncesi boy ve en ölçülerek hesaplanan geometrik ortalamaları yer almaktadır. Şekil 4.32’de ise 5. dozun uygulanmasının ardından (48 saat sonra) sakrifiye edilen Balb/c farelerden çıkarılan tümör dokularının ağırlıkları sunulmuştur.



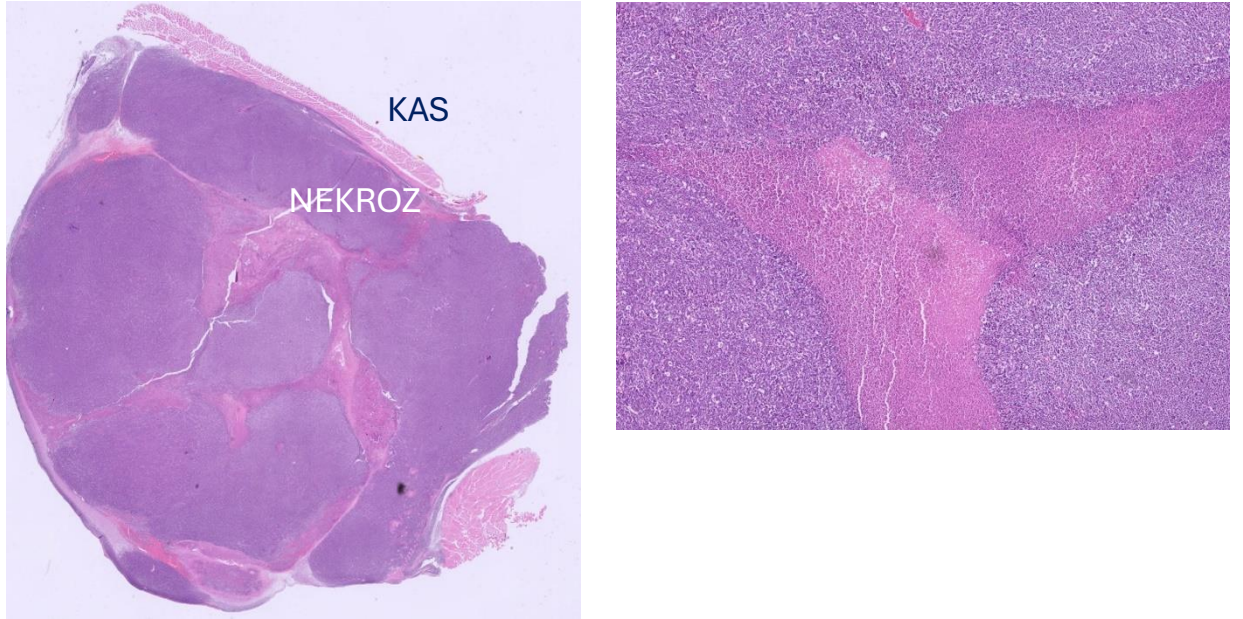
Şekil 4.31. Tümör büyümesi gözlenen Balb/c fareler ve her enjeksiyon öncesi ölçülen tümör boyutları ($p < 0,0001$)



Şekil 4.32. Sakrifiye edilen farelerden çıkarılan tümör dokuları ve ağırlıkları

4.10.4. Histopatolojik İnceleme

Tümör kesitinden elde edilen görüntüler şekil 4.33'te sunulmuştur.



Şekil 4.33. Tümör kesitlerinin eosin boyanmasıyla elde edilen nekrotik alanlar

5. TARTIŞMA

5.1. Etkin Maddelere Ait in vitro Miktar Tayin Yöntemleri ve Validasyonları

Validasyon, bir metodun veya ölçüm aracının belirlenen amaçlara uygunluğunu objektif bir şekilde test ederek ve yazılı kanıtlarla doğrulamak anlamına gelir. Bu süreç, metodun veya ölçüm aracının hedeflenen işlevleri yerine getirip getirmediğini ve doğru sonuçlar verip vermediğini değerlendirir.

Doğrusallık, bir analiz yönteminin belirli bir konsantrasyon aralığında doğru ve tutarlı sonuçlar verme kapasitesidir. Başka bir deyişle, ölçüm aralığında yapılan analizlerin, gerçek konsantrasyonlarla orantılı ve hatasız sonuçlar verip vermediğini gösterir. Doğruluk ise analiz sonuçlarının gerçek veya bilinen değerlerle ne kadar uyumlu olduğunu gösterir. Ölçüm sonuçlarının, hedeflenen gerçek değerlerle ne kadar yakın olduğunu belirtir. Bir diğer validasyon parametresi kesinliktir ve aynı analiz yöntemini kullanarak tekrarlandığında ne kadar tutarlı sonuçlar elde edilebileceğini ifade eder; sonuçların tekrarlı analizlerde ne kadar benzer olduğunu ve bu benzerliğin ne kadar yüksek olduğunu gösterir. Duyarlılık ise analiz yönteminin düşük konsantrasyonlarda bile hedef bileşeni tespit etme yeteneğidir. Çok düşük miktardaki bileşenleri veya analitleri doğru bir şekilde belirleyip belirleyemediğini ifade etmektedir.

5.2. Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Dr. Milo Malanga tarafından sentezlenen ACD ve PCD türevlerinin saflıkları NMR yöntemi ile tayin edilmiştir. NMR spektroskopisi, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) kullanarak bir maddede bulunan atom çekirdeklerinin manyetik özelliklerini inceleyen bir tekniktir. Bu yöntem, moleküllerin yapısını, dinamiğini ve etkileşimlerini anlamak için kullanılır. Genellikle organik ve biyomoleküllerin yapı analizinde, maddelerin saflaştırılmasında ve bileşenlerin özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır. NMR spektroskopisi, numuneye manyetik alan uygulayarak ve bu alanın içindeki çekirdeklerin enerjilerini ölçerek çalışır. Çekirdekler, belirli bir frekansta rezonansa girer ve bu frekansta yayılan sinyaller ölçülerek numunenin yapısı hakkında bilgi elde

edilir. Bu sinyaller, genellikle bir grafik olarak ifade edilir ve bu grafiklerden çekirdeklerin çevresindeki kimyasal ortam hakkında bilgi edinilebilir (126).

Mouritz ve ark., α -, β - ve γ -siklodekstrinlerin birincil yüzeyine guanidino grubunun konjugasyonunu doğrulamak için NMR yöntemini kullanmışlardır. Ayrıca bu çalışmada, guanidino türevli siklodekstrinler, 4-nitrofenil fosfat disodyum tuzuna çok güçlü bir bağlanma gösterirken, fosfat içermeyen nitrobenzen ile çok zayıf bir kompleks oluşturmuştur. Bu, guanidino grubunun fosfat gibi negatif yüklü gruplarla güçlü bir etkileşime girdiğini göstermiştir (127). Hargrove ve ark. ise per(6-guanidino-6-deoksi)-siklodekstrinlerin nükleotidler ile etkileşimlerini araştırmışlardır ve nükleotidlerin fosfat grupları ile guanidino grupları arasında güçlü elektrostatik etkileşimler olduğu görülmüştür. Bu etkileşimler, nükleotidin deoksiriboz kısmının siklodekstrin boşluğuna girmesini sağlamıştır. Fosfat-guanidino etkileşimlerinin bu süreci yönlendiren ana faktör olduğu belirtilmiştir (128).

Tez kapsamında yapılan çalışmada Şekil 4.1.1'i incelediğimizde guanidino grubu ve CD'lere ait piklerin elde edildiği ve konjugasyonun başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür. Rodriguez ve ark. yaptığı çalışmada antikanser ilaç olan gemitabinin tümör hücrelerine taşınmasını arttırmak için guanidino ve amino grubu içeren siklodekstrinler ile kompleks oluşturmuşlardır. Agresif insan meme kanseri hücreleri (MCF7) üzerinde yapılan çalışmada konfokal mikroskobu ile hücre içine gemitabin girişin arttırıldığı gösterilmiştir (129). Bu çalışmadan yola çıkarak tez kapsamında NP'lere pozitif yük kazandırarak negatif yüklü olan hücre membranı ile etkileşimin arttırılabileceği öngörülmüştür.

Ayrıca çifte hedeflendirme stratejimizin mekanizmalarından biri olan mitokondri hedefleme de guanidino grubu sayesinde gerçekleştirilebilecektir. Murthy ve ark., çoklu guanidin grupları içeren sorbitol tabanlı moleküler taşıyıcılar sentezlemişlerdir ve bu moleküler taşıyıcıların hücre içi mitokondriye ne kadar etkili bir şekilde ulaştığını değerlendirmişlerdir. İşaretlenmiş taşıyıcı sitemlerle inkübe edilen insan kolon kanseri hücreleri (HCT116) konfokal lazer tarama mikroskobu ile incelemiş ve 30 dakika içinde hücre içine alımın tamamlandığı ve hücre içi alım için dört guanidin grubunun yeterli olduğunu göstermişlerdir. MitoTracker görüntüleri

incelendiğinde ise en iyi mitokondri lokalizasyonunun dört guanidin ve lipofilik yapıda Naftalen içeren taşıyıcılarla gerçekleştirildiği belirtilmiştir (130).

5.2.1. Hemoliz

CD'ler, çeşitli avantajları nedeniyle farmasötik amaçlar için geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ancak, CD'lerin biyolojik membranlarda bulunan kolesterol ve fosfolipidlere yüksek afinitesi toksisiteye neden olabilir. Farmasötik alanda en yaygın kullanılan CD türevlerinden biri olan β -CD'lerin intravenöz uygulama yoluyla nefrotoksisite ve hemoliz oluşturabileceği bildirilmiştir. Lipitlere olan yüksek afinitesi eritrositlerin membran bütünlüğünü bozmalarına neden olmaktadır (131). Bu etki, CD türlerine göre farklılık gösterir; β -CD en fazla hemoliz yaparken, α -CD orta düzeyde, γ -CD en az etki gösterir. CD'ler eritrosit zarında şekil değişikliklerine yol açarak içselleştirme tipi bozulmalar oluşturur ve kolesterol affinitesi nedeniyle membrandan kolesterol uzaklaştırılmasını teşvik eder. Sonuç olarak, CD kaynaklı hemoliz, membran bozulması ile birlikte gelişen ikincil bir olaydır (132). Metillenmiş β -CD'ler arasında, dimetil- β -CD en yüksek kolesterol uzaklaştırma kapasitesine sahiptir dolayısıyla en yüksek hemolitik aktiviteyi de sunar (133). α - ve γ -CD'lerin hemolitik etkisi büyük olasılıkla membran lipid bileşenleriyle, örneğin fosfolipitlerle inklüzyon kompleksi oluşumuyla bağlantılıdır (134). Bu yan etkinin üstesinden gelebilmek için de farklı modifikasyonlarla CD türevleri sentezlenmektedir. Özellikle amfifilik CD türevlerinin sentezlenmesinin başlıca nedenlerinin arasında hemolizi önlemek yer almaktadır (135). Fan ve ark., karaciğer kanserinde etkisini değerlendirmek üzere DOX yüklü folik asit ile hedeflendirilmiş PEG ile β -CD (FA-PEG- β -CD) ile çalışmışlardır. Kan ile uyumluluk testleri kapsamında hemoliz çalışması yapmışlardır. Artan konsantrasyonlarda NP formülasyonu ile inkübe edilen eritrositler incelendiğinde hemoliz yüzdesinin 1 ila 24 saat aralığında çok az değişim gösterdiği ancak bu artışın %5'in altında kaldığı belirtilmiş ve 1–100 μ g/mL arasında değişen NP konsantrasyonlarında, kırmızı kan hücrelerinde anlamlı bir hemoliz etkisi gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara göre NP'lerin enjeksiyonla verilmesi durumunda kan hücrelerine zarar vermediği ve bu nedenle kanla uyumlu olduğunu gösterilmiştir (136).

Enjeksiyonluk olarak hazırlanan preparatlarda hemoliz doz sınırlayıcı bir olgudur. Bu nedenle hemolizin önüne geçebilmek için farklı yollar aranmaktadır, bunlardan bir tanesi ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasıdır. Yan ve ark., Cremophor EL tabanlı Paklitaksel (PTX) konsantrasyonunu 10 µg/mL'den 200 µg/mL'ye arttırdıkça, hemoliz oranı %6.2'den %11.8'e yükselmiştir. PTX yüklü biyotin ve arjinin ile modifiye edilmiş hidroksipropil-β-CD NP ise hiçbir konsantrasyonda hemoliz oranının %4,8'i geçmediğini bulmuşlardır. ISO/TR 7406 standardına göre hemolitik oranı %5'in altında olan materyaller nonhemolitik yani kan hücrelerine zarar vermeyen biyomateryaller olarak kabul edilmektedir (137). Dolayısıyla intravenöz enjeksiyon için güvenli bir formülasyon geliştirmişlerdir (138).

Bu amaçla tez kapsamında NP hazırlamada kullanılan yeni sentezlenen CD türevlerinin güvenliliğinin belirlenmesi amacıyla hemoliz çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada eritrositler üzerine hemolitik etkisinin bulunduğu bilinen ultra saf su pozitif kontrol grubudur. Suyun sebep olduğu UV absorbans değerini %100 kabul ettiğimizde ve elde edilen bulgular (Şekil 4.5.1) doğrultusunda ISO/TR 7406 standardına göre yeni sentezlenen CD türevlerinin insan kanında hemolize neden olmadığı belirlenmiştir. Hazırlanan NP formülasyonunun intravenöz yoldan uygulanacağı düşünüldüğünde güvenli bulunmuştur.

5.2.2. Biyolojik sıvıda stabilite

İlaç stabilitesi terimi, bir etkin maddenin veya ürünün, belirtilen sınırlar içinde ve depolama ve kullanım süresi boyunca, üretim zamanında sahip olduğu özellikleri koruduğu ölçüyü ifade eder. Stabilite türü genellikle kimyasal, fiziksel, mikrobiyolojik, terapötik ve toksikolojik olarak ayrılır (139).

İlaç stabilitesi, bir ilacın etkililiğini, güvenliliğini ve kalitesini korumak için kritik bir faktördür. Stabil olmayan bir ilaç, etkin maddelerinin bozulmasıyla tedavi edici etkisini kaybedebilir ve toksik maddelere dönüşerek hastaların sağlığını tehlikeye atabilir. Ayrıca, ilaçların raf ömrü stabilite testlerine dayanarak belirlenir; bu, ilacın güvenli ve etkili olduğu süreyi ifade eder. Fiziksel değişiklikler, ilacın görünümünü ve kullanım kolaylığını etkileyebilir, mikrobiyal kontaminasyon ise özellikle sıvı

ilaçlarda ciddi riskler yaratabilir. Bu nedenle stabilite, hem hasta güvenliği hem de ilacın terapötik etkisini sürdürbilmesi açısından büyük önem taşır (140).

CD, Sığır Serum Albumin (BSA) içindeki stabilitesi üzerine yapılan araştırmalar, bu sistemlerin biyolojik ortamda çeşitli faktörlere bağlı olarak oldukça kararlı olabileceğini göstermektedir. Özellikle, β -siklodekstrin (β -CD) NP, hücrel ortamda yüksek biyoyumluluk sergilemeleri ve proteinler ile minimal etkileşime girmeleri sayesinde, stabil yapılar oluşturabilir. Bu tür NP genellikle ilaç taşıma amacıyla geliştirilir ve BSA gibi serum proteinleri ile etkileşimleri minimum düzeyde tutulmaya çalışılır. Böylelikle, NPlerin agregasyon eğilimi azaltılarak çözelti stabilitesi artırılır.

Bilensoy ve ark. yaptığı araştırmada, paklitaksel taşıyan β -CD np2lerinin stabilitesi incelenmiş ve bu tür NP'lerin, BSA gibi proteinlerle etkileşimlerini minimum düzeyde tuttuğu belirtilmiştir (141). Bir başka çalışma, Çirpanlı ve ark. tarafından gerçekleştirilmiş olup, CD NP kamptotesin taşıma kabiliyeti değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, NP biyolojik sıvılardaki stabilitesi ve BSA ile etkileşim potansiyeli incelenmiştir. Araştırma, NP stabil kalabileceğini ve agregasyona uğramadan ilaç taşıyabileceği ortaya koymuştur (142).

Son olarak, Chen ve ark. tarafından yapılan çalışmada, β -CD ve kitosan bazlı manyetik hedeflenmiş NP incelenmiştir. Bu NP hidrofobik ilaçların taşınmasında yüksek stabilite gösterdiği ve BSA gibi biyolojik proteinlerle minimal etkileşime girerek agregasyonu önlediği rapor edilmiştir (143).

Yapılan stabilite çalışmaları sonucu hem amfifilik türev ACD ile hazırlanan hem de CD polimer PCD ile hazırlanan NP ortalama partikül büyüklüğü değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik belirlenmiştir (Tablo 4.5.1). ACD türevle hazırlanan NP partikül büyüklüğü artarken PCD ile hazırlanan NP'de azalma gözlenmiştir. Biyolojik sıvılar yüksek iyonik güçtedirler ve bu durum çoğu zaman NP'de agregasyona neden olur. ACD NP partikül büyüklüğündeki bu artışa BSA içindeki yüksek iyonik gücün neden olduğu düşünülmektedir. Ancak PCD ile hazırlanan NP ise partikül büyüklüğünde tam tersi bir azalma gözlenmiştir. CD polimerler farklı ilaçlar ve genetik materyalle nanopleks ve polipleks hazırlamada literatürde sıklıkla kullanılmaktadır (144, 145). CD polimerlerden hazırlanan NP'lerin

BSA ile inkübasyonu sonucu partikül büyüklüğünde azalma olmasının nedeninin BSA ile kompleks oluşturma eğiliminde olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

CD'lerin stabiliteyi, enzimatik parçalanma, pH ve sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir; vücutta bulunan amilazlar gibi enzimler tarafından parçalanabilmektedir; ancak hidrokisipropil- β -siklodekstrin (HP- β -CD) gibi modifiye türevler, enzimatik bozunmaya karşı daha dirençli özellikler göstermektedir. Ayrıca, β -CD'lerin ilaçlarla oluşturduğu komplekslerin, ilaçların stabilitesini artırdığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bu stabilite yüksek sıcaklıklarda veya aşırı pH koşullarında azalabilir. Termodinamik incelemeler, β -CD'lerin biyolojik ortamlarda stabil kaldığını gösterirken, düşük bağlanma sabitlerinin belirli durumlarda ilaç salımını artırabileceğini ortaya koymaktadır (146-148)

Başlangıçta, bazı araştırmacılar, nanomateryallerin fonksiyonelleştirilmesinin ardından protein adsorpsiyonunun azaldığını belirtmişlerdir; çünkü NP yüzeyinin hidrofobikliği de azalmaktadır. Ancak NP -protein etkileşimi oldukça karmaşıktır ve bu durumun, etkileşimin kan, interstisyel sıvı veya başka bir biyolojik sıvıda gerçekleşip gerçekleşmediğine ve belirli NP lerin (boyut, şekil, yük, bileşim ve yüzey fonksiyonelleştirmesi) özel yüzey özelliklerine bağlı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (149, 150) Bu nedenle PCD NP'lerin protein ile etkileşiminden ve korona oluşumundan dolayı polimerik yapısının bozulmuş olabileceği ve bu nedenle partikül boyutunun daha küçük çıkmış olduğu düşünülmüştür.

Ayrıca yapılan hayvan çalışmalarında görülmüştür ki yoğun konsantrasyonda ve hızlı iv yoldan verilen ACD NP hayvanlarda ölüme sebep olmuştur. Daha seyreltik ve yavaş verilen ACD NP'de bu şekilde bir sorunla karşılaşılmamıştır. Bu da kanda ACD yoğunluğuna bağlı olarak agrege olma eğilimini arttırdığını düşündürmüştür.

5.2.3. Kompleman Aktivasyonu

Kompleman sistemi, patojenik enfeksiyonlara karşı birinci savunma hattı olarak işlev gören doğuştan gelen bağışıklığın önemli bir bileşenidir ve yabancı moleküller kan dokusuyla temas ettiğinde aktive olur ve bir dizi kimyasal reaksiyon sonucu enflamasyon oluşur (151). Kompleman sistemi, 50'den fazla çözünebilir ve

membran yüzeyinde eksprese olan proteinden oluşur. Bu proteinler, vücutta zimojen formunda üretildikten sonra parçalandıklarında aktif hale gelir. Küçük moleküler ağırlıktaki parçalanma ürünleri 'a' (örneğin, C3a), daha büyük olanlar ise 'b' (örneğin, C3b) ile gösterilir. Aktive olduktan sonra, spesifik enzimler substratlarını parçalamaya devam eder ve kendiliğinden amplifiye olan bir kaskad oluşturur.

Kompleman sisteminin başlıca fonksiyonları arasında bakteriyel hücre duvarlarını parçalayarak anti-mikrobiyal etki sağlamak, apoptotik hücreleri ve debrisi opsonize ederek fagositozu hızlandırmak, proinflamatuvar özellik göstererek lökositlerin aktivasyonunu artırmak ve C3d gibi yıkım ürünleri aracılığıyla B-hücrelerini ko-stimüle ederek antikor üretimini artırmak yer alır.

Kompleman sisteminde üç ana yolak bulunur: klasik yolak, lektin yolu ve alternatif yolak (152) Klasik yolak, IgG ve IgM içeren immün komplekslerin C1q ile karşılaşması sonrası tetiklenirken; lektin yolu, mannoz bağlayıcı lektin (MBL) aracılığıyla çalışır. Alternatif yolak ise C3b gibi proteinlerle veya C3'ün spontan hidrolizi ile aktive edilir. Mikrobiyal yüzeylere bağlanan immün kompleksler ve belirli maddeler, bu yolların tetiklenmesine yol açar (153).

CD bazlı NP ile kompleman aktivasyonu, bu sistemlerin bağışıklık sistemi ile etkileşimleri açısından önemli bir araştırma alanıdır. NP'lerin kan ile temas ettiklerinde kompleman sistemini aktive etme potansiyelleri vardır ve bu inflamatuvar yanıtlar, ilaç taşıyıcı sistemin etkililiği üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir. Özellikle kanser tedavilerinde kullanılan CD NP'lerin, bağışıklık sisteminin bir parçası olan kompleman aktivasyonu üzerindeki etkileri dikkate alınmalıdır. NP biyolojik bir ortama girdiğinde, proteinlerle kaplanarak bir protein korona oluştururlar. Bu korona, NP organizma içindeki davranışını önemli ölçüde etkiler. Örneğin, NP kan dolaşımında ne kadar süre kalacağı, vücutta nasıl dağıldığı, hücreler tarafından ne kadar alındığı ve hücre içindeki yerleşimi bu korona tarafından belirlenir (154).

NP'lerin plazma proteinleri, özellikle albüminle bağlanması, bazı biyolojik özellikleri artırarak kompleman sisteminin aktivasyonunu azaltabilir, kan dolaşımında kalma süresini uzatabilir ve toksisiteyi azaltabilir. Bu bağlamda, dolaşımdaki proteinlerin adsorpsiyonu, güvenlik sağlayabilir, reseptörler aracılığıyla etkileşimleri kolaylaştırabilir ve farmakokinetik profili iyileştirebilir; dolayısıyla bunlar potansiyel

teranostik avantajlar olarak görülmektedir. Ancak, kan dolaşımındaki önemli fizyolojik ve toksikolojik süreçlerde yer alan, kompleman ve koagülasyon faktörleri gibi proteinlerin de protein korona oluşturduğunun tespit edilmesi, bu durumun hedef hücre etkileşimlerini azaltabileceği anlamına gelmektedir. Çünkü bu etkileşim, ligantların yüzeylerine erişimi engelleyerek gerçekleşir (155).

Wibro ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışma, NPLerin şeklinin kompleman sistemi üzerindeki etkilerini araştırarak, özellikle C3a oluşumu açısından önemli bulgular sunmuştur. Çalışmada, küresel, çubuk ve disk şeklindeki NPLerin kompleman aktivasyonu üzerindeki farklı etkileri incelenmiştir. C3a, kompleman sisteminin erken aktivasyon ürünü olup inflamatuvar yanıtları tetikleyen kritik bir moleküldür. Küresel NP, daha düşük ve gecikmeli bir C3a üretimi sergilerken, çubuk ve disk şeklindeki NP daha güçlü ve hızlı C3a oluşumuna neden olmuştur. Bu farklılık, partikül şeklinin makrofajlar tarafından tanınma hızını ve dolayısıyla kompleman aktivasyonunu etkilediğini göstermektedir. Özellikle çubuk ve disk şeklindeki partiküller, daha yavaş temizlendikleri için dolaşımda daha uzun süre kalarak C3a aracılı reaksiyonları artırmıştır (156).

Tez kapsamında sentezlenen Gua-CD türevlerinin biyogüvenlik çalışmaları gereğince kompleman aktivasyonu çalışması yapılmıştır. C3a miktarları Şekil 4.5.2 ve Tablo 4.5.2'de gösterilmiştir ve sonuçlar incelendiğinde kontrol grubu olan PBS uygulanmış grup ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Bu nedenle CD türevlerinin kompleman aktivasyonuna sebep olmadığı ve potansiyel olarak güvenli olduğu düşünülmüştür.

NP, bağışıklık sistemi tarafından yabancı parçacıklar olarak algılanır ve opsoninler adı verilen proteinler tarafından kaplanarak fagositoz sürecine tabi tutulurlar. Opsonizasyon, NPLerin yüzeylerinde opsoninlerin bağlanmasını ve böylece vücut tarafından tanınmasını sağlar. NP'lerin kan dolaşımındaki hızla ortadan kaldırılması, bu süreçteki büyük zorluklardan biridir. Opsoninlerin bağlandığı yüzey özellikleri, NP'lerin MPS (mononuclear phagocytic system) veya res (reticuloendothelial system) tarafından tanınmasına ve ortadan kaldırılmasına yol açar. Bu nedenle, NP 'lerin etkili bir şekilde işlev görebilmesi için, vücut tarafından hemen yok edilmeden kan dolaşımında uzun süre kalmaları önemlidir. Sonuç olarak, NP'lerin

biyolojik ortamlardaki işlevselliği ve etkinliği, hem hedefe yönelik taşıma kabiliyetleri hem de vücut tarafından algılanmalarını engelleme yetenekleri açısından büyük bir potansiyele sahiptir (157)

5.3. Antikanser İlaç ve mAb Yüklü Gua-CD Nanopartiküllerin Hazırlanması ve in vitro Karakterizasyonu

5.3.1. Rituksimab Adamantan Modifikasyonu:

Adamantan ($C_{10}H_{16}$) birbirine bağlı dört sikloheksan halkasından oluşan bir hidrokarbon türevidir. Suda çözünürlüğü çok düşüktür. Adamantan ve β CD arasındaki konak-konuk ilişkisi, adamantanın β CD'nin hidrofobik boşluğuna dahil olmasıyla karakterizedir ve bu sayede inklüzyon kompleksleri oluşturulmasını sağlar. Adamantan ile β CD arasındaki etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları gibi nonkovalent kuvvetlerle gerçekleşir (158).

Adamantan ve CD'nin konak-konuk etkileşimi ile kompleks oluşturması, karmaşık sentez ve ayırma adımlarına gerek kalmadan fizyolojik koşullarda meydana gelir. Bu süreç, toksik yan ürünler üretmez ve ısıya gerek kalmaz (159). Ayrıca, Adamantan-CD komplekslerinin bağlanma sabiti oldukça yüksektir ve yapılar istikrarlı ve geri dönüşümlüdür. CD-Adamantan etkileşimleri, kemoterapötik ilaç taşıma sistemlerinde kişiselleştirme ve hücre hedefleme fırsatları yaratır. Birden fazla ligand, polimer veya boya bağlanabilir, bu da aynı anda birçok etkiden yararlanmayı sağlar (160).

Tezde amaçladığımız aktif hedeflendirmenin sağlanabilmesi için öncelikle RTX ile Adamantanın konjugasyonu sağlanmıştır. Ardından CD NP hazırlanması sırasında konjuge bileşik formülasyona dahil edilerek hazırlama işlemi yapılmıştır. Adamantanın CD'nin iç kavitesine yerleşmesiyle RTX ile hedeflendirme sağlanmış olur. Bu nedenle konjugasyon işleminin yapılabilmesi kritik bir öneme sahiptir.

Bu amaçla SDS Page analizi kullanılarak konjugasyon oluşumu doğrulanmıştır. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez), proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan bir elektrofrez

teknikidir. Bu yöntemin temel prensibi, proteinlerin SDS (sodyum dodesil sülfat) adlı bir deterjan ile muamele edilerek denatüre edilmesi ve yük-hacim oranının standart hale getirilmesidir. SDS, proteinlerin üç boyutlu yapısını bozarak onları doğrusal bir yapıya çevirir ve her proteine negatif yük ekler (161). Proteinlerin bu şekilde negatif yüklü hale getirilmesi, poliakrilamid jel içerisinde bir elektrik alanı uygulandığında proteinlerin göç etmesine neden olur. Poliakrilamid jel, proteinlerin boyutlarına göre ayrılmasını sağlayan bir gözenek yapısına sahiptir. Daha küçük proteinler jelin alt kısımlarına doğru hızla ilerlerken, daha büyük proteinler daha yavaş hareket eder. Bu sayede, proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrılır. SDS-PAGE analizinde, jeldeki protein bantları boyama teknikleri (Coomassie Brilliant Blue veya gümüş boyama gibi) ile görünür hale getirilir. Boyanmış protein bantları, bir moleküler ağırlık referansı ile karşılaştırılarak proteinlerin moleküler ağırlıkları tahmin edilir (162).

Tez kapsamında yapılan analiz sonuçları için şekil 4.6.1.'de gösterilen 1 ve 2 numaralı kuyucuğa yüklenmiş olan örnek 1 ve örnek 2 jel görüntüsü incelendiği zaman konjugasyon reaksiyonunun % 20 DMF ortamında veya % 20 DMF, % 5 gliserol ortamında başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve kontrolle (örnek 5) karşılaştırıldığı zaman antikorun (150 kDa) herhangi bir denatürasyona uğramadığı gösterilmiştir. Bir ve iki numaralı kuyucuğa yüklenmiş olan örnek 3 ve örnek 4 jel görüntüsü incelendiği zaman konjugasyon reaksiyonunun % 20 DMF ortamında veya % 20 DMF, % 5 gliserol ortamına iken 2-merkaptoetanol eklendiği zaman, denatürasyon gerçekleştiği ve denatürasyon sonrası 100 kDa ve 50 kDa, 25 kDa moleküler ağırlığa sahip antikor fragmentlerinin oluştuğu gösterilmiştir. Bu nedenle örnek 1 konjugasyonu formülasyon hazırlamada kullanılmıştır ve aktif hedeflendirme aşaması için ilk adım başarıyla atılmıştır.

Elamin ve ark. hyaluronik asit adamantan konjugasyonunu folat ile hedeflendirilmiş metil- β -CD NP formülasyonuna dahil ederek dual hedeflendirme stratejisini benimsemişlerdir ve yalnızca folat ile hedeflendirilmiş NP formülasyonları ile kıyaslandığında CT116 hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir ve bu da kompleksin hedef hücrelere ulaştığını ve bağlandığını doğrulamıştır (163).

Sakai ve ark., antikanser etkinliği bilinen metil- β -CD'i folik asit (FA-M β CD) ile modifiye ederek tümöre hedeflenmesini sağlamışlardır. Ancak düşük dozlarda antikanser aktivite görülmediği belirtilmiştir. Bu nedenle HSA bazlı ilaç taşıyıcı sistem ile formüle etmişlerdir. Bu nedenle ilk olarak HSA-Adamantan konjugatı oluşturup konak-konuk ilişkisinden yararlanarak FA-M β CD ile kompleks oluşturmuşlardır. Balb/c nu/nu fareler üzerinde yapılan in vivo deneylerde FA-M β CD ile tedavi edilenlere kıyasla tümör büyümesi kompleks ile tedavi edilen farelerde anlamlı şekilde yavaşlamıştır (164).

Literatürde bahsi geçen konak konuk ilişkisinden tez kapsamında yararlanılmıştır. çünkü Adamantan ve CD arasındaki güçlü etkileşim sayesinde stabil bir kompleks oluşurken etki bölgesine kadar RTX'in salınmadan taşınabilir. Böylece hedeflemenin daha etkili yapılabileceği öngörülmüştür. Ayrıca RTX'in doğrudan CD'e bağlanması ile oluşabilecek stabilite sorunlarının önüne geçilmiştir. RTX'i direkt NP'e bağlamak için karboksil grubu yüzeydeki amino grubuna bağlanmak zorundadır ancak mabın karboksil grubunu aktive ettiğimizde diğer mab üzerindeki amino grubuna bağlanabilir ve sekonde/ tersiyer yapılar oluşabilir. O nedenle aracı molekül kullanmak bu etkinin önüne geçilmesi açısından üstünlük sağlamıştır. Bu sayede RTX stabil bir şekilde formülasyona dahil edilmiştir.

5.3.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yükünün Belirlenmesi

NP hazırlama yöntemleri arasında solvent buharlaştırma, iyonik jelyasyon, sonikasyon ve elektrospreyleme gibi teknikler bulunur. Ancak nanopresipitasyon yöntemi, partikül boyutları üzerinde hassas kontrol sağlaması ve çevre dostu olması nedeniyle özel bir öneme sahiptir (165, 166). Nanopresipitasyon, hidrofilik bir çözücünün (genellikle su) içerisine organik fazın (genellikle polimer ve ilaç çözeltisi) damla damla eklenmesiyle gerçekleşir. Çözücüler karıştıkça polimerin hızla çökmesiyle NP oluşur. Bu yöntem, kimyasal reaksiyonlar gerektirmemesi ve düşük enerji ile çalışması sayesinde özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılır. Ayrıca organik faz çözeltisinin suya eklenmesi sırasında Marangoni etkisi sayesinde hızla

partikül oluşumu sağlanır ve bu süreç boyunca partikül boyutları hassas şekilde kontrol edilebilir (167).

Dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi, dispersiyon halindeki nano veya mikrometre boyutundaki partiküllerin Brown hareketine bağlı olarak saçtığı ışığın zaman içerisindeki yoğunluk değişimlerini analiz ederek partikül boyut dağılımını belirler. DLS yönteminde, bir lazer ışığı dispersiyona gönderilir ve bu ışık, dispersiyon içindeki partiküllerden saçılır. Partiküller Brown hareketi yaptığı için saçılan ışığın yoğunluğu zamana bağlı olarak dalgalanır. Daha küçük partiküller, daha hızlı hareket eder ve bu nedenle saçılan ışığın yoğunluğu daha hızlı değişir. Saçılan ışığın bu zaman bağımlı değişimleri, korelasyon fonksiyonları aracılığıyla analiz edilir ve partiküllerin hidrodinamik çapı hesaplanır. DLS, özellikle NP boyutlarının tayininde ve koloidal sistemlerin stabilite analizlerinde yaygın olarak kullanılır (168, 169). Literatürde, nanopresipitasyon yönteminin parametrelerinin incelendiği ve bu parametrelerdeki değişikliklerin önemini vurgulayan birçok çalışma bulunmaktadır

Galindo-Rodriguez ve ekibinin yaptığı bir çalışmada, farklı organik çözücülerin nanopresipitasyon yöntemiyle elde edilen NP üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çözücü tipinin, organik çözücü ile sulu faz arasındaki polarite farkı ve ilaçla olan etkileşimler nedeniyle NP boyutu, polidispersite indeksi ve morfolojisi üzerinde önemli bir etkisi olduğu bildirilmiştir (170).

Literatürde, NP ilaç taşıyıcı sistemlerin fizyolojik stabilitelerini korumaları, opsonizasyondan kaçınmaları ve tümörlü bölgede birikmeleri için partikül boyutlarının küçük olacak şekilde tasarlanmasının faydalı bir yaklaşım olduğu belirtilmektedir (171). Ünal ve ark., katyonik CD'ler ile çalışmışlardır ve NP hazırlamada nanopresipitasyon yöntemini kullanmışlardır. Organik çözücü olarak aseton seçilmiştir. Bu sayede elde ettikleri boş veya kamptotesin yüklü katyonik CD NP'lerin ortalama partikül boyutları 100-300 nm civarında elde edilirken, PDI değerleri 0.1-0.3 arasında değişmektedir ve etkin bir şekilde kolona hedeflendirilme gerçekleştirildiği in vivo deneylerde gösterilmiştir (172).

Tezde hedeflendirme amacıyla RTX' in formülasyona dahil edilmesiyle DOX yüklü ACD formülasyonları dışında genellikle daha küçük partikül boyutları elde edilmiştir. Bununla birlikte, Şekil 4.6.2'de görüldüğü gibi, tüm ilaç yüklü NP

formülasyonları 200 nm'den küçüktür ve bu da lenfatik hedefleme için avantajlı olabileceği ortaya konmuştur. Bu nedenle, NP'lerin vücutta pasif hedeflemeden yararlanabileceği, homojen partikül boyutu dağılımının doz tekdüzeliğini sağladığı düşünülebilir. RTX-adamantan makromolekülünün dahil edilmesi, NP'nin bütünlüğünü ve yapısını bozmamış, bunun yerine, ortalama çap ve PDI verilerine dayanarak Şekil 4.6.2'de görülebileceği gibi daha kompakt bir nanoyapıyla sonuçlanmıştır. ACD ile çalışmak, 120-190 nm arasında değişen daha homojen NP'lerle sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, antikanser ilaçları ve RTX ile yüklendiğinde PCD NP'lerinin, yaklaşık 400 nm'den 140-190 nm aralığına kadar bir boyut azalmasıyla gelişmiş stabilite göstermesi dikkat çekicidir.

Konuk bir molekül eklendiğinde, amfifilik CD'nin yüzey alanında bir genişlemeye yol açar ve sonuç olarak arayüzeylerde kendi kendine hizalanma yeteneğini değiştirir. Sonuç olarak, NP'ler ilaçla yüklendiğinde, kapsüllenmiş ilacın durumu ve konumu, NP'lerin boyutunda dikkate değer değişikliklere neden olabilir (142). Bu, boş ve ilaç yüklü NP'lerin boyutlarının neden farklı olduğunu açıklayabilir. PCD NP'leri, beklenen bir sonuç olan ACD NP'lerinden daha büyük bir ortalama boyuta sahiptir. Bunun nedeni, monomerik ACD'nin tek bir CD ünitesine sahip olması, PCD'nin ise birden fazla CD'den oluşan bir ağdan oluşmasıdır. Şekil 4.6.2'de görüldüğü gibi, boş PCD NP'leri bile boş ACD NP'lerinden açıkça daha büyüktür.

Zeta potansiyel ise bir partikülün yüzeyindeki elektrik yükünün, partikülü çevreleyen sıvı içerisindeki iyonlar ile etkileşimleri sonucunda oluşturduğu elektriksel potansiyel farkını ifade eder. Özellikle kolloidlerin stabilitesini değerlendirmek için kullanılır. Bir partikül, sıvı ortamda asılı halde olduğunda, etrafında bir iyon bulutu oluşur. Bu iyonlar, partikül yüzeyine yakın olanları "sabit katman" ve daha uzak olanları "hareketli katman" olarak iki bölgeye ayırır. Zeta potansiyel, partikülün yüzeyinden hareketli katmanın dış sınırına kadar olan bölgede ölçülen potansiyeldir (173, 174).

Kolloidal dispersiyonların yüzey yükünü yansıtan zeta potansiyeli, dispersiyon stabilitesinin değerlendirilmesi ve yönetilmesi için değerli bir araçtır. Zeta potansiyeli verileri incelenerek CD NP'lerin sulu bazlı dispersiyonlardaki fiziksel stabilitesi belirlenebilir ve partikül yüzeyinde ilaçların varlığı doğrulanabilir. Hücre membranları

negatif yüklü olduğundan, pozitif yüklü NP'lerin hücre zarlarıyla nötr veya negatif yüklü olanlara göre daha etkili bir şekilde etkileşime girmesi beklenir. Bu etkileşimin, konjuge ve ilaç yüklü ACD NP'lerinin pozitif elektrostatik etkileşimlerinden kaynaklandığı varsayılır; bu, katyonik bir yapıya işaret eden, yaklaşık 20 mV'lik bir zeta potansiyeli sergiler. Öte yandan, RTX konjuge ve ilaç yüklü PCD NP'leri, CYC yüklü olanlar hariç, Şekil 4.6.2'de görüldüğü gibi neredeyse nötrdür. Bu karşılaştırma göz önüne alındığında, ACD NP'lerinin daha yüksek hücresel alıma sahip olabileceği sonucuna varılabilir. Ancak katyonik polimerlerin faydalı özellikleri in vivo kullanıldığında dezavantajlara sahiptir. Kompleman sistemini aktive etme eğilimleri, plazma proteinlerine bağlanarak dolaşımdan hızlı bir şekilde temizlenmelerine yol açarak ilaç veya nükleik asit gibi aktif maddelerin tümör hücrelerine taşınmasını engeller (175)

5.3.3. Fiziksel Stabilitenin Değerlendirilmesi

NP stabilitesini belirlemek için çeşitli özellikler dikkate alınmaktadır. Öncelikle, NP bileşimi, kimyasal yapılarının stabilize üzerindeki etkisi açısından kritik bir faktördür. Ayrıca, şekil, yüzey alanı ve yüzey kimyası ile bağlantılı olarak stabilizeyi etkileyebilir; farklı şekiller, farklı kristal yüzey özelliklerine ve dolayısıyla reaktivitelere yol açar. Boyut da önemli bir rol oynamaktadır; daha küçük NP genellikle daha yüksek yüzey enerjisi ile ilişkilendirilir, bu da stabiliteyi azaltabilir. Yüzey kimyası da stabilizeyi etkileyen bir diğer faktördür; NP'lerin yüzeyindeki stabilizatörler ve kaplamalar, etkileşimlerini ve dolayısıyla stabiliteyi artırabilir. Bunun yanı sıra, agregasyon durumu da kritik bir faktördür; NP birbirine yapışması, reaktiviteyi azaltarak stabilizeyi etkileyebilir. Bu özelliklerin kombinasyonu, NP'lerin stabilitesinin değerlendirilmesinde temel kriterleri oluşturmaktadır ve malzemelerin uygulamalarındaki performansını belirleyebilir (176).

Özellikle partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli değerleri, NP'lerin stabilitesi ve biyolojik dağılımının yanı sıra nanotaşıyıcıların hücre zarları ile etkileşimi ve bunların hücresel alımı için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, istenen etkileri elde etmek için NP'lerin stabilitesinin sağlanması esastır. Şekil 4.6.5'te sunulan sonuçlara

göre, taze hazırlanan partiküllerin özelliklerinde 5. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemektedir. Sonuç olarak, partiküllerin buzdolabında 1 haftaya kadar koruyucu madde ilave edilmeden saklanabileceği görülmektedir.

5.3.4. Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

SEM (Taramalı elektron mikroskobu), NP'in yüzey yapısını ve morfolojisini yüksek çözünürlükte incelemek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. SEM, bir elektron tabancası kullanarak elektronları üretir. Bu elektronlar, bir vakum ortamında hızlandırılır ve bir noktada yoğunlaşarak incelemesi gereken örneğe yönlendirilir. Hızlandırılan elektronlar, elektromanyetik lensler tarafından odaklanarak inceleme alanına yönlendirilir. Bu odaklanmış elektron demeti, NP'lerin yüzeyine çarpar. Elektronlar, NP lerin yüzeyiyle etkileşime girer ve bu etkileşim sonucunda birkaç farklı türde elektron ve radyasyon üretilir. Örneğin, sekonder elektronlar yüzeyden ayrılan ve SEM'in görüntüleme sistemine yönlendirilen düşük enerjili elektronlardır. Bu elektronlar, yüzey morfolojisini belirlemek için kullanılırken, yüksek enerjili geri saçılan elektronlar ise atomik numarasına bağlı olarak değişen sinyaller üretir. Sekonder elektronların sayımı, bir dedektör aracılığıyla gerçekleştirilir ve bu veriler görüntüleme sistemine iletilir. Elektronların yoğunluğu ve dağılımı, bir ekran veya dijital ortamda görüntü olarak işlenir, bu görüntü NP'lerin yüzey yapısını ve boyutunu gösterir. SEM, nanometre ölçeğinde görüntü elde etme kapasitesine sahip olduğundan yüksek büyütme oranları sayesinde NP lerin detaylı morfolojik özellikleri incelenebilir (177). Dubes ve ark. katı lipid NP için SEM ve AFM görüntülemelerini karşılaştırdıklarında her iki yüksek çözünürlüklü mikroskopi yöntemi de birbirini tamamlayıcı nitelikte olduğunu ancak SEM ile görüntülemenin NP'lerin daha az agregat halde incelenmesine olanak tanıdığını ortaya koymuşlardır (178).

Tez kapsamında çalışmada SEM görüntülerinin incelenmesiyle, NP'lerin partikül boyutu dağılımının DLS analizi sonuçlarıyla örtüştüğünü ortaya konuldu. Ancak, RTX içeren NP'lerin, hedeflenmeyen NP'lere göre daha fazla agregate olma eğiliminde olduğu görsel olarak gözlemlendi. Morfolojik açıdan ise NP küresel yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 4.6.4).

5.3.5. Nanopartiküllerin Sterilizasyonu

NP'lerin sterilizasyonu, biyomedikal uygulamalarda güvenliğin sağlanması için kritik bir adımdır ve çeşitli yöntemlerle gerçekleştirilir. Isı sterilizasyonu, NP'leri genellikle 121 °C'de 15-30 dakika ısıtarak yapılır, ancak bazı NP bu sıcaklıklara dayanamayabilir. Kimyasal sterilizasyon, alkol, klorheksidin ve hidrojen peroksit gibi kimyasalların uygulanmasıyla mikroorganizmaları etkili bir şekilde yok eder, ancak bazı kimyasallar NP'lerin özelliklerini değiştirebilir. Irradyasyon, gamma, UV veya elektron ışınları kullanarak mikroorganizmaların DNA'sını tahrip eder; UV ışınları, NP'ler için etkin bir sterilizasyon sağlar. Filtrasyon, steril filtreler kullanarak sıvı ortamda bulunan NP'lerin sterilizasyonunu sağlar. Plazma sterilizasyonu ise düşük sıcaklıkta plazma gazlarının kullanılmasıyla ısıya duyarlı NP'ler için avantaj sunar. Sonikasyon, yüksek frekanslı ses dalgalarıyla mikroorganizmaların hücre duvarlarını parçalayıp etkisiz hale getirilmesini sağlar. NP'lerin sterilizasyonu ile ilgili çalışmalarda, kullanılan yöntemin fiziksel ve kimyasal özellikler üzerindeki etkileri incelenmektedir; bu nedenle hangi sterilizasyon yönteminin kullanılacağına karar verirken NP'lerin özelliklerinin dikkatlice değerlendirilmesi önemlidir (179-181). Örneğin, Masson ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, poly-(ε-caprolactone) (PCL) nanoküreleri 0,2 µm'lik bir filtre kullanılarak başarılı bir şekilde sterilize edilmiştir ve morfoloji ya da agregasyonda gözle görülür bir değişiklik olmamıştır (182).

Tez kapsamında hazırlanan NP'lerin uygulama yolu intravenöz olacağından formülasyonun sterilitesinin değerlendirilmesi zorunludur. Ancak yukarıda bahsedilen stabilite problemlerini önlemek için aseptik koşullar altında filtrasyon yöntemi en güvenilir yöntemlerden biri olduğu için seçilmiştir. Özellikle, 0.22 µm'lik membran filtrelerin, bakterileri etkili bir şekilde tutma kabiliyetleri nedeniyle yaygın olarak tercih edildiği görülmektedir. Bu filtreler, ısıya duyarlı ve kimyasal olarak hassas sıvılar için uygun bir sterilizasyon yöntemi sunar. Tablo 4.6.1'de görüldüğü gibi kayıp formülasyon hacmi %2'den azdır. Tüm in vitro çalışmalarda doz hesaplamaları bu kayıplar dikkate alınarak yapılmıştır. NP'ler 200 nm'nin altında olduğundan filtrasyon yöntemi uygun bulunmuştur.

5.3.6. İlaç Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

İlaç yükleme etkinliği direkt ve indirekt olarak farklı şekillerde tayin edilebilir. Direkt yöntemler NP'e yüklenmiş olan ilaç miktarının doğrudan tayin edilmesi üzerinden yapılırken, indirekt yöntemler NP'e yüklenmemiş serbest ilaç üzerinden miktar tayini yapılmasını içerir. Bhatt ve ark., paklitakselin ilaç yükleme etkinliğini arttırmak ve salım profilini değiştirmek için CD ile inklüzyon kompleksi oluşturup lipozoma yükleme yapmışlardır. Yükleme etkinliğini belirlemek için ise 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yaparak partiküllerin çökmesi sağlanırken serbest ilaç supernatantta kaldığı için kolaylıkla uzaklaştırmışlardır. Daha sonra çöken lipozomlara metanol eklenerek paklitakselin lipozomdan serbestleşmesi sağlanmıştır ve ters faz HPLC yöntemi kullanılarak madde miktarı tayin edilmiştir (183). Jingou ve ark. ise hidrofobik ve hidrofilik ilaçların birlikte yüklendiği kitosan ve siklodekstrin bileşenli NP'i çapraz bağlama yöntemi ile hazırlamışlardır. Model ilaç olarak kullandıkları metotreksat ve kalsiyum folinatın yükleme etkinliğini belirlemek amacıyla suda disperse halde bulunan NP 16000 rpmde santrifüj ederek süpernatantı elde etmişlerdir. Ardından süpernatantta bulunan ilaç miktarlarını hesaplamak için UV spektrofotometrede sırasıyla 303 ve 355 nm'de ölçüm yapmışlardır (184).

Tez çalışmasında yükleme etkinliği, HPLC analiziyle ölçülen ilaç miktarının, başlangıçta formülasyona eklenen antikanser ilaçlarının miktarına oranıyla belirlenmiştir. Formülasyondaki RTX içeriğini ölçmek için bir BCA kiti kullanılmıştır. Tablo 4.6.2'de gösterildiği gibi, RTX'in yapıya dahil edilmesi, ACD formülasyonlarının yükleme etkinliğini artırmıştır, ancak antikanser ilaçlara yönelik PCD formülasyonlarında azalttığı belirlenmiştir. Bu durum, RTX'in ACD NP'lerinden erken ilaç salımını azaltabileceğini göstermektedir; bu hipotez, daha sonraki salım çalışmaları tarafından desteklenmiştir. Bu çalışma, NP ilaç taşıyıcı alanındaki potansiyel uygulamaları genişletmektedir. Sadece kombinasyon ilaçlarının eş zamanlı verilmesini kolaylaştırmakla kalmamış, aynı zamanda erken sistemik ilaç salınması bağlantılı yan etkilerin azaltılması konusunda da umut vaat etmiştir. Çoklu ilaç türlerini barındıran terapötik NP'ler, kanser hücrelerine karşı yüksek etkinlik göstermekte; ancak sağlıklı dokular için de risk oluşturabilmektedir. Bu nedenle,

hedefleme için NP'lerin kanser hücresine özgü ligandlarla modifiye edilmesi, tümör bölgelerinde NP birikimini artırmaya ve çoklu ilaç yüklü NP'lerin terapötik potansiyelini artırmaya yönelik çok önemli bir adım oluşturmaktadır.

5.3.7. İlaç Salım Profilinin Belirlenmesi

Farmasötik alanda in vitro salım testleri, dozaj şekillerinin geliştirilmesi ve kalite kontrolü için önemli bir araçtır ve bir ilacın in vivo etkililiği hakkında bilgi sağlar. Bu testler genel olarak üç kategoriye ayrılabilir: (1) membran difüzyon yöntemleri (örneğin, diyaliz yöntemleri), (2) örnek alma ve ayırma yöntemleri ve (3) sürekli akış yöntemleri (185). Membran difüzyon yöntemleri (örneğin, diyaliz yöntemleri), NP sistemlerinin in vitro çözülme/salım testleri için en yaygın araştırılan yöntemlerdir. Bu yöntemlerde, NP sistemleri, serbest ilaca geçirgen ancak NP'e geçirgen olmayan diyaliz membranları aracılığıyla salım ortamından ayrılır (186).

İlaçların NP'den salımını etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır.

Bunlar;

NP'ün fiziksel özellikleri (partikül büyüklüğü, porozitesi vb.)

Kullanılan materyalin etkisi (konsantrasyon, moleküler ağırlık, kristalite vb.)

İlacın özellikleri (Çözünürlük, hidrofobisite, moleküler ağırlık)

Moleküler etkileşimler (ilacın-taşıyıcı arası)

Sterilizasyon prosesinin etkisi

Salım ortamının özellikleri (pH, sıcaklık, ortamın türü) olarak sayılabilir (187).

Diyaliz yöntemi kullanarak gerçekleştirilen tez çalışmasında in vitro salım profilleri, formülasyonları karşılaştırmak ve NP'lerin in vivo salım kinetiğini tahmin etmek için kullanılmıştır ve aynı zamanda bir kalite kontrol ölçüsü olarak da hizmet etmiştir.

Español ve ark., dosetaksel ve doksorubisini birlikte yükledikleri PLGA-NP formülasyona ait salım profillerini incelendiğinde 72 saatin sonunda hidrofilik doksorubisinin %80 salınırken, hidrofobik dosetakselin %60'ı salınmıştır. Bu şekilde hidrofilik ilaçların hidrofobik ilaçlara göre daha hızlı salındığını göstermişlerdir (188).

Hidrofilik ilaçlar matrise daha fazla su çekerek şişme ve difüzyon için yüksek bir itici güç sağlar ve böylece ilacın çözünmesini ve hızlı salımını kolaylaştırmaktadır (187).

Patel ve ark., ise setuksimab ile konjuge ve konjuge olmayan PLGA NP'den dosetaksel salımını karşılaştırmalı olarak incelemiştir. Konjuge edilmemiş partiküllerde görülen "burst effect"ın yüzeye yakın tutunmuş olan ilaçtan kaynaklandığı belirtilirken, konjuge edilmiş partiküllerde daha yavaş salım görülme sebebi partikül yüzeyinde setuksimab bulunmasından dolayı dosetakselin iç kısımda hapsolmasına atfedilmiştir (189) Ayrıca literatürde, NP'lerin boyutunun artmasıyla salım hızının azaldığı, boyutun küçülmesiyle birlikte spesifik yüzey alanının artması sonucu salım hızının arttığını belirten çalışmalar bulunmaktadır (190, 191)

Şekil 4.6.5'de gösterilen DOX salım sonuçları incelendiğinde, DOX yüklü ACD ve PCD NP formülasyonlarının başlangıçta RTX ile hedeflenenlerden daha fazla ilaç saldıgı açıkça görülmüştür. 4. saatin sonunda, hedeflenmemiş DOX yüklü PCD NP'ler ilacın %80'ini salarken, hedeflenmemiş DOX yüklü ACD NP'ler %100 kümülatif ilaç salımına ulaşmıştır. Buna karşılık, RTX'i hedeflendirilen CD NP formülasyonları daha yavaş bir salım sergilemiş ve 24 saat sonra ilacın yalnızca % 60'ı salınmıştır. Hedefli NP'lerin daha yavaş salım yapma sebebi literatürde belirtildiği gibi yüzeyi ligandin kaplamasından dolayı olduğu düşünülmektedir. ACD NP'lerin daha hızlı salım yapma sebebi ise PCD NP'lere göre daha küçük partikül boyutuna sahip olmalarından kaynaklı olabilir.

Şekil 4.6.6'da gösterilen CYC'nin salım profili sonuçları incelendiğinde ise ACD ile hazırlanan formülasyonlarda ilk 2 saatte hedeflendirilmemiş NP'lerde "burst effect" görülürken RTX-CYC-ACD NP daha yavaş salım göstermiştir. DOX'ta olduğu gibi yüzeydeki RTX'in etkisiyle "burst effect"ın önüne geçildiği düşünülmüştür. Ancak RTX ile hedeflenen CYC yüklü PCD NP'leri, ilk 2 saat içinde ilacın %80'inden fazlasını salmıştır. Bu nedenle partikül yüzeyinde homojen bir RTX dağılımı olmadığı ve CYC'nin de yüzeyde homojen şekilde değil yüksek konsantrasyonda aynı alanda toplandığını ve aynı zamanda biyolojik sıvılardaki stabilite sonuçları da göz önüne alındığında 7.4 pH derecesinde NP'ün 2 saat içinde degrade olabileceğini düşündürmüştür.

Şekil 4.6.7’de yer alan VRC’e ait salım sonuçları incelendiğinde 24 saatin sonunda PCD NP formülasyonlardan kümülatif ilaç salınımı %30 civarında olurken, ACD NP’lerinde bu oran %10-20 arasında değişmiştir ancak RTX ile hedeflendirme ile anlamlı değişiklik elde edilmemiştir. Salım oranlarının düşük olma sebebi yine ilaçların iç kısma hapsolması ve küçük boyutları sebebiyle difüzyon hızının düşük olmasıyla açıklanabilmektedir.

In vivo sonuçlar ile karşılaştırıldığında ise ilaçların organizmada daha hızlı salındığı bulunmuştur. O nedenle in vitro salım sonuçları in vivo sonuçlar için sadece ilaçların salınabildiğine dair bir öngörü sağlamıştır, kalite kontrol parametresi olarak değerlendirilmelidir.

5.3.8. Nanopartikül Yapısındaki Rituksimab’ın Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi

Konjugasyon süreci, antikorların yapısını bozabilir ve bunun sonucunda biyoaktivitede azalma veya değişiklik meydana gelebilir. Konjuge antikorların biyolojik aktivitelerini koruduğundan emin olmak için, NP’e bağlandıktan sonra bütünlüklerini değerlendirmek önemlidir. Literatürde çeşitli konjuge antikorlar, SDS-PAGE kullanılarak bütünlük açısından değerlendirilmiştir (192).

Cavaco ve ark., konjugasyon sonrası antikor bütünlüğünü koruduğunu göstermek için anti-CD44v6 ile hedeflendirilmiş nano yapılı lipid taşıyıcı ve serbest anti-CD44v6 karşılaştırmasını SDS-PAGE analizi ile gerçekleştirmişlerdir ve bütünlüğün korunduğunu ifade etmişlerdir (193). Peng ve ark. ise misellerle konjuge edilmiş herseptin (TZM) içindeki konformasyonel değişiklikleri daha ayrıntılı incelemek amacıyla dairesel dikroizm (CD) spektroskopisini kullanarak farklı bir yaklaşım benimsemişlerdir. Bu optik spektroskopik teknik, protein konformasyonları hakkında yapısal bilgi elde etmek için kromoforlar tarafından sol ve sağ dairesel polarize ışığın belirgin emiliminden faydalanmaktadır. CD spektrumları, TZM'nin ikincil yapısının misellerle konjugasyon sonrasında beta dönüşünden poliprolin II heliks konformasyonuna geçtiğini göstermektedir (194, 195).

Tez kapsamında yapılan çalışmada Şekil 4.6.8'de belirtildiği gibi ACD ve PCD türevleriyle hazırlanan NP formülasyonlarındaki RTX, serbest RTX ile aynı bantları göstermektedir. Bu sonuçlar, NP hazırlama ve oluşturma süreçlerinin RTX'in yapısal bütünlüğünü etkilemediğini göstermektedir. Ayrıca SDS-PAGE analizi ile elde edilen RTX'e karşılık gelen bantların literatürde bildirilen önceki verilerle tutarlı olduğu görülmüştür (196)

Destekleyici çalışma olarak sirküler dikroizm ise ışığın dairesel olarak polarize iki formunun (sağ ve sol dairesel polarizasyon) bir örnekten geçerken farklı miktarlarda soğurulmasını ölçen bir spektroskopi tekniğidir. Bu farklı soğurulma, molekülün kiral özelliklerinden kaynaklanır. Özellikle proteinler gibi kiral moleküllerde ikincil yapıyı (alfa-heliks, beta-tabaka) analiz etmek için kullanılır. Her yapı tipi, farklı dalga boylarında karakteristik CD spektrumları üretir. Sirküler dikroizm spektroskopisinin SDS-PAGE'e göre çeşitli üstünlükleri bulunmaktadır. İlk olarak, CD spektroskopisi proteinlerin ikincil yapıları hakkında doğrudan bilgi sağlayarak proteinlerin yapısal stabilitesi ve katlanma özelliklerini inceleme imkânı sunar. SDS-PAGE ise yalnızca proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırdığı için proteinlerin yapısı hakkında bilgi vermez. CD spektroskopisi, biyomolekülleri doğal koşullarda analiz edebilme avantajına sahiptir. Bu sayede proteinler çözeltideki doğal halleriyle incelenebilir ve çevresel faktörlere, örneğin pH veya sıcaklık değişikliklerine karşı yapısal tepkileri izlenebilir. Oysa SDS-PAGE, proteinleri denatüre ettiği için yapısal bilgiyi koruyamaz. Üçüncü bir avantaj olarak, CD spektroskopisi hızlı analiz süresi ve çok az miktarda örnekle yapılabilmesi açısından da SDS-PAGE'e göre avantajlıdır. Küçük miktardaki biyomoleküllerle kısa sürede yapısal veri elde etmek mümkün olur.

Serbest RTX ve NP'e bağlı RTX'ler karşılaştırıldığında spektrumda verdikleri sinyallerin aynı olduğu görülmektedir. Bu da RTX yapısının bozulmadığı kesin şekilde kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada RTX'in yapısal bütünlüğünün NP bağlandıktan sonra korunması birkaç açıdan oldukça önemlidir. İlk olarak, RTX'in yapısal bütünlüğü, ilaç taşınma ve hedef hücreye bağlanma sürecindeki etkinliği üzerinde doğrudan etkilidir. Antikorların spesifikliği ve bağlanma afinitesi, hedef hücreler üzerinde etkili bir şekilde ilaç

taşınabilmesi için kritik öneme sahiptir. Eğer RTX, NP'e bağlandıktan sonra yapısal bütünlüğünü kaybederse, bu durum antikorun bağlanma yeteneğini azaltabilir ve dolayısıyla hedeflenen hücrelere ulaşma etkinliğini düşürebilir. Ayrıca, RTX'in konjugat yapısındaki stabilitesi, prelinik ve klinik çalışmalarda güvenilir sonuçlar elde edilmesi için gereklidir. RTX'in bağlanma özelliğinin korunması, yalnızca ilaç salım hızını değil, aynı zamanda hedeflenmiş tedavi sonuçlarını da etkiler. Yapısal bozulmalar, antikorun bağlanma bölgesini değiştirerek, hedef hücrelerde beklenen etkiyi azaltabilir. Sonuç olarak, RTX'in yapısal bütünlüğünün korunması, hedeflenen tedavi yöntemlerinin etkinliğini artırmak ve güvenilir sonuçlar elde etmek için kritik bir faktördür.

5.4. Nanopartiküler Sistemin Güvenliğinin ve Etkinliğinin Konvansiyonel Hücre Kültürü Çalışmalarında Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında, CD türevlerinden elde edilen NP'lerin *in vivo* deneyler öncesi güvenliği ve etkinliği *in vitro* hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları sonrasında, optimum formülasyon ile NHL tümörü indüklenmiş farelerde *in vivo* hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir.

5.4.1. Boş Nanopartiküllerin Güvenliğinin Belirlenmesi

Formülasyonlarında kullanılan CD türevlerinin konsantrasyonları belirli oranlarda DMEM ile seyreltilerek L929 hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 4.7.1, çeşitli konsantrasyonlarda CD çözeltilerine maruz bırakılan L929 hücrelerinin canlılık yüzdesini göstermektedir; bu, yüksek konsantrasyonlarda (1/8 CD:DMEM) bile her iki CD türevi için hücre canlılığının %70 civarında kaldığını ortaya koymaktadır. USP'ye göre polimerik malzemelerin güvenli kabul edilebilmesi için bu değerin %70'i aşması gerekmektedir(112)

5.4.2. Hücre Ölüm Mekanizmasının Belirlenmesi

Apoptoz, hücrelerin programlanmış bir şekilde ölmesini sağlayan doğal bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, organizmanın gelişimi, doku homeostazı ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi hayati işlevlerde rol oynar. Hücreler, apoptoz sayesinde kontrollü bir şekilde parçalanarak vücuda zarar vermeden ortadan kaldırılır. Hücrenin küçülmesi, DNA'nın parçalanması ve membran yapılarının bozulması gibi belirgin morfolojik değişiklikler bu sürecin temel özellikleridir. Aşırı ya da yetersiz apoptoz, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün bozukluklar ve kanser gibi çeşitli hastalıkların gelişmesinde önemli bir faktördür(197).

Normal hücrelerde, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunur. Hücre apoptoz sürecine girdiğinde, normalde iç yüzeyde yer alan PS molekülleri, hücre zarının dış yüzeyine taşınır. Bu translokasyon, hücre zarının bütünlüğü bozulmadan apoptozun erken evrelerinde gerçekleşir. Annexin V proteini, hücre yüzeyine taşınmış fosfatidilserine bağlanma özelliğine sahiptir. Bu nedenle, floresan bir madde (örneğin FITC) ile işaretlenerek, apoptotik hücrelerin görünür hale getirilmesi mümkündür. Annexin V-FITC kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı, akış sitometri kullanılarak ölçülebilir. Nekrotik hücrelerde de Annexin V bağlanması gözlenebildiği için, ikinci bir boya olarak propidyum iyodür eklenir. Annexin V-FITC (yeşil floresans) ve non-vital bir boya olan propidium iyodür (kırmızı floresans) ile boyanan hücreler, canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler (FITC+PI+) olarak ayrılabilir (198).

Akış sitometri, kolay uygulanabilirliği, hızlı sonuç vermesi ve kantitatif veri sunması nedeniyle klinikte apoptozun belirlenmesinde oldukça faydalıdır.

Kumar ve ark., gümüş NP maruziyetinin neden olduğu sitotoksiteyi değerlendirmek ve hücre ölümünü apoptoz ve nekroz olarak iki farklı şekilde sınıflandırmak amacıyla akış sitometriyi kullanmışlardır. Bu çalışmada L929 fibroblast hücreleri 24 saat değişen konsantrasyon ve partikül boyutlarında (10 nm, 100 nm, 200 nm) gümüş NP maruz bırakılmıştır ve Annexin V ve 7-AAD boyaları ile boyanmışlardır ve akış sitometrisinde incelenmişlerdir. 10 nm boyutundaki gümüş

NP'lerin 100 ve 200 nm olan NP'den artan konsantrasyona ve zamana da bağılı olarak daha fazla nekroza neden olduğunu ortaya koymuşlardır (199).

Tez çalışması kapsamında, Şekil 4.7.2'te gösterildiği gibi dirençli ve dirençsiz Bjab hücreleri ile çalışılmıştır. Dirençsiz hücelere uygulanan koşullar kontrole göre değerlendirildiğinde, erken apoptotik ve geç apoptotik popülasyonların genel olarak tüm gruplarda yaklaşık 3 kat arttığı tespit edildi. Ancak RTX-İlaç ACD NP'e maruz kalan hücrelerde erken apoptoz oran olarak azalırken geç apoptoz popülasyonunun 10 kata yakın arttığı gözlemlendi. Ayrıca çözelti uygulanan grup ile karşılaştırdığımızda sağlıklı hücre sayısının RTX-İlaç-ACD NP uygulanan gruba göre dört kat fazla olduğu tespit edildi. Bu şekilde dirençsiz hücreler üzerinde en etkili grubun RTX-İlaç-ACD NP formülasyonu olduğunu ortaya konulmuştur. Dirençli hücrelerde ise RTX-İlaç-ACD grubu hem nekroz hem de geç apoptoz popülasyonunu tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırmıştır. Çözelti uygulanan grup ile karşılaştırdığımızda ise erken apoptoz döneminde ciddi düşüş yaşanırken nekroz popülasyonu ve geç apoptoz popülasyonunun üç kata kadar arttığı ve sağlıklı hücre popülasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Dirençli ve dirençsiz hücre grupları için ilaç yüklü ACD ve PCD uygulanan gruplara bakıldığında ise her iki hücre popülasyonu için RTX-İlaç-ACD formülasyonunun daha sitotoksik olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca sonuçlar incelendiğinde dirençli kabul ettiğimiz hücre gruplarında sağlıklı hücre popülasyonunun çok daha fazla olması direnç gelişiminin başarıyla sağlandığını göstermektedir.

İnsan lenfoma hücreleri olan Bjab hücre hattında RTX direnç geliştirmiş olmak, klinik uygulamalarda karşılaşılan en önemli sorun olan ilaç direncini simüle etmek açısından kritik öneme sahiptir. Klinik pratiğe baktığımızda, RTX'in dahil olduğu tedavi kürleri sırasında, çoğu hasta zamanla tedaviye direnç geliştirmektedir. Bu durum, hastalığın progresyonunu zorlaştırmakta ve mevcut tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır. Tez çalışmasında, NHL hücrelerinde RTX'e karşı direnç geliştirmek, hem hastalığın doğal seyrini taklit etmeyi hem de geliştirdiğimiz formülasyonların etkililiğini daha gerçekçi bir şekilde değerlendirmeyi sağlamıştır. Hazırlanan formülasyonların ilaç direncini aşmada etkili olduğu ve ana amacımızı gerçekleştirildiği in vitro olarak kanıtlanmıştır.

5.4.3. Nanopartiküllerin Antiproliferatif Etkinliğinin Belirlenmesi

İn vitro sitotoksosite testleri (hücre canlılık testleri), genellikle olası ilaç adaylarının değerlendirilmesi veya bazı bileşiklerin sitotoksik profillerinin araştırılması için kullanılan hücre kültürüne dayalı ölçüm yöntemleridir. Bu yöntemlerle, kısa sürede birçok bileşiği değerlendirmek ve ileri hayvan deneyleri için gerekli temel bilgileri elde etmek mümkündür. Renk değişimine, enzimatik reaksiyonlara, luminometrik prensiplere vb. dayanan, farklı mekanizmalara ve çeşitli hassasiyet düzeylerine sahip birçok hücre canlılık testi yöntemi mevcuttur. Hücre canlılığının numune ile doğrudan temasından sonra metoda bağlı olarak kullanılan MTT, XTT, Nötral Kırmızısı Alımı (NKA), WST-1 gibi boyanın canlı hücrelere bağlanmasını temel alan yöntemler sıklıkla kullanılır (200). Tez çalışmasında Boş Gua-CD NP'lerin, DOX, CYC, VRC yüklü CD NP'lerin veya DOX/CYC/VRC ve RTX konjuge analoglarının kombinasyonunun antikanser aktivite çalışmaları Daudi ve Bjab (Direnc gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonucunda hücre canlılığı WST-1 ile kontrol edilmiştir. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri ile inkübe edilen hücreler kullanılmış olup, test gruplarındaki hücre canlılığı, kontrol grubuna kıyasla hesaplama ile belirlenmiştir.

Daudi hücrelerinin flask içinde ve kuyucuk içindeki mikroskobik görüntüleri Şekil 4.7.3 ile gösterilmiştir. Daudi ve Bjab (Direnc gelişmiş ve gelişmemiş) insan lenfoma hücreleri ile yapılan 24 ve 48 saatlik hücre canlılık analizlerinin sonuçları Şekil 4.7.4'te gösterilmiştir.

Tüm sonuçlar incelendiğinde, üç ilaç yüklü NP formülasyonunun fiziksel olarak karıştırılmasıyla elde edilen nihai formülasyonun, ilaç çözeltilerine kıyasla hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya yol açtığı açıkça görülmektedir. Formülasyonlar arasında, aktif hedeflenmiş ACD NP uygulanan gruplar en düşük hücre canlılığına sahip olmuştur.

Bjab (Direnc gelişmiş ve gelişmemiş) hücre hattı sonuçlarına göre RTX çözeltilisinin etkinliği incelendiğinde, hem 24 hem de 48 saatte hücre canlılığını %80'in

üzerinde koruduğu gözlemlenmiştir. RTX'in hücre canlılığı üzerinde doğrudan bir etkisi olmadığı, ancak formülasyona dahil edildiğinde hem PCD hem de ACD NP'lerinin etkinliğini anlamlı derecede artırdığı görülmüştür (RTX içermeyen CD NP'leri ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$), NP'lerin RTX'in hücre alımını artırmış olabileceği ve ACD NP'ler daha küçük, daha rijit ve daha katyonik yapıda olduğundan, negatif yüklü hücre zarları ile daha etkili bir şekilde etkileşime girdikleri düşünülmektedir. Ayrıca ortamda sadece tümör hücrelerinin olduğu göz önüne alınarak RTX'in CD20'e çapraz bağlanması sonucu hücre ölümü sinyali indüklemesi ile hücre ölümünü arttırabileceği düşünülmüştür (159)

PCD yapısı ise birkaç CD'nin birleşiminden oluşan daha karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu nedenlerle, ACD NP'ler, PCD NP'lerine kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı bir canlılık azalması sağlamıştır.

5.4.4. Antikora Bağımlı Hücrel Sitotoksitenin Belirlenmesi

Antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksiste, hedef hücrenin antikorlarla kaplandığı ve makrofaj hücreleri tarafından öldürüldüğü bir tür bağışıklık reaksiyonudur ve antikorların biyolojik aktivitelerini belirlemede ve biyobenzerlerin karşılaştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (201)

Sitotoksiteyi belirlemek için yaygın bir yöntemlerden biri, hasar görmüş hücrelerden salınan sitoplazmik enzimlerin aktivitesini ölçmektir. Laktat dehidrogenaz (LDH), tüm hücrelerde bulunan ve hücre zarının hasar görmesi durumunda kültür ortamına hızla salınan stabil bir sitoplazmik enzimdir. Bu özellik, apoptoz, nekroz veya diğer hücrel hasar türleri yaşayan hücrelerin temel göstergelerinden biridir. LDH aktivitesi, laktatın pirüvata dönüşümü sırasında üretilen NADH ile gerçekleşen bir reaksiyonla ölçülebilir. Bu reaksiyonda, NADH, sarı tetrazolyum tuzu olan INT'yi 492 nm'de absorban veren kırmızı, suda çözünür bir formazan boya haline indirger. Oluşan formazan miktarı, kültürdeki LDH miktarıyla, dolayısıyla ölü veya hasarlı hücre sayısı ile orantılıdır (202). Fasano ve ark, IgG1 izotip monoklonal antikor tedavisinin ADCC indüksiyon potansiyelini değerlendirmek için sağlıklı donörlerden elde edilen PBMC'lerden izole edilen NK hücrelerini kullanarak 13 insan akciğer

kanseri hücre hattında in vitro LDH sitotoksosite testi geliştirmiştir. H460 ve H1299 hücre hatları, yüksek PD-L1 ve EGFR seviyeleri ile düşük MHC-I ekspresyonu nedeniyle NK kaynaklı ADCC'ye en duyarlı hücreler olarak belirlenmiştir. Avelumab ve cetuximab kombinasyonu, akciğer kanseri hücrelerinde önemli ölçüde sitotoksosite artırmıştır (203).

Literature dayanarak tez çalışmasında LDH aktivitesi belirteç olarak kullanılmıştır. RTX, Daudi ve Bjab (Direnc gelişmiş ve gelişmemiş) hücrelerine spesifik olarak bağlanma sonucu efektör hücreyi uyarmaktadır. Uyarılan efektör hücre tarafından lizise edilen lenfoma hücrelerinden salınan LDH miktarı ölçülerek lizis edilen hücrelerin oranı belirlenmiştir. Şekil 4.7.5 ile gösterilen sonuçlara göre, RTX içeren GuaCD NP'lerin her ikisinde de en az serbest RTX kadar efektör hücreyi uyardığı belirlenmiştir. Bu sonuç RTX'ın NP hazırlama aşamalarında biyolojik aktivitesinde kayıp olmadığını göstermektedir. Aktif hedeflendirmenin başarıyla gerçekleştiği ve hücreye ulaşan yapısı bozulmamış RTX'in sadece hedeflendirme ajanı olmadığı değil aynı zamanda ADCC ile tedaviye katkı sağladığı da çıkarılan sonuçlardan biridir.

5.4.5. Kolesterol Ekstraksiyon Çalışması

Kolesterol, hücre zarlarının akışkanlığını düzenlemede kritik bir rol oynar. Yüksek kolesterol seviyeleri, membranı daha sert hale getirerek ilaç direncini artırabilir. Bu sertlik, ilaçların kanser hücrelerine girmesini zorlaştırarak, tedavi etkinliğini azaltabilir. Daha düşük kolesterol seviyeleri membranın akışkanlığını artırır, bu da ilaçların hücreye girmesini kolaylaştırabilir ama aynı zamanda hücre hareketliliğini artırarak metastazı destekleyebilir (204) Bunun yanı sıra, kolesterol, ATP bağlanma bölgesine ait taşıyıcı proteinlerin aktivitesini de etkiler. Yüksek membran kolesterolü, bu taşıyıcıların aktivitesini artırarak kemoterapötik ajanların hücrelerden atılmasına yol açabilir, bu da ilaç direncini artırır. Ayrıca, kanser hücreleri genellikle lipid profillerini değiştirerek, kolesterol metabolizmasını etkileyen metabolik adaptasyonlar geçirir. Bu adaptasyonlar, tedavi koşulları altında hücrelerin hayatta kalmasını artırarak ilaç direncine yol açabilir (204, 205).

Literatürde bahsedildiği üzere CD'lerin hücre membranı lipidleri ile kompleks oluşturma yeteneği iyi bilinmektedir ve Varan ve ark. tarafından yapılan çalışmada, hücre kültürü verileri bu bilgiyi desteklemektedir. Sonuçlar, anyonik ve polikatonik CD NP'lerin kolesterol afinitesi aracılığıyla hücre zarının yapısını bozduğunu açıkça göstermektedir. Yüzey yükü ve lipofilikliğin kanser hücrelerindeki apoptotik etki ve hücre zarının bozulma hızında önemli faktörler olduğu belirtilmiştir. Apoptozun, CD'lerin kolesterol afinitesi sonucu ortaya çıktığı ve bu etkileşimin hızının moleküler ağırlık ve kompleks oluşturma yeteneği ile belirlendiği sonucuna varılmıştır (118). Akkın ve ark., erlotinib yüklü amfifilik CD NP kolesterol azaltma etkinliğini A549 ve HepG2 hücre hatlarında araştırmışlardır. Her iki hücre hattında da pozitif kontrol grubundan daha az ya da eşdeğer miktarda kolesterol içeriği bulunmuştur. Formülasyon uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde kolesterol seviyeleri azalmıştır. Ayrıca zeta potansiyelin kolesterol affinitesini etkilemediği belirtilmiştir (103).

Tez kapsamında gerçekleştirilen kolesterol ekstraksiyon çalışmaları sonucu elde edilen bulgular Şekil 4.7.6 ile gösterilmiştir. Çalışmalar sırasında pozitif kontrol grubu olarak metil-B-CD çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, her üç antikanser ilaç yüklü ve RTX içeren ACD NP formülasyonu ile inkübe edilen hücrelerdeki kolesterol içeriğinin (%31,9 ±0,2) en az olduğu ve RTX içermeyen ilaç yüklü ACD NP ile inkübe edilen hücrelerden ve ilaç çözeltisi grubundan anlamlı derecede az olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). İlaç yüklü ancak RTX içermeyen NP'in kolesterol uzaklaştırma etkinliği ilaç çözeltileri ile inkübe edilen grupla benzer olduğu belirlenmiştir. Boş ACD NP ile inkübe edilen hücrelerdeki kolesterol içeriğinin ilaç yüklü ACD NP olduğu da gözlenmiştir. Yukarıda bahsedildiği üzere kolesterol ilaç direnci gelişmesi açısından büyük öneme sahiptir. Geliştirilen formülasyonlar kaynaklı kolesterolün hücreden uzaklaştırılması ile kolesterol kaynaklı direnç yollarının önüne geçilmiş olacaktır. İlaç direncini aşmak için adımlardan biri olan membran yapısının bozulması da bu şekilde sağlanmış olur. Membran geçirgenliği artarken daha fazla ilacın hücre içine alımı mümkün olur. Elde edilen sonuçlar bu nedenle ilaç direnci aşmada umut vericidir.

5.4.6. Survivin Deneyi

Kanser tedavilerine karşı gelişen direnç, tedavi başarısızlıklarının ve hasta hayatta kalma oranlarının düşük olmasının başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu direnç, genetik, epigenetik ve tümör mikroçevresi gibi birçok faktörün etkisiyle ortaya çıkmaktadır. Kanser hücrelerinin ilaç direnci geliştirmesine katkıda bulunan başlıca mekanizmalar arasında ilaç inaktivasyonu, hücre içine alınan ilaç miktarının azalması veya dışarıya atımının artması, ilaç hedeflerinin değişmesi, hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan yedekleyici yolların aktifleşmesi, DNA onarımı ve hücre ölümünün düzenlenmesi, tümör hücrelerinin esnekliği (plastisitesi) ve tümör mikroçevresinin (TME) düzenleyici rolü bulunmaktadır. Bu direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek amacıyla, ilaç yanıtını ve direncini tahmin edebilecek biyomarkerların belirlenmesi, yeni hedeflerin keşfedilmesi, hedefe yönelik yeni ilaçların geliştirilmesi, birden fazla sinyal yolunu hedefleyen kombinasyon terapileri ve tümör mikroçevresinin modüle edilmesi gibi çeşitli stratejiler önerilmektedir (206).

Anti-apoptotik protein olarak bilinen survivin proteini, birçok tümör hücresinde aşırı ifade edilmektedir, ancak normal hücrelerde nadiren bulunur. Kesharwani ve ark., triple-negatif meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere DOX ve likopen yüklü dendrimer formülasyonu tasarlamışlardır. B16F10 melanom hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda formülasyona anti-survivin siRNA dahil edilmesiyle dendrimer formülasyonun kardiyak toksisite oluşturmaksızın tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (207). Kemoterapötik tedavilerin neden olduğu hücre ölümünü engelleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayarak direnç gelişimine katkı sağlayan survivin miktarını azaltarak direncin önüne geçilmesine katkı sağlar.

Tez kapsamında Daudi hücrelerindeki survivin miktarındaki değişim Tablo 4.7.1 ile gösterilmiştir. Survivin antiapoptotik bir protein olup hücresel döngülerdeki görevi düşünüldüğünde hazırlanan ilaç yüklü ve hatta boş CD NP hücrelerindeki apoptoz üzerindeki inhibitör aktivasyonunu kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalttığı ($p < 0,05$) ve dolayısıyla hücrelerde apoptozu indüklemeye etkisine sahip olduğu söylenebilmektedir. İlaç direnci gelişmesinde rol oynayan survivin proteininin

geliştirilen NP formülasyonları ile inhibe edilemesi ilaç direnci aşılması noktasında güçlü bir yoldur. Boş NP de inhibisyon etkisi göstermesi ileriki çalışmalar ve başka hastalık türleri için de yeni bir araştırma konusu olarak düşünülmektedir.

Yukarıda anlatıldığı üzere kanser hücreleri yapısında bulunan kolesterol miktarı da direnç gelişimi açısından önemlidir. Çünkü ilaç dirençli kanser hücrelerinin plazma membranı, ilaçlara duyarlı hücrelere kıyasla farklı bir lipid bileşimine sahiptir; bu hücrelerde kolesterol ve fosfolipid seviyeleri yüksektir ve protein/lipid oranı %60'a kadar artmıştır. Ayrıca, ilaca dirençli kanser hücrelerinin hafif alkalik sitoplazma pH'ı, negatif yükleri zayıflatarak lipidlerin sıkı bir şekilde paketlenmesine ve zarın sertleşmesine neden olur. Bu nedenle, bu hücrelerde zarın akışkanlığı azalır ve geçirgenliği düşer, bu da ilacın emilimini azaltır. Yani hücre içine alınan ilaç miktarını azaltma yoluyla direnç gelişimine neden olur. Vinblastin, doksorubisin ve sisplatin gibi kemoterapötik ilaçlar, bu direnç mekanizmasına karşı savunmasızdır (208).

Hazırladığımız aktif hedeflendirilmiş ve ilaç yüklü NP formülasyonları sayesinde bu iki direnç geliştirme mekanizmasının önüne geçildiği gösterilmiştir. Bu sayede tezin amacı olan ilaç direncinin üstesinden gelme konusunda umut vericidir.

5.4.7. Mitokondri İzolasyonu

Mitokondri hücreler için enerji üretir ve mitokondriyal dinamikler olarak bilinen süreçleri aracılığıyla morfolojilerini değiştirebilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar, mitokondriyal dinamiklerin bağışıklık hücrelerinin yanıtına ve aktivasyonuna katılabileceğini göstermiştir. Kanser hücreleri, kemoterapi ilaçları karşısında büyümelerini ve canlılıklarını sürdürmek için metabolik yeniden programlamaya uğrarlar ve bu da mitokondriyal dinamiklerin ve enerjinin hayati önemini vurgulamaktadır (209). Metabolik yeniden programlama, kanserin en önemli ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilir (210).

Son yıllarda, organel-spesifik biyoaktif moleküllerin iletimi, yüksek seçicilik, maksimum terapötik etki, minimum yan etki ve düşük direnç elde etmek için kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mitokondriyi hedef alan terapötik stratejiler, mitokondriyal membranı veya matrisi, mitokondriyal metabolizmayı ve

mitokondriyal apoptozu veya düzenleyici sinyal yollarını doğrudan etkileyebilmektedir (211). Mitokondriyal membran geçirgenliğinin artması (MMP) gerçekleştiğinde, hücreler nekroz veya apoptoz gibi çeşitli ölüm yollarıyla ölecektir. Oksidatif stresin artması ve apoptozisin düzensizleşmesi ve/veya bozulmuş oksidatif fosforilasyon gibi mitokondriyal işlev bozukluğu, patofizyolojik mekanizmada hayati bir rol oynar. Ayrıca kanser ve diğer hastalıkları içeren diğer edinilmiş patolojilerin ve konjenital anomalilerin patogenezi de kontrol ederler (212). Sağlıklı ve kanserli mitokondriler, enerji üretim yolu, solunum hızı, zar potansiyeli ve gen mutasyonları gibi yapı ve işlev bakımından farklıdır. Sağlıklı normal hücrelerde mitokondriler, hücrelerin büyüme ve ölüm döngüsünü sürdürmek için çeşitli işlevlerin düzenlenmesini kontrol eder (210).

Kanser hücrelerinde ise mitokondriyal metabolizmanın düzensizliği her zaman hızla çoğalan hücrelerde daha yüksek metabolik talep nedeniyle meydana gelir. Kanser hücrelerinde kapsamlı bir metabolik yeniden programlama vardır. Bazı sağlıklı hücrelere göre mitokondriyal bozulmalara karşı çok daha hassastırlar. Bu nedenle mitokondriler, kanseri tedavi etmek için seçici hedefleme stratejilerinin belirlenmesinde kullanılabilir. Literatürde belirtildiği üzere guanidin, berberin ve rodamin gibi küçük moleküller de mitokondriyi hedeflemede kullanılabilir ve mitokondri hedefli DOX, klorambusil, kamptotesin yüklü nano taşıyıcı sistemler çalışılmıştır (209).

NP ile mitokondri hedefleme mekanizmaları, kanser tedavisi ve diğer biyomedikal uygulamalarda geniş çapta kullanılmaktadır. Bu hedefleme mekanizmaları arasında mitokondriye özgü lipofilik katyonlar (TPP), mitokondriye özel peptidler (MPP), mitokondri geçirgenlik tranzisyon gözenekleri (mPTP) ve reaktif oksijen türlerine (ROS) duyarlı salım mekanizmaları öne çıkmaktadır. Literatürde mitokondriyel oksidatif hasarın birçok dejeneratif hastalığa yol açtığını ve bunu önlemek için mitokondriye özgü antioksidanların kullanılabileceğini öne sürülmektedir. Antioksidanlar (örneğin, ubikinol veya α -tokoferol), pozitif yüklü trifenilfosfonyum (TPP) katyonu ile konjüge edilerek, mitokondriye birkaç yüz kat daha fazla birikerek oksidatif hasarı engeller. Bu bileşikler, kas hücreleri ve kan-beyin bariyerini geçerek oksidatif hasarın yoğun olduğu dokularda koruma sağlar. Bu sayede, mitokondriyi koruyucu tedavilerin temeli olabilmektedirler (213).

Guanidin ise güçlü bir organik baz olarak bilinir ve hücre içine geçiş özelliği yüksek olan TAT peptidinin (cell penetrating peptide) önemli bir bileşeni olarak ön plana çıkmıştır (214). Wang ve ark. guanidini N-(2-hidroksipropil) metakrilamid (HPMA) kopolimerine bağlayarak, pozitif yüklü bu kopolimerin, modifiye edilmemiş olanlara göre 4.27 kat daha yüksek hücre alım ve 24.5 kat daha yüksek mitokondri birikimi sağladığını bulmuştur (215).

Tez çalışması kapsamında yapılan mitokondri izolasyon analizi şekil 4.7.7’de gösterilen sonuçlara göre her iki GuaCD türevinin de daha fazla miktarda DOX’i çözelti formuna göre mitokondriye ulaştırdığı söylenebilir. Aynı miktarda doksorubisin içeren örneklerden, PCD türevinin Daudi hücrelerinde 1,32 kat ACD türevinin ise 1,44 kat fazla DOX’u mitokondriye ulaştırdığı belirlenmiştir. Dirençli Bjab hücrelerinde ACD formülasyonu çözelti formuna göre yaklaşık üç kat fazla DOX’u mitokondriye ulaştırırken, PCD formülasyonu ve çözelti arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Dirençsiz Bjab grubunda ise ACD formülasyonları DOX iletimini 4,5 kat artırırken, PCD formülasyonları yaklaşık 2 kat arttırmıştır. ACD NP dirençli hücrelere ilaç taşınmasını arttırabileceği ve çifte hedefleme stratejisinin (guanidin ve RTX ile) dirençli hücrelerde de bu sayede işe yarayabileceği gösterilmiştir.

NP formülasyonları sayesinde mitokondriye daha fazla DOX iletilebilmesi daha önce de belirtilen kanser hücrelerinde tedavi ile mitokondri membran geçirgenliğinin artmasına ve guanidin grubu sayesinde katyonik yüklü nanopartiküller elde edilmesine bağlanmıştır. Hücre membranında olduğu gibi siklodekstrinler sayesinde mitokondri membran lipid oranının değiştirilebileceği düşünülmüştür. Ayrıca tümör hücresine iletilen ilaç miktarının artması da mitokondri etrafında akümüle olan ilaç miktarını arttıracaktır. Her iki hücre grubunda da çözeltiye göre artış gözlenmesine rağmen dirençli hücrelerde bu oran daha azdır ve PCD ile çözelti arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Dirençli hücreler dirençsizlere kıyasla hem mitokondri hem de hücre membrane açısından daha sıkı bir yapıdadır. O nedenle dirençsiz hücrelerde daha fazla ilaç alımı sağlanması normaldir. PCD ve ACD formülasyonları arasındaki fark ise boyut ile açıklanabilir. PCD NP’ler ACD’lerden daha büyüktür ve bu nedenle membranlardan geçişi daha zordur. Ayrıca ACD NP’ler PCD NP’lerden daha katyoniktir. Bu da negative yüklü olan mitokondri membrane ile

etkileşimi arttıran bir faktördür. Literatürde guanidin grubu ile mitokondri hedeflemesi çeşitli NP ile çalışılmıştır (216) ancak siklodekstrin ile çalışan grup bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışma bu konuda da ilktir.

5.4.8. P-gp İnhibisyonunun Belirlenmesi

P-glikoprotein (P-gp), bir dışa akış (efflux) membran pompası olarak vücutta geniş bir dağılıma sahiptir, yabancı veya toksik maddelerin hücre içine alımını sınırlamaktan sorumludur. Yapısal olarak farklı yüzlerce terapötik ajan bu taşıyıcının substratı olup, bu ajanların hücre içine emilimini, geçirgenliğini ve hücrede tutulmasını engelleyerek onları hücre dışına atar. P-gp, kanser hücrelerinde aşırı şekilde eksprese edilir ve kemoterapötik ajanların hücreye girişini engellediği gibi, kanser hücrelerinde antikanser ajanlara direnç gelişiminden sorumludur. Bu durum, ilaçların hücre içine alımını ve hedeflemesini tehlikeye attığı için, P-gp aracılı ilaç dışa taşınımını aşmak için stratejiler geliştirilmektedir (217).

Stratejilerin amacı, P-gp'nin etkisini seçici olarak bloke etme yeteneği yoluyla artırılmış ilaç biyoyararlanımı, hedeflenen organda ilacın hücre alımı ve daha etkili kanser tedavisi elde etmektir. İnhibitörler, substratlar kadar yapısal olarak çeşitlidir. Birçok inhibitör (verapamil, siklosporin A, trans-flupentiksol, vb.) P-gp tarafından taşınır (218). Hem kemoterapötik ajan hem de inhibitör ajan taşıyıcı sisteme dahil edilerek P-gp ile ilgili zorluklar aşılabılır.

Bir diğer strateji ise P-gp'nin ilaçları dışarı atmasını engellemek için anti-P-gp monoklonal antikorlarının kullanılmasıdır. Bu süreçte antikor, ilaç yüklü taşıyıcı sisteme bağlanır ve ilaç dışa atımını yeterince inhibe edebilir. Matsuo ve ark., VRC yüklü lipid NP bağlanmış anti-P-gp monoklonal antikorları (MRK-16), hedeflenmemiş NP kıyasla dirençli insan miyeloid lösemi hücre hatlarında daha fazla sitotoksosite gösterdiğini bulmuşlardır. Bu sayede P-gp aracılı direnç mekanizması kısmen aşılmıştır (219). Goren ve ark. ise folik asit ile aktif hedeflendirilmiş DOX yüklü lipozomlarda folat reseptörünü aşırı ifade eden tümör hücrelerini hedeflemek için kullanılmışlardır. Folat reseptörü aracılığıyla hedeflenen lipozomal DOX M109-HiFR hücrelerinin çoklu ilaç dirençli alt tipine (M109R-HiFR) alımı, P-gp aracılı ilaç

dışa atımından etkilenmemiştir. Bu durum, serbest DOX alımına tamamen zıt bir etki göstermiştir (220).

Ayrıca P-gp geninin siRNA aracılı susturulması da kullanılan stratejiler arasındadır. Malmo ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan endotel hücre hattında çalışmışlardır ve anti-P-gp-siRNA yüklü kitosan NP ile inkübasyon sonucu anti-P-gp siRNA ile tansfüze edilmişlerdir. Bu sayede P-gp seviyeleri düşmüştür. Daha sonra hücrelerde DOX etkinliği Alamar Blue testi ile hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçerek belirlenmiştir ve P-gp düşüklüğü olan hücrelerde belirgin derecede metabolik aktivite azalması olmuştur (221).

Tez kapsamında yaptığımız çalışmada RTX ile hedeflendirilmiş DOX yüklü ACD ve PCD ile yapılan çalışmada negatif (PBS) ve pozitif (Verapamil) kontrol gruplarına oranla her iki formülasyon grubu için istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür. Hem direnç gelişmiş hem de gelişmemiş hücrelerde CD NP formülasyonlarının hücre içine ilaç alımına yardımcı olduğu belirlenmiştir. Direnç gelişen hücrede ACD NP formülasyonu Verapamile yakın sonuçlar verse de direnç gelişmemiş hücrelerde tam tersi sonuç elde edilmiştir.

Benzer şekilde Pawar ve ark. yaptığı çalışmada kuersetin (QCT) ve DOX yüklü β -CD polimer ile P-gp aracılığıyla meydana gelen çoklu ilaç direncini (MDR) aşmak için ilaç taşıyıcı sistem (β -CDP/QD NCs) geliştirmişlerdir. QCT'nin P-gp inhibe edici etkisinden yararlanılmıştır. Ayrıca CD taşıyıcı sistemlerin hücreSEL ilaç alımını arttırdığını da belirtmişlerdir. Rhodamine-123 boyama yöntemi kullanılarak P-gp'yi aşırı ifade eden MDR KB-ChR 8-5 kanser hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki (MMP) değişiklikleri incelemişlerdir. Sonuçlar, β -CDP/QD NC'lerin, P-gp'nin etkinliğini inhibe ederek ve MMP'yi etkileyerek kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini ortaya koymuştur (222).

Literatürden ve yaptığımız çalışmadan yola çıkarak DOX, P-gp substratı olmasından dolayı hücre içine alımı çözelti formunda az olmaktadır ancak ACD NP formülasyonu sayesinde P-gp aracılı dışa atımın azaldığını ve DOX hücreSEL alımın ilaç taşıyıcı sistemler aracılığı ile arttığını söylemek mümkündür. İlacın hücre içine girişinin arttırılmasıyla da mitokondri hedeflemenin daha kolay olduğu düşünülmüştür.

5.5. 3B Tümör Modeli Çalışmaları

Üç boyutlu (3B) hücre kültürleri, geleneksel iki boyutlu (2B) hücre kültürü sistemlerine kıyasla önemli avantajlar sunarak kanser araştırmalarında değerli araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Kanser araştırmalarında 3B hücre kültürünün temel faydalarından biri, kanser hücreleri ile onları çevreleyen stroma arasındaki karmaşık etkileşimleri özetleyebilme yeteneğidir. Tümörler yalnızca kanser hücrelerinden değil, aynı zamanda stromal hücreler, bağışıklık hücreleri ve kan damarları da dahil olmak üzere çeşitli diğer hücre tiplerinden oluşur. Bu modeller, geleneksel 2B hücre kültürleri ve hayvan modelleri arasında köprü kurarak klinik öncesi araştırmalar için uygun maliyetli, ölçeklenebilir ve etik bir alternatif sunar (223).

Foxall ve ark., 3B bir kültür sisteminde tümör mikro ortamının (TME) temel bileşenlerini çoğaltarak mevcut ve yeni tedavilerin in vitro test edilmesini kolaylaştıran yeni bir difüze büyük hücreli B hücreli lenfoma (DLBCL) modeli geliştirmişlerdir ve DLBCL 'nin fagositoz için uygun bir hedef olup olmadığını, geleneksel 2B ve 3B kültür sistemlerini karşılaştırarak incelemişlerdir. Kontrol için anti-CD türevi RTX uygulanmıştır. DLBCL 2B kültürde, bu hücrelerin %98'i in vitro ortamda öldüğünü., çünkü doğal ortamlarındaki gibi çok karmaşık etkileşimler yaşamadıklarını, 3B ortamda ise daha uzun süre hayatta kaldıklarını çünkü bu yapının, doğal mikroçevreyi daha iyi taklit ettiğini ifade etmişlerdir. 3B kollajen bazlı sferoid modelinde, RTX ile tedavi edilen DLBCL hücrelerinde fagositoz düzeyleri, 2B'ye kıyasla daha düşük gözlemlenmiştir. 3B sistemde ayrıca makrofajlar ve fibroblastlar gibi diğer hücreler de işin içine girmiştir ve RTX etkisi daha gerçekçi gözlemlenebilmiştir (224).

Şekil 4.8.1'de gösterilen bulgulara göre 48 saatlik inkübasyon sonunda ilaç yüklü NPlerde ve ilaç çözeltilerinde %70'in üzerinde hücre canlılığı gözlenmiştir. Bununla birlikte ilaç yüklü CD NP formülasyonlarının her ikisinde de hücre canlılığı ilaç çözeltilerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ($p < 0,05$). 72 saatlik analiz sonuçlarında ise bütün gruplarda hücre canlılığında dramatik düşüş olduğu gözlenmiştir. En az hücre canlılığının RTX-DOX+CYC+VRC-ACD NP olduğu gözlenmiştir. Dirençli ve dirençsiz hücrelere ait 48 saatlik veriler

incelendiğinde beklendiği gibi dirençsiz hücrelerde daha fazla ölüm gözlenmiştir ve en etkili formülasyon RTX-DOX+CYC+VRC-ACD NP'dür. Dirençli grupta ise canlılık oranı % 60 civarlarına düşerken en etkili formülasyon yine RTX-DOX+CYC+VRC-ACD NP olmuştur. Çözelti formuna göre NP formülasyonları istatistiksel olarak anlamlı derecede etkilidir ve formülasyona RTX eklenmesiyle etkililik daha da artmaktadır. Bu da hedeflendirmenin işe yaradığını göstermektedir (Şekil 4.8.2).

Şekil 4.8.3 İle gösterildiği gibi 3B lenfoma sferoidlerinde etkin madde miktarı aynı olan formülasyonların farklı etkilerinin olduğu mikroskop yardımıyla görüntülenmiştir. İlaç çözeltileri uygulanan sferoidlerin genel olarak küresel yapısını korurken siklodekstrin türevi ile inkübe edilen sferoidlerde küresel yapının bozulduğu açıkça gözlenmiştir.

3B hücre kültürü sonuçları konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarıyla birlikte değerlendirildiğinde her iki grupta da RTX-DOX+CYC+VRC-ACD NP formülasyonunun en etkili olduğu belirlenmiştir. 2B hücrelerde elde ettiğimiz sonuçları 3B hücrelerde doğrulamış olmamız formülasyonların etkisini daha net ifade etmiştir. 3B hücre kültürü sonuçları TME ile etkileşiminde dolayı daha gerçekçi sonuçlar sağlamıştır. Hayvan çalışmalarına geçmeden önce optimum formülasyonu belirleme açısından oldukça önemlidir ve hayvan çalışmalarını öngörebilmemizi sağlamıştır.

5.6. Hayvan Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında geliştirilen iki farklı CD NP lü arasında in vitro karakterizasyon ve in vitro hücre kültürü çalışmaları sonuçları göz önüne alınarak en iyi sonuçları gösteren formülasyon olduğuna karar verilen RTX ile hedeflendirilmiş ilaç yüklü ACD NPlerin in vivo etkililik, güvenilirlik ve biyoyararlanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca deneysel çalışma sonunda elde edilen tümör dokuları histopatolojik olarak incelenmiştir.

5.6.1. Güvenlilik Çalışması

ALT (Alanin aminotransferaz) ve AST (Aspartat aminotransferaz), karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesinde sıkça kullanılan iki önemli biyokimyasal enzimdir. Bu enzimler, amino asit metabolizmasında yer alırlar ve karaciğer hücrelerinde yüksek miktarda bulunurlar. Hasarlı karaciğer hücrelerinden kana salınan bu enzimlerin seviyeleri, karaciğer hasarını belirlemede önemli bir gösterge olarak kullanılır. AST, karaciğer hasarı sırasında da yükselir, ancak kas hasarı veya kalp rahatsızlıkları gibi diğer organlarla ilgili sorunlar nedeniyle de artabilir (225) NP, karaciğer hücrelerinde oksidatif stres, enflamasyon, hücre zarında hasar, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptoz gibi çeşitli mekanizmalarla hasara yol açabilir. Bu durum, karaciğer hücrelerinden ALT ve AST gibi enzimlerin kana sızmasına neden olur, bu da karaciğer fonksiyon bozukluğunun bir göstergesidir. Özellikle NP'lerin karaciğerde birikmesi ve hücre içi yapıların zarar görmesi, bu enzimlerin yükselmesine yol açarak toksisiteyi işaret eder. Bu nedenle NP bazlı tedavilerin güvenliliği değerlendirilirken bu enzimlerin takibi önemlidir (226).

Abdelhalim ve ark., 12 haftalık ratları 3 gün boyunca gold NP re (GNP) maruz bırakmışlardır. 10 ve 50 nm büyüklüğünde ayrı ayrı iki grup halinde GNP uygulanan ratlarda toksisiteyi karşılaştırmak açısından aspartat aminotransferaz (AST), gama-glutamil transferaz (GGT), alanin transaminaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), üre (UREA) ve kreatinin (CREA) değerlendirilmiştir. AST değerleri kontrol ile karşılaştırıldığında 10 ve 50 nm GNP'lerin uygulanmasıyla artmıştır. ALT değerleri ise 10 ve 50 nm GNP'lerin uygulanmasıyla kontrole kıyasla azalmıştır. Partikül büyüklükleri açısından kıyaslandığında ise ALT ve AST değerlerinin 10 nm GNP uygulanan grupta anlamlı derecede 50 nm GNP uygulananlara göre daha yüksektir. Böylelikle partikülün fiziksel özelliklerinin toksisite açısından önemi ve optimize edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (227).

Diğer bir literatür örneği olarak Sakai ve ark.'nın geliştirdiği Adamantan-HSA konjugatı ve FA-M β CD ile oluşturulmuş kompleks ile tedavi edilen Balb/c nu/nu farelerde formülasyonun güvenliliğini değerlendirmişlerdir ve FA-M β CD'nin tek başına tekrarlanan uygulaması, serumdaki AST ve ALT seviyelerini artırmıştır, bu artış, uzun vadeli tekrarlanan uygulamaların karaciğer hasarına neden olabileceğini

düşündürmüştür. Buna karşın Ad-HSA/FA-M β CD kompleksinin tekrarlanan uygulanması, serum AST veya ALT seviyelerini artırmamıştır. Bu sonuçlar, Ad-HSA/FA-M β CD kompleksinin FA-M β CD'nin kanda dolaşım süresini arttırırken güvenliliğini de arttırdığını göstermiştir (164).

Tez kapsamında yaptığımız çalışmalar sonucunda kullandığımız CD türevlerinin Balb/c farelerde neden olduğu ALT ve AST seviyeleri ölçülmüştür. ACD ve PCD türevleri ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı bu nedenle ALT/AST seviyelerini yükseltmediği bulunmuştur. Bu çalışma hayvan deneylerinin başında kullandığımız CD türevlerinin hayvan üzerinde toksik etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında belirlenen dozda verilen CD türevlerinin hayvanlar üzerinde toksik etkisi olmadığı belirlenmiştir ve hayvan deneylerine bu şekilde devam edilmiştir.

5.6.2. Plazma Profili Belirlenmesi

İntravenöz uygulanan hidrofilik ilaç molekülleri, glomerüler filtrasyondan sonra yetersiz geri emilim nedeniyle genellikle hızlı böbrek klerensine uğrar. Buna karşın, lipofilik ilaçlar, safra veya böbrek yoluyla atılmadan önce karaciğerde biyotransformasyona uğrayarak hidrofilik metabolitlere dönüşür. İlaçların NP içinde enkapsüle edilmesi, artan partikül büyüklüğü nedeniyle böbrek klerensini azaltır (böbrek klerensi için sınır <15 nm'dir). Ayrıca, NP formülasyonları lipofilik ilaçları karaciğerdeki metabolize edici enzimlerden koruyabilir (228). Bu nedenle hidrofilik ilaçların plazma profilini değiştirmek adına ilaç taşıyıcı sistemler sıklıkla çalışmaktadır. Elde edilen biyolojik materyallerden madde miktarı tayini için ise LC-MS/MS sıklıkla kullanılmaktadır. LC-MS/MS küçük moleküllü ilaçlar için standart bir biyoanaliz yöntemi olup, son zamanlarda NİTS in vivo ilaç salım sürecini incelemek için de tercih edilen bir yöntem olarak kabul edilmektedir (229). LC-MS/MS tekniğinin gücü, yüksek analitik seçiciliğinde yatmaktadır. Kantitatif analiz için bir numune, matrisin bazı karmaşıklıklarını gidermek amacıyla seyreltme veya saflaştırma yoluyla ön işlemden geçirilir ve ardından sıvı kromatografi sistemine enjekte edilir. Sıvı kromatografi mobil fazı, analiti taşıyarak kütle spektrometresinin kaynağına girer ve burada gaz fazı iyonları üretilir. İlk kütle analizörü, gelen iyonları filtreleyerek yalnızca öncü iyonların çarpışma hücrelerine doğru ilerlemesine izin verir.

Çarpışma hücresinde, öncü iyonlar ürün iyonlarına parçalanır ve bunlar tandem kütle spektrometresinin son aşamasında analiz edilir(230). Gilkey ve ark., fizyolojik temelli farmakokinetik (PBPK) model kullanarak floresan işaretli NPlerin farelerde akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisi için deksametazon kontrollü salımı sırasında vücutta nasıl dağıldığı ve hangi konsantrasyonda bulunduğu anlamak istemişlerdir. Model, NP'lerin faredeki plazma ve organlardaki (karaciğer, dalak, böbrekler) konsantrasyonlarını simüle ederek NP'lerin biyodağılımını incelemektedir. NP'ler karaciğer, dalak ve böbreklerde hızlı bir şekilde birikirken plazma konsantrasyonları hızla düşmüştür. Bu sonuçlar, daha önce yayınlanmış in vivo verilerle tutarlı bulunmuştur (231).

Tez çalışması kapsamında LC/MSMS ile elde edilen sonuçlar incelendiğinde, tüm ilaçlar için beklendiği üzere ilk zaman noktasında ilaç çözeltisi verilen grupta serumdaki ilaç miktarı NP salınan ilaç miktarına göre daha fazladır.

DOX çözeltisi ve RTX-DOX-ACD NP'e ait grafik incelendiğinde zamana bağlı azalan bir plazma profili çizerken DOX yüklü ACD NP formülasyonu konsantrasyonu 2.saate artmış ve sonrasında azalan bir profil çizmiştir. AUC değerleri arasında yüksek bir fark bulunmazken yarılanma ömrü NP formülasyonu ile 2 kat artmıştır. Bu da bize ilacın vücuttan iki kat daha yavaş elimine edileceğini ve bu sayede daha uzun süre terapötik dozda kalarak etki süresini uzatabileceği anlamına gelir. Ayrıca çözelti ile karşılaştırıldığında daha seyrek dozlama yapılması gibi bir üstünlük sağlar. Vd oranı çözeltide daha düşüktür, bu ilacın plazmada kalmaya daha yatkın olduğunu ve NP formülasyonlarına göre dokulara geçişinin daha sınırlı olduğunu gösterir.

CYC çözeltisi ve RTX-CYC-ACD NP'e ait grafik incelendiğinde her iki formülasyon için de azalan bir profil görülmektedir. AUC değeri neredeyse iki kat düşerken yarılanma ömrü de 3 dk kadar kısalmıştır. Ayrıca NP formülasyonu ile birlikte klerens ve Vd değeri artmıştır bu da NP formülasyonunun çözelti formuna kıyasla daha hızlı elimine edilebileceği düşüncesini doğrumuştur.

VRC çözeltisi ve RTX-VRC-ACD NP'e ait grafik incelendiğinde ise çözelti formunda son zaman noktasına kadar VRC konsantrasyonları yakın çıkarken NP formülasyonunda artan bir profil görülmektedir. Bu da "burst effect" görülmediğini

kontrollü bir salım sağlandığını göstermiştir. NP formülasyonu sayesinde klerens değeri azalırken yarılanma ömrü 2 kattan fazla artmıştır. Bu sayede eliminasyonun çözeltiliye göre oldukça yavaş olacağı ve ilaca maruziyetin artabileceği belirlenmiştir.

Tmax ve Cmax değerleri ise DOX ve VRC için NP formülasyonlarında uzama ve artış göstermiştir. Bu da formülasyonların kontrollü salım yapabildiğini ortaya koyarken vücutta daha sabit bir konsantrasyonda kalmayı ve yan etkilerin azaltılmasını sağlayabilmektedir. CYC için ise çözeltili ve NP formülasyonu arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu nedenle “burst effect” ile ilacı hızlıca saldığı ve bu nedenle de kolay elimine edildiği düşünülmüştür.

Çalışma sadece ilaçların çözeltili formları ve NP formülasyonları kendi içinde değerlendirilerek yapılmıştır. Ancak tedavi formu olarak üç ilacın NP formlarının fiziksel karışımı kullanılacaktır. Bu nedenle parametrelerde değişiklik olabileceği düşünülmektedir.

5.6.3. Antitümöral Etkinlik

Hayvan deneyleri, kanser araştırmalarında ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu çalışmalar, insan hastalıklarının patofizyolojisini anlamaya ve potansiyel tedavi stratejilerini test etmeye olanak tanır. Özellikle onkoloji alanında kullanılan hayvan modelleri, tümörlerin büyüme dinamiklerini ve tedaviye yanıtlarını gözlemlemek için önemli bir araç sunmaktadır (232). Örneğin Wu ve ark. Balb/c farelerde hepatoselüler karsinoma (HCC) oluşturmuşlardır. Karnozik asit bazlı nanotaşıyıcılar (CA-NBF) kullanılarak anti-PD-1 antikorunun tedaviye duyarlılık kazandırıcı etkisi olup olmadığını incelemişlerdir ve CA-NBF, anti-PD-1 ile birlikte uygulandığında, tümör büyüklüğünde ve ağırlığında önemli bir azalma olduğunu ortaya koymuşlardır (233).

Tez kapsamında A20 mürin lenfoma hücreleri ile singenetik fare modeli oluşturulmuş olup antitümöral etkinlik için kullanılmıştır (234). Literatürde bu hayvan modeli bulunmaktadır ancak R-CHOP tedavi rejimini ilaç taşıyıcı sistem ile formüle edilmiş bir çalışma bulunmamaktadır ve dolayısıyla yaptığımız hayvan çalışmaları literatürde bir ilktir.

6 gruptaki her bir fare kendi grubuna ait formülasyonu 5 kez almış olup, 5. dozdan 48 saat sonra tüm hayvanlar sakrifiye edilmiş ve tümör ve organları çıkartılmıştır. Bu süreçte bazı farelerin anjiyogenez kaynaklı deri yüzeyinden de belli olan kanama ve kabuklanma görülmüştür. Ayrıca yine yüzeyden belli olan doku bozulmaları bazı gruplarda tümörün nekroza gittiğini göstermiştir. Özellikle kontrol grubunda bulunan hayvanlarda bu durumlar açıkça gözlenmiş ve bir hayvan tümörünün tamamını yerken (bu nedenle deneyden dışlanmıştır) bir hayvan da tümörünün içini dolduran nekrotik sıvıyı boşaltmıştır.

Clynes ve ark.'nın çalışmaları, ADCC'nin önemine dair en güçlü kanıtları sunmaktadır; bu çalışmada, antikorun, yaygın FcR γ zincirine sahip olmayan farelerde etkili olmadığı, ancak normal farelerde etkili olduğu bulunmuştur (233). Ayrıca, Fc γ RIIb adı verilen inhibitör reseptörün eksik olduğu farelerde monoklonal antikor tedavisinin antitümör etkisinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, antikor ile FcR arasındaki etkileşimlerin tedavi etkinliğini belirlemede merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (235). Bir diğer örnekte ise Voltan ve ark. yaptığı çalışmada nutlin-3 yüklü RTX kaplı PLGA NP'lerin JVM-2 (insan lösemik hücre hattı) lösemik ksenograft farelerde çözelti, hedeflendirilmemiş veya boş NP gruplarına kıyasla anlamlı derecede etkili terapötik aktivite gösterdiği ve hayatta kalma oranını arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında gösterildiği üzere RTX kaplı NP'ler kompleman kaskadı aktive edebilmiş ve hücreye bağlı sitotoksiteyi başlatmıştır. Bu nedenle *in vivo* deneylerdeki başarı hem nutlin-3'ün sitotoksik etkisine hem de RTX'in hücreye bağlı sitotoksiteyi başlatmasına bağlanmıştır (236).

Tez kapsamında sakrifiye edilen hayvanların tümörleri çıkarıldığında tümör çevresinde yağlı bir doku olduğu görülmüştür. Bu yağlı doku boş ACD NP ve kontrol grubunda daha katı bir yapıda iken RTX içeren gruplarda daha serbest hale gelerek akışkanlaşmaya başlamıştır. Ayrıca bu yağlı dokunun zamanla tümör ile büyüdüğü ve ilaç direncini etkilediği düşünülmüştür. Tümöre ait hesaplanan geometrik ortalaması 1'in üzerinde olan hayvanlarda tedavi almalarına rağmen tümör hızla büyümeye devam etmiştir. Geometrik ortalaması 0,8-0,9 civarı olan tedavi grubu olan RTX-DOX+CYC+VRC ACD NP uygulandığında tümör boyutu 3.doz ve sonrasında sabit kalmıştır. Kalan tüm gruplarda tümör büyümesi devam ettiği için RTX-DOX+CYC+VRC ACD NP'nin daha etkili olduğunu söylemek mümkündür. Özellikle

klirikte kullanılan çözeltili formu ile karşılaştırdığımızda tümör büyümesini yavaşlattığı görülmüştür. Bu da daha etkin bir tedavi sağladığını ortaya koymaktadır.

Tümör ağırlıkları açısından değerlendirildiğinde ise en düşük ağırlığın RTX-DOX+CYC+VRC ACD NP uygulanan grupta olduğu görülmektedir. Karaciğer, akciğer ve dalakları da çıkarılıp incelenen farelerde hiçbir grupta metastaz görülmemiştir. Ancak yağlı dokunun sırttan karın içine doğru büyümesiyle organları sardığı görülmüştür. Sonuç olarak tümörler büyüklük, büyüme hızı, ağırlık açısından değerlendirildiğinde en etkili grubun RTX-DOX+CYC+VRC ACD NP olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca RTX-DOX+CYC+VRC ACD NP'in RTX çözeltilisi+DOX+CYC+VRC ACD NP 'e karşı daha etkili olması CD-adamantan etkileşimin başarılı olduğunu ve hedeflendirme bölgesine kadar RTX'in salınmadığını göstermiştir.

Bu nedenle aktif ve pasif hedeflemenin başarıyla gerçekleştirildiği, tümör bölgesine ulaşan NP sistemde antikanser ilaçların sitotoksik etkisi sayesinde ve hücre kültürü sonuçlarında da belirtildiği gibi RTX'e bağlı ADCC kaynaklı, CDC kaynaklı veya doğrudan ölüm sinyalinini indükleyerek apoptozu sağladıkları düşünülmektedir.

5.6.4. Histopatolojik İnceleme

Tümör histopatolojik inceleme, tümör hücrelerinin mikroskop altında detaylı olarak ince lenmesini içeren bir prosedürdür. Bu inceleme, hücresel yapıların, tümör tipinin ve yayılımının belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Tümör histopatolojisi, kanser teşhisi, sınıflandırılması ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesi gibi kritik kararlar almak için kullanılır (237, 238).

Erdoğan ve ark., folat konjuge siklodekstrin (FCD-1/FCD-2) NP bağlı paklitakselin (PCX), Cremophor EL bazlı PCX çözeltilisi ile karşılaştırılarak antitümör etkisini değerlendirmek amacıyla Balb-c farelere tümör hücresi enjeksiyonundan sonra tümör boyutu, hayatta kalma oranı ve histopatolojik görünümleri çalışılmışlardır. Histopatolojik olarak, kontrol grubunda tümör dokusunda hasar, vakuolizasyon ve hücreler arası ödem gözlenmiştir. PCX yüklü FCD-1 NP ile tedavi edilen grupta, meme dokusunda belirgin bir hasar görülmemiş ve NP daha yüksek miktarda biriktiği tespit

edilmiştir. FCD-2 NP tedavi edilen grupta ise hücreler arası ödem ve daha fazla hücrel hasar gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, FCD-1 NP gecikmeli salım ve uzun dolaşım süresi sayesinde daha yüksek antitümör etkinlik göstermiş, biyouyumlu bulunmuş ve meme kanseri tedavisi için uygun olduğu sonucuna varılmıştır (239).

Tez çalışması kapsamında yapılan tümör incelemeleri sonucu coğrafi yaygın nekrotik alanlar tüm gruplarda mevcut bulunmuştur. Literatürde çeşitli çalışmalarda, tümör nekrozu ve tümör heterojenliği arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Örneğin, kanser hücrelerinin beslenmesi ve büyümesi için gerekli olan damar oluşumu eksikliği, nekrotik alanların ortaya çıkmasına neden olabileceği ortaya konmuştur. (240, 241). Subkütan uygulanarak elde edilmiş bir tümör dokusu oluşturduğumuz için anjiogenez oluşması daha zordur. Bu nedenle tüm gruplarda nekrotik alan görüldüğü düşünülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Non-Hodgkin lenfoma (NHL), günümüzde hala tedavi edilemeyen bir kanser türü olup, nüfus artışı ile bu hastalıkların daha da yaygınlaşacağı öngörülmektedir. Bu çalışma, klinikte NHL tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikanser ilaçları nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler ile birleştirilerek etkililiğinin artırılmasına yönelik bir yaklaşım sunmaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz kalmasının temel nedenleri arasında, özellikle R-CHOP rejiminde kullanılan ilaçlara karşı gelişen çoklu ilaç direnci yer almaktadır. Bu noktada, antikor temelli hedefleme stratejilerinin kullanılması, tedaviye yönelik etkili bir alternatif sunmaktadır.

Tez çalışmasından elde edilen bulgular incelendiğinde;

Mitokondriyi hedeflemeyi sağlayan Guanidin grubu içeren siklodekstrinler kullanılarak NHL hücrelerinde fazlaca eksprese edilen **CD20’i hedeflemeyi sağlayan RTX** ile aktif hedeflendirilmiş ve klinikte kullanılan DOX, CYC ve VRC ilaçları yüklenmiş NP formülasyonu hazırlanması (RTX-DOX+CYC+VRC ACD NP) ve **dual hedeflendirme stratejisinin başarıyla gerçekleştirildiği** ortaya konulmuştur.

Aynı zamanda tedavide de etkili olan RTX’in yapısal bütünlüğü ve etkinliği NP bağlandıktan sonra da korunmuştur bu sayede **aktif hedeflendirme ve ADCC’e bağlı aktivite sağlanmıştır.**

Mitokondri izolasyonu çalışması yapılarak NPlerin mitokondriye daha fazla ilaç taşıdığı bulunmuş ve bu sayede **Guanidin grubunun hedeflemede başarılı olduğu kanıtlanmıştır.**

Elde edilen NP’lerin partikül büyüklüklerinin **200 nm'nin altında** olması, EPR etkisiyle **tümöre pasif hedeflendirmenin de sağlandığını göstermiştir.**

Hücre kültüründe yapılan antitümöral çalışmalar hem dirençli hem dirençsiz hücre gruplarında özellikle ACD ile hazırlanan formülasyonun **konvansiyonel tedaviden daha etkili** olduğunu ortaya koymuştur.

Akış sitometri ile ölüm mekanizmaları incelenerek **antitümöral sonuçlar doğrulanmış** ve aydınlatılmıştır. Ayrıca **direnç geliştirme aşamasının başarılı bir şekilde gerçekleştiği** yine akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir.

RTX-DOX+CYC+VRC ACD NP tümör membranında bulunan kolesterole afinitesi sayesinde membran yapısını bozmuş ve geçirgenliği artırarak **ilaç direncinin aşılmasına** katkı sağlamıştır. Survivin seviyesini azaltarak da **apoptozu indükleyebileceği** görülmüştür. P-gp seviyelerindeki azalma da ilaç direncini aşmak için ayrı bir mekanizma olarak sağlanmıştır.

Hayvan deneylerine, in vitro karakterizasyon ve hücre kültürü deney sonuçları değerlendirilerek ACD ile gidilmiştir. **NHL tümörü geliştirilmiş farelerde RTX-DOX+CYC+VRC ACD uygulanan grupta 3.kürden sonra tümör boyutu sabit kalırken** klinikte kullanılan rejimi temsil eden gruptaki tümörler büyümeye devam etmiştir. Bu sayede hayvan deneylerinde de formülasyonun **etkililiği kanıtlanmıştır**. Ancak geometrik ortalaması 1'den büyük olan fareler geç dönem olarak düşünüldüğünde formülasyonun **erken evrede daha etkili olduğu düşünülmektedir**.

Ayrıca tez konusu ve çalışmalar **NHL tedavisinde R-CHOP tedavi rejiminin NP sistemlerle formülasyonu hazırlanması açısından ilktir**.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar **NHL tedavisi için umut vericidir** ve gelecekte yapılacak çalışmalar için **öncü niteliğindedir**.

7. KAYNAKLAR

1. Foundation LR. Understanding Non-Hodgkin Lymphoma, A guide for Patients, Survivors and Loved Ones [Available from: https://lymphoma.org/wp-content/uploads/2019/01/NHL-Booklet_July-2018.pdf].
2. Yıldız A, Öztürk HBA, Albayrak M, Şahin O, Öztürk ÇP, Maral S, et al. Erişkin lenfoma hastalarının epidemiyolojik ve sağkalım verileri: tek merkez deneyimi. *Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2018;10(3):240-6.
3. Society AC. Cancer Facts&Figures [Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2020/cancer-facts-and-figures-2020.pdf>]
4. Juskevicius D, Dirnhofer S, Tzankov A. Genetic background and evolution of relapses in aggressive B-cell lymphomas. *haematologica*. 2017;102(7):1139.
5. Lugtenburg PJ, Lyon AR, Marks R, Luminari S. Treatment of aggressive non-Hodgkin's lymphoma in frail patients: cardiac comorbidities and advanced age. Taylor & Francis; 2019.
6. Crockett DG, Armitage JO, Vose JM. Diagnosis and treatment of non-hodgkin's lymphoma of adults. *Neoplastic Diseases of the Blood*. 2018:951-73.
7. Brown JS, Amend SR, Austin RH, Gatenby RA, Hammarlund EU, Pienta KJ. Updating the definition of cancer. *Molecular Cancer Research*. 2023;21(11):1142-7.
8. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2024;74(1).
9. Ferlay J EM, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F Global Cancer Observatory: Cancer Today 2024 [Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>].
10. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*. 2014;6(3):1769-92.
11. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull*. 2017;7(3):339-48.
12. Nikolaou M, Pavlopoulou A, Georgakilas AG, Kyrodimos E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2018;35:309-18.
13. Mir SA, Hamid L, Bader GN, Shoaib A, Rahamathulla M, Alshahrani MY, et al. Role of nanotechnology in overcoming the multidrug resistance in cancer therapy: A review. *Molecules*. 2022;27(19):6608.
14. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature*. 2019;575(7782):299-309.
15. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. *Current Biology*. 2020;30(16):R921-R5.
16. Armitage JO, Gascoyne RD, Lunning MA, Cavalli F. Non-hodgkin lymphoma. *The lancet*. 2017;390(10091):298-310.
17. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*. 2012;380(9844):848-57.
18. Singh R, Shaik S, Negi B, Rajguru J, Patil P, Parihar A, et al. Non-Hodgkin's lymphoma: A review. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2020;9:1834.

19. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84(5):1361-92.
20. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
21. Jaffe E, Carbone A. B- and T-/NK-Cell Lymphomas in the 2022 International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms and Comparison with the WHO Fifth Edition. *Hemato*. 2024;5:157-70.
22. Alawi EM, Mathiak KA, Panse J, Mathiak K. Health-related quality of life in patients with indolent and aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Cogent Psychology*. 2016;3(1):1169582.
23. Pratap S, Scordino TS. Molecular and cellular genetics of non-Hodgkin lymphoma: Diagnostic and prognostic implications. *Experimental and molecular pathology*. 2019;106:44-51.
24. Society LaL. Diagnostic Designations for Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Subtypes 2024 [Available from: [https://www.lls.org/lymphoma/non-hodgkin-lymphoma/nhl-subtypes#:~:text=Diagnostic%20Designations%20for%20Non%2DHodgkin,progression%20\(aggressive%20or%20indolent](https://www.lls.org/lymphoma/non-hodgkin-lymphoma/nhl-subtypes#:~:text=Diagnostic%20Designations%20for%20Non%2DHodgkin,progression%20(aggressive%20or%20indolent)].
25. Zhang Y, Dai Y, Zheng T, Ma S. Risk Factors of Non-Hodgkin Lymphoma. *Expert opinion on medical diagnostics*. 2011;5:539-50.
26. Bassig BA, Lan Q, Rothman N, Zhang Y, Zheng T. Current Understanding of Lifestyle and Environmental Factors and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma: An Epidemiological Update. *Journal of Cancer Epidemiology*. 2012;2012(1):978930.
27. Institute NC. Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®)–Patient Version [Available from: <https://www.cancer.gov/types/lymphoma/patient/adult-nhl-treatment-pdq>].
28. UK CR. Treatment options for non-Hodgkin lymphoma [Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/non-hodgkin-lymphoma/treatment/decisions>].
29. Network SWSC. R-CHOP 2015 [Available from: <https://www.swagcanceralliance.nhs.uk/wp-content/uploads/2020/10/R-CHOP.pdf>].
30. Clinic C. R-CHOP [Available from: <https://my.clevelandclinic.org/health/treatments/r-chop>].
31. Foundation LR. Treatment Options for Lymphoma [Available from: <https://lymphoma.org/understanding-lymphoma/treatment-planning-and-options/treatments/>].
32. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MdP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*. 2018;16(1):71.
33. Deng Y, Zhang X, Shen H, He Q, Wu Z, Liao W, et al. Application of the nano-drug delivery system in treatment of cardiovascular diseases. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020;7:489.
34. Ezike TC, Okpala US, Onoja UL, Nwike CP, Ezeako EC, Okpara OJ, et al. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon*. 2023;9(6).

35. Demirtürk N, Bilensoy E. Nanocarriers targeting the diseases of the pancreas. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2022;170:10-23.
36. Laffleur F, Keckeis V. Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed? *International journal of pharmaceutics*. 2020;590:119912.
37. Attia MF, Anton N, Wallyn J, Omran Z, Vandamme TF. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(8):1185-98.
38. Alavi M, Hamidi M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2019;34(1).
39. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*. 2013;12(11):991-1003.
40. Zein R, Sharrouf W, Selting K. Physical properties of nanoparticles that result in improved cancer targeting. *Journal of Oncology*. 2020;2020(1):5194780.
41. Rajendrakumar SK, Cherukula K, Park HJ, Uthaman S, Jeong YY, Lee B-I, et al. Dual-stimuli-responsive albumin-polyplex nanoassembly for spatially controlled gene release in metastatic breast cancer. *Journal of Controlled Release*. 2018;276:72-83.
42. Hirsjarvi S, Passirani C, Benoit J-P. Passive and Active Tumour Targeting with Nanocarriers. *Current Drug Discovery Technologies*. 2011;8(3):188-96.
43. Patel JK, Patel AP. Passive targeting of nanoparticles to cancer. Surface modification of nanoparticles for targeted drug delivery. 2019:125-43.
44. Onzi G, Guterres SS, Pohlmann AR, Frank LA. Passive Targeting and the Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect. *The ADME Encyclopedia: A Comprehensive Guide on Biopharmacy and Pharmacokinetics*. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 1-13.
45. Upponi JR, Torchilin VP. Passive vs. Active Targeting: An Update of the EPR Role in Drug Delivery to Tumors. In: Alonso MJ, Garcia-Fuentes M, editors. *Nano-Oncologicals: New Targeting and Delivery Approaches*. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 3-45.
46. Danhier F, Feron O, Pr at 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.
47. Li J, Wang Q, Xia G, Adilijiang N, Li Y, Hou Z, et al. Recent advances in targeted drug delivery strategy for enhancing oncotherapy. *Pharmaceutics*. 2023;15(9):2233.
48. Balog S, de Almeida MS, Taladriz-Blanco P, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Does the surface charge of the nanoparticles drive nanoparticle–cell membrane interactions? *Current Opinion in Biotechnology*. 2024;87:103128.
49. Yang T, Zhai J, Hu D, Yang R, Wang G, Li Y, et al. “Targeting design” of nanoparticles in tumor therapy. *Pharmaceutics*. 2022;14(9):1919.
50. Kurtz-Chalot A, Klein JP, Pourchez J, Boudard D, Bin V, Alcantara GB, et al. Adsorption at cell surface and cellular uptake of silica nanoparticles with different surface chemical functionalizations: impact on cytotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research*. 2014;16(11):2738.
51. Endo T, Nagase H, Ueda H, SHIGIHARA A, KOBAYASHI S, NAGAI T. Isolation, Purification and Characterization of Cyclomaltooctadecaose (α -Cyclodextrin), Cyclomaltonadecaose (ζ -Cyclodextrin), Cyclomaltoeicosaose (α -

Cyclodextrin) and Cyclomaltoheptaose (π -Cyclodextrin). Chemical and pharmaceutical bulletin. 1998;46(11):1840-3.

52. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar R. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *Aaps Pharmscitech*. 2005;6:E329-E57.

53. Ali NA, O'Brien Jr JM, Blum W, Byrd JC, Klisovic RB, Marcucci G, et al. Hyperglycemia in patients with acute myeloid leukemia is associated with increased hospital mortality. *Cancer*. 2007;110(1):96-102.

54. Messner M, Kurkov SV, Jansook P, Loftsson T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2010;387(1-2):199-208.

55. Chakraborty S, Rahman T. The difficulties in cancer treatment. *ecancermedicalsecience*. 2012;6.

56. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *The Lancet*. 2013;381(9880):1817-26.

57. van der Meel R, Vehmeijer LJC, Kok RJ, Storm G, van Gaal EVB. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: Current status. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013;65(10):1284-98.

58. Wang X-B, Zhou H-Y. Molecularly targeted gemcitabine-loaded nanoparticulate system towards the treatment of EGFR overexpressing lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2015;70:123-8.

59. Jambhekar SS, Breen PJ. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug discovery today*. 2016;21 2:356-62.

60. Lambert JM, Morris CQ. Antibody–drug conjugates (ADCs) for personalized treatment of solid tumors: a review. *Advances in therapy*. 2017;34:1015-35.

61. Ilangala AB, Lechanteur A, Fillet M, Piel G. Therapeutic peptides for chemotherapy: Trends and challenges for advanced delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;167:140-58.

62. KÖHLer G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.

63. Bayer V. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Seminars in Oncology Nursing*. 2019;35(5):150927.

64. Arslan FB, Ozturk K, Calis S. Antibody-mediated drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;596:120268.

65. Goodall S, Jones ML, Mahler S. Monoclonal antibody-targeted polymeric nanoparticles for cancer therapy – future prospects. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2015;90(7):1169-76.

66. Chiang C-S, Hu S-H, Liao B-J, Chang Y-C, Chen S-Y. Enhancement of cancer therapy efficacy by trastuzumab-conjugated and pH-sensitive nanocapsules with the simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014;10(1):99-107.

67. Gabriela P, Marek M. The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*. 2020;105(6):1494-506.

68. Coiffier B, Sarkozy C. Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure—what to do? *Hematology*. 2016;2016(1):366-78.

69. Song L, Chen Y, Ding J, Wu H, Zhang W, Ma M, et al. Rituximab conjugated iron oxide nanoparticles for targeted imaging and enhanced treatment against CD20-positive lymphoma. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(5):895-907.
70. Xuan W, Haiyun Z, Xiaozhuo C. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*. 2019;2(2):141-60.
71. Gadade DD, Pekamwar SS. Cyclodextrin Based Nanoparticles for Drug Delivery and Theranostics. *Adv Pharm Bull*. 2020;10(2):166-83.
72. Visani G, Isidori A. Nonpegylated liposomal doxorubicin in the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: where we stand. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2009;9(3):357-63.
73. Desai C, Prabhakar B. Development and evaluation of orally disintegrating tablets of cilostazol- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2015;41(10):1589-607.
74. Corti G, Cirri M, Maestrelli F, Mennini N, Mura P. Sustained-release matrix tablets of metformin hydrochloride in combination with triacetyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;68(2):303-9.
75. Kou W, Cai C, Xu S, Wang H, Liu J, Yang D, et al. In vitro and in vivo evaluation of novel immediate release carbamazepine tablets: Complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in the presence of HPMC. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;409(1):75-80.
76. Conceição J, Adeoye O, Cabral-Marques HM, Lobo JMS. Cyclodextrins as excipients in tablet formulations. *Drug Discovery Today*. 2018;23(6):1274-84.
77. Zelenetz AD. Guidelines for NHL: Updates to the Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma and New Guidelines for Primary Cutaneous CD30+ T-Cell Lymphoproliferative Disorders and T-Cell Large Granular Lymphocytic Leukemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12(5S):797-800.
78. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology*. 2009;115(2):155-62.
79. Flinn IW, van der Jagt R, Kahl BS, Wood P, Hawkins TE, MacDonald D, et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood*. 2014;123(19):2944-52.
80. Emadi A, Jones R, Brodsky R. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews Clinical oncology*. 2009;6:638-47.
81. Choi J, Ceribelli M, Phelan JD, Häupl B, Huang DW, Wright G, et al. Molecular Mechanism of Action of Glucocorticoids in Lymphoma Therapy. *Blood*. 2023;142(Supplement 1):2986-.
82. Iqbal A, Iqbal MK, Sharma S, Ansari MA, Najmi AK, Ali SM, et al. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sciences*. 2019;218:112-31.
83. Triarico SR, A.; Attinà, G.; Capozza, M.A.; Maurizi, P.; Mastrangelo, S.; Ruggiero, A. Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy (VIPN) in Pediatric Tumors: Mechanisms, Risk Factors, Strategies of Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2021;22.

84. Ghrenassia E, Mariotte E, Azoulay E. Rituximab-related Severe Toxicity. In: Vincent J-L, editor. Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2018. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 579-96.
85. Vinhas R, Mendes, R., Fernandes, A. R., & Baptista, P. V. Nanoparticles—emerging potential for managing leukemia and lymphoma. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2017;5(79).
86. Mourtzis N, Paravatou M, Mavridis IM, Roberts ML, Yannakopoulou K. Synthesis, Characterization, and Remarkable Biological Properties of Cyclodextrins Bearing Guanidinoalkylamino and Aminoalkylamino Groups on Their Primary Side. *Chemistry – A European Journal*. 2008;14(14):4188-200.
87. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(7):440-6.
88. Doroshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(12):4514-8.
89. Szente L, Singhal A, Domokos A, Song B. Cyclodextrins: Assessing the Impact of Cavity Size, Occupancy, and Substitutions on Cytotoxicity and Cholesterol Homeostasis. *Molecules*. 2018;23:1228.
90. Memişoğlu E, Bochet A, Özalp M, Şen M, Duchêne D, Hincal AA. Direct Formation of Nanospheres from Amphiphilic β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Pharmaceutical Research*. 2003;20(1):117-25.
91. Mansilla E, Nunez L, Marin GH, Rivera L, Macor P, Luengas SP. New advances in chronic lymphocytic leukemia treatment: Biodegradable ZnO hybrid cluster nanoparticle as antineoplastic agents. *Biomedical Applications of Nanoparticles*: Elsevier; 2019. p. 409-30.
92. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, et al. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nature Biotechnology*. 2007;25(10):1159-64.
93. 2011. Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011309_NHS_SulfoNHS_UG.pdf
94. Kushlaf HA. CHAPTER 13 - Toxic Myopathies. In: Dobbs MR, editor. *Clinical Neurotoxicology*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2009. p. 159-73.
95. Seripracharath C, Sinthuvanich C, Karpkird T. Cationic cyclodextrin-adamantane poly(vinyl alcohol)-poly(ethylene glycol) assembly for siRNA delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022;68:103052.
96. Grillo-López AJ, White CA, Varns C, Shen D, Wei A, McClure A, et al., editors. Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Seminars in oncology*; 1999.
97. Hu T, Gong H, Xu J, Huang Y, Wu F, He Z. Nanomedicines for overcoming cancer drug resistance. *Pharmaceutics*. 2022;14(8):1606.
98. Ricciuti G, Finolezzi E, Luciani S, Ranucci E, Federico M, Di Nicola M, et al. Combination of rituximab and nonpegylated liposomal doxorubicin (R-NPLD) as front-line therapy for aggressive non-Hodgkin lymphoma (NHL) in patients 80 years of age or older: a single-center retrospective study. *Hematological Oncology*. 2018;36(1):44-8.

99. Nevala WK, Butterfield JT, Sutor SL, Knauer DJ, Markovic SN. Antibody-targeted paclitaxel loaded nanoparticles for the treatment of CD20+ B-cell lymphoma. *Scientific Reports*. 2017;7(1):45682.
100. Erdoğan N, Akkin S, Nielsen T, Özçelebi E, Erdoğan B, Nemutlu E, et al. Development of oral aprepitant-loaded chitosan–polyethylene glycol-coated cyclodextrin nanocapsules: formulation, characterization, and pharmacokinetic evaluation. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2021;51.
101. Xing C, Zheng X, Deng T, Zeng L, Liu X, Chi X. The Role of Cyclodextrin in the Construction of Nanoplatforms: From Structure, Function and Application Perspectives. *Pharmaceutics*. 2023;15:1536.
102. Hedayati S, Niakousari M, Mohsenpour Z. Production of tapioca starch nanoparticles by nanoprecipitation-sonication treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;143:136-42.
103. Varan G, Akkin S, Demirtürk N, Benito JM, Bilensoy E. Erlotinib entrapped in cholesterol-depleting cyclodextrin nanoparticles shows improved antitumoral efficacy in 3D spheroid tumors of the lung and the liver. *Journal of Drug Targeting*. 2021;29(4):439-53.
104. Akkin S, Varan G, Aksüt D, Malanga M, Ercan A, Şen M, et al. A different approach to immunochemotherapy for colon Cancer: Development of nanoplexes of cyclodextrins and Interleukin-2 loaded with 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;623:121940.
105. Memisoglu-Bilensoy E, Hincal AA. Sterile, injectable cyclodextrin nanoparticles: Effects of gamma irradiation and autoclaving. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;311(1):203-8.
106. Ding Y, Nielsen KA, Nielsen BP, Bøje NW, Müller RH, Pyo SM. Lipid-drug-conjugate (LDC) solid lipid nanoparticles (SLN) for the delivery of nicotine to the oral cavity – Optimization of nicotine loading efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;128:10-7.
107. Song L ZW, Chen H, Zhang X, Wu H, Ma M, Wang Z, Gu N, Zhang Y. . Apoptosis-promoting effect of rituximab-conjugated magnetic nanoprobe on malignant lymphoma cells with CD20 overexpression. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:921-36.
108. Saqr A, Vakili MR, Huang Y-H, Lai R, Lavasanifar A. Development of Traceable Rituximab-Modified PEO-Polyester Micelles by Postinsertion of PEG-phospholipids for Targeting of B-cell Lymphoma. *ACS Omega*. 2019;4(20):18867-79.
109. Ganassin R, Merker C, Rodrigues MC, Guimarães NF, Sodr  CSC, Ferreira QdS, et al. Nanocapsules for the co-delivery of selol and doxorubicin to breast adenocarcinoma 4T1 cells in vitro. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2018;46(8):2002-12.
110. Dong X, Wang W, Qu H, Han D, Zheng J, Sun G. Targeted delivery of doxorubicin and vincristine to lymph cancer: evaluation of novel nanostructured lipid carriers in vitro and in vivo. *Drug Delivery*. 2016;23(4):1374-8.
111. Devrim B, Bozkır A, Canefe K. Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhIL-2 : I. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *Journal of Microencapsulation*. 2011;28(6):582-94.

112. Cannella V, Altomare R, Chiaramonte G, Di Bella S, Mira F, Russotto L, et al. Cytotoxicity Evaluation of Endodontic Pins on L929 Cell Line. *BioMed Research International*. 2019;2019:1-5.
113. Li H, Zhang G, Jiang C, Zhang F, Ke C, Zhao H, et al. Suppression of Rituximab-resistant B-cell lymphoma with a novel multi-component anti-CD20 mAb nanocluster. *Oncotarget*. 2015;6(27).
114. Gamze Varan VP, Gerrit Borchard, Erem Bilensoy. Cellular Interaction and Tumoral Penetration Properties of Cyclodextrin Nanoparticles on 3D Breast Tumor Model. *Nanomaterials*. 2018;8(2).
115. Nupur N, Chhabra N, Dash R, Rathore AS. Assessment of structural and functional similarity of biosimilar products: Rituximab as a case study. *mAbs*. 2018;10(1):143-58.
116. Tian B, Hua S, Liu J. Cyclodextrin-based delivery systems for chemotherapeutic anticancer drugs: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2020;232:115805.
117. López C, Vries A, Marrink S. Molecular Mechanism of Cyclodextrin Mediated Cholesterol Extraction. *PLoS computational biology*. 2011;7:e1002020.
118. Varan G, Öncül S, Ercan A, Benito JM, Ortiz Mellet C, Bilensoy E. Cholesterol-Targeted Anticancer and Apoptotic Effects of Anionic and Polycationic Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(10):3172-82.
119. Ansell SM, Arendt BK, Grote DM, Jelinek DF, Novak AJ, Wellik LE, et al. Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2004;18(3):616-23.
120. Li J, Wu H. Expression of survivin in human non-Hodgkin lymphoma and its correlation with proliferation and angiogenesis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*. 2006;26(5):504-7.
121. Ercan A, Çelebier M, Oncul S, Varan G, Kocak E, Benito JM, et al. Polycationic cyclodextrin nanoparticles induce apoptosis and affect antitumoral activity in HepG2 cell line: An evaluation at the molecular level. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;598:120379.
122. Ahn J, Lee B, Choi Y, Jin H, Lim N, Park J, et al. Non-peptidic guanidinium-functionalized silica nanoparticles as selective mitochondria-targeting drug nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*. 2018;6.
123. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Cross-Tolerance in B-Cell Lymphoma by Expanding Regulatory T Cells. *Cancer Research*. 2008;68(13):5439-49.
124. Leigh ND, Bian G, Ding X, Liu H, Aygun-Sunar S, Burdelya LG, et al. A flagellin-derived toll-like receptor 5 agonist stimulates cytotoxic lymphocyte-mediated tumor immunity. *PloS one*. 2014;9(1):e85587.
125. Shichkin VP, Moriev RM. Immunomodulatory Effects of Hemagglutinin- (HA-) Modified A20 B-Cell Lymphoma Expanded as a Brain Tumor on Adoptively Transferred HA-Specific CD4+ T Cells. *The Scientific World Journal*. 2014;2014(1):165265.
126. Friebolin H. *Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy*: John Wiley & Sons; 2010.
127. Mourtzis N, Eliadou K, Aggelidou C, Sophianopoulou V, Mavridis IM, Yannakopoulou K. Per(6-guanidino-6-deoxy)cyclodextrins: synthesis,

characterisation and binding behaviour toward selected small molecules and DNA. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2007;5(1):125-31.

128. Hargrove AE, Nieto S, Zhang T, Sessler JL, Anslyn EV. Artificial Receptors for the Recognition of Phosphorylated Molecules. *Chemical Reviews*. 2011;111(11):6603-782.

129. Rodriguez-Ruiz V, Maksimenko A, Salzano G, Lampropoulou M, Lazarou YG, Agostoni V, et al. Positively charged cyclodextrins as effective molecular transporters of active phosphorylated forms of gemcitabine into cancer cells. *Scientific Reports*. 2017;7(1):8353.

130. Murthy ASN, Das S, Singh T, Kim T-W, Sepay N, Jeon S, et al. Mitochondria targeting molecular transporters: synthesis, lipophilic effect, and ionic complex. *Drug Delivery*. 2022;29(1):270-83.

131. Fu Y, Wang X, Zhang Y, Liu Z, Xue W. Effect of cyclodextrins on the structure and functions of blood components in vitro. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 2015;30(5):541-54.

132. Irie T, Otagiri M, Sunada M, Uekama K, Ohtani Y, Yamada Y, et al. CYCLODEXTRIN-INDUCED HEMOLYSIS AND SHAPE CHANGES OF HUMAN ERYTHROCYTES IN VITRO. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*. 1982;5(9):741-4.

133. Kiss T, Fenyvesi F, Bácskay I, Váradi J, Fenyvesi E, Iványi R, et al. Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2010;40(4):376-80.

134. Róka E, Ujhelyi Z, Deli M, Bocsik A, Fenyvesi É, Sente L, et al. Evaluation of the cytotoxicity of α -cyclodextrin derivatives on the caco-2 cell line and human erythrocytes. *Molecules*. 2015;20(11):20269-85.

135. Bilensoy E, Hincal AA. Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009;6(11):1161-73.

136. Fan W, Xu Y, Li Z, Li Q. Folic acid-modified β -cyclodextrin nanoparticles as drug delivery to load DOX for liver cancer therapeutics. *Soft Materials*. 2019;17(4):437-47.

137. Mazzarino L, Loch-Neckel G, dos Santos Bubniak L, Ourique F, Otsuka I, Halila S, et al. Nanoparticles Made From Xyloglucan-Block-Polycaprolactone Copolymers: Safety Assessment for Drug Delivery. *Toxicological Sciences*. 2015;147(1):104-15.

138. Yan C, Liang N, Li Q, Yan P, Sun S. Biotin and arginine modified hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanoparticles as novel drug delivery systems for paclitaxel. *Carbohydrate Polymers*. 2019;216:129-39.

139. Wong AW, Datla A. 13 - Assay and Stability Testing. In: Ahuja S, Dong MW, editors. *Separation Science and Technology*. 6: Academic Press; 2005. p. 335-58.

140. González-González O, Ramirez IO, Ramirez BI, O'Connell P, Ballesteros MP, Torrado JJ, et al. Drug stability: ICH versus accelerated predictive stability studies. *Pharmaceutics*. 2022;14(11):2324.

141. Bilensoy E, Gürkaynak O, Ertan M, Şen M, Hincal AA. Development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2008;97(4):1519-29.

142. Çirpanli Y, Bilensoy E, Doğan AL, Çaliş S. Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;73(1):82-9.

143. Chen P, Song H, Yao S, Tu X, Su M, Zhou L. Magnetic targeted nanoparticles based on β -cyclodextrin and chitosan for hydrophobic drug delivery and a study of their mechanism. *RSC advances*. 2017;7(46):29025-34.
144. Akkın S, Varan G, Işık A, Gökşen S, Karakoç E, Malanga M, et al. Synergistic antitumor potency of a self-assembling cyclodextrin nanoplex for the co-delivery of 5-fluorouracil and interleukin-2 in the treatment of colorectal cancer. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):314.
145. Mousazadeh H, Pilehvar-Soltanahmadi Y, Dadashpour M, Zarghami N. Cyclodextrin based natural nanostructured carbohydrate polymers as effective non-viral siRNA delivery systems for cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*. 2021;330:1046-70.
146. Aiassa V, Garnero C, Zoppi A, Longhi MR. Cyclodextrins and Their Derivatives as Drug Stability Modifiers. *Pharmaceutics*. 2023;16(8):1074.
147. Hădărugă NG, Bandur GN, David I, Hădărugă DI. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Environmental Chemistry Letters*. 2019;17(1):349-73.
148. D'Aria F, Pagano B, Giancola C. Thermodynamic properties of hydroxypropyl- β -cyclodextrin/guest interaction: a survey of recent studies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2022;147(8):4889-97.
149. Lynch I, Dawson KA. Protein–nanoparticle interactions. *Nano-enabled medical applications*. 2020:231-50.
150. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of nanobiotechnology*. 2013;11:1-12.
151. Noris M, Remuzzi G, editors. *Overview of complement activation and regulation*. *Seminars in nephrology*; 2013: Elsevier.
152. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*. 2010;20(1):34-50.
153. Özdemir Ö. Kompleman Sistemi ve Hastalıkları. *Batı Karadeniz Tıp Dergisi*. 2023;7(2):103-11.
154. Maffre P, Brandholt S, Nienhaus K, Shang L, Parak WJ, Nienhaus GU. Effects of surface functionalization on the adsorption of human serum albumin onto nanoparticles—a fluorescence correlation spectroscopy study. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2014;5(1):2036-47.
155. Pearson RM, Juettner VV, Hong S. Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery. *Frontiers in chemistry*. 2014;2:108.
156. Wibroe PP, Anselmo AC, Nilsson PH, Sarode A, Gupta V, Urbanics R, et al. Bypassing adverse injection reactions to nanoparticles through shape modification and attachment to erythrocytes. *Nature nanotechnology*. 2017;12(6):589-94.
157. Wani TU, Raza SN, Khan NA. Nanoparticle opsonization: forces involved and protection by long chain polymers. *Polymer Bulletin*. 2020;77(7):3865-89.
158. Hu Q-D, Tang G-P, Chu PK. Cyclodextrin-based host–guest supramolecular nanoparticles for delivery: from design to applications. *Accounts of chemical research*. 2014;47(7):2017-25.
159. Weiner GJ. Rituximab: Mechanism of Action. *Seminars in Hematology*. 2010;47(2):115-23.

160. Haley RM, Gottardi R, Langer R, Mitchell MJ. Cyclodextrins in drug delivery: applications in gene and combination therapy. *Drug Delivery and Translational Research*. 2020;10(3):661-77.
161. Rajput Y, Sharma R. SDS-PAGE–Principle and Applications. *Chemical Analysis of Value Added Dairy Products and Their Quality Assurance*. 2011:81.
162. Bhatt M, Rai V, Kumar A, Kiran, Yadav AK, Rajak KK, et al. SDS-PAGE and Western blotting: Basic principles and protocol. *Protocols for the Diagnosis of Pig Viral Diseases*: Springer; 2022. p. 313-28.
163. Elamin KM, Motoyama K, Higashi T, Yamashita Y, Tokuda A, Arima H. Dual targeting system by supramolecular complex of folate-conjugated methyl- β -cyclodextrin with adamantane-grafted hyaluronic acid for the treatment of colorectal cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;113:386-94.
164. Sakai A, Yamashita Y, Misumi S, Kishimoto N, Onodera R, Higashi T, et al. Nanoparticles of folic acid-methyl- β -cyclodextrin (FA-M β CD)/adamantane-albumin exhibit enhanced antitumor activity compared with FA-M β CD alone. *FEBS Open Bio*. 2023;13(2):233-45.
165. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*. 2009;26:1025-58.
166. Chavda VP. Nanobased nano drug delivery: a comprehensive review. *Applications of targeted nano drugs and delivery systems*. 2019:69-92.
167. Rivas CJM, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2017;532(1):66-81.
168. Şenol Y, Kaplan O, Varan C, Demirtürk N, Öncül S, Fidan BB, et al. Pharmacometabolomic assessment of vitamin E loaded human serum albumin nanoparticles on HepG2 cancer cell lines. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;79:104017.
169. Berne BJ, Pecora R. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*: Courier Corporation; 2000.
170. Galindo-Rodriguez S, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical research*. 2004;21:1428-39.
171. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2002;19(2).
172. Ünal S, Aktaş Y, Benito JM, Bilensoy E. Cyclodextrin nanoparticle bound oral camptothecin for colorectal cancer: Formulation development and optimization. *International journal of pharmaceutics*. 2020;584:119468.
173. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential–what they are and what they are not? *Journal of controlled release*. 2016;235:337-51.
174. Instruments M. *Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes*. Technical note. Malvern: Malvern Instruments; 2012.
175. Bilensoy E. Cationic nanoparticles for cancer therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010;7(7):795-809.
176. Phan HT, Haes AJ. What does nanoparticle stability mean? *The Journal of Physical Chemistry C*. 2019;123(27):16495-507.
177. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Lyman CE, Lifshin E, et al. *Special topics in scanning electron microscopy*. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis: Third Edition*. 2003:195-270.

178. Dubes A, Parrot-Lopez H, Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H, Shahgaldian P, et al. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*. 2003;55(3):279-82.
179. Chauhan A, Jindal T, Chauhan A, Jindal T. Methods of sterilization and disinfection. *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*. 2020:67-72.
180. Zielińska A, Soles BB, Lopes AR, Vaz BF, Rodrigues CM, Alves TF, et al. Nanopharmaceuticals for eye administration: Sterilization, depyrogenation and clinical applications. *Biology*. 2020;9(10):336.
181. Bernal-Chávez SA, Del Prado-Audelo ML, Caballero-Florán IH, Giraldo-Gomez DM, Figueroa-Gonzalez G, Reyes-Hernandez OD, et al. Insights into terminal sterilization processes of nanoparticles for biomedical applications. *Molecules*. 2021;26(7):2068.
182. Masson V, Maurin F, Fessi H, Devissaguet J. Influence of sterilization processes on poly (ϵ -caprolactone) nanospheres. *Biomaterials*. 1997;18(4):327-35.
183. Bhatt P, Lalani R, Vhora I, Patil S, Amrutiya J, Misra A, et al. Liposomes encapsulating native and cyclodextrin enclosed paclitaxel: Enhanced loading efficiency and its pharmacokinetic evaluation. *International journal of pharmaceuticals*. 2018;536(1):95-107.
184. Jingou J, Shilei H, Weiqi L, Danjun W, Tengfei W, Yi X. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;83(1):103-7.
185. Çobanoğlu E, ŞENEL S. An Overview of In Vitro Release Test Methods Used In The Study of Nanoparticulate Drug Delivery Systems Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerinin İncelenmesinde Kullanılan İn Vitro Salım Testi Yöntemlerine Genel Bir Bakış. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*. 2023;43(1).
186. Shen J, Burgess DJ. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges. *Drug delivery and translational research*. 2013;3:409-15.
187. Zeb A, Gul M, Nguyen T-T-L, Maeng H-J. Controlled release and targeted drug delivery with poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: reviewing two decades of research. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2022;52(6):683-724.
188. Espanol L, Larrea A, Andreu V, Mendoza G, Arruebo M, Sebastian V, et al. Dual encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs in PLGA nanoparticles by a single-step method: drug delivery and cytotoxicity assays. *RSC advances*. 2016;6(112):111060-9.
189. Patel J, Amrutiya J, Bhatt P, Javia A, Jain M, Misra A. Targeted delivery of monoclonal antibody conjugated docetaxel loaded PLGA nanoparticles into EGFR overexpressed lung tumour cells. *Journal of Microencapsulation*. 2018;35(2):204-17.
190. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceuticals*. 2010;385(1-2):113-42.
191. Breunig M, Lungwitz U, Klar J, Kurtz A, Blunk T, Goepferich A. Polyplexes of polyethylenimine and per-N-methylated polyethylenimine-cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2004;4(5):512-20.

192. Marques AC, Costa PC, Velho S, Amaral MH. Analytical Techniques for Characterizing Tumor-Targeted Antibody-Functionalized Nanoparticles. *Life*. 2024;14(4):489.
193. Cavaco MC, Pereira C, Kreutzer B, Gouveia LF, Silva-Lima B, Brito AM, et al. Evading P-glycoprotein mediated-efflux chemoresistance using Solid Lipid Nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2017;110:76-84.
194. Peng J, Chen J, Xie F, Bao W, Xu H, Wang H, et al. Herceptin-conjugated paclitaxel loaded PCL-PEG worm-like nanocrystal micelles for the combinatorial treatment of HER2-positive breast cancer. *Biomaterials*. 2019;222:119420.
195. Miles AJ, Janes RW, Wallace BA. Tools and methods for circular dichroism spectroscopy of proteins: a tutorial review. *Chemical Society Reviews*. 2021;50(15):8400-13.
196. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, et al. Anti-CD47 Antibody Synergizes with Rituximab to Promote Phagocytosis and Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma. *Cell*. 2010;142(5):699-713.
197. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.
198. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008;19(2):73-8.
199. Kumar G, Degheidy H, Casey BJ, Goering PL. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. *Food and chemical toxicology*. 2015;85:45-51.
200. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 2020;1(3):332-49.
201. Singh SK, Pokalwar S, Bose S, Gupta S, Almal S, Ranbhor RS. Structural and functional comparability study of anti-CD20 monoclonal antibody with reference product. *Biologics: Targets and Therapy*. 2018;12(null):159-70.
202. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2018 2018/06//; 2018(6). Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/29858337>
- <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>.
203. Fasano M, Della Corte CM, Di Liello R, Barra G, Sparano F, Viscardi G, et al. Induction of natural killer antibody-dependent cell cytotoxicity and of clinical activity of cetuximab plus avelumab in non-small cell lung cancer. *ESMO Open*. 2020;5(5).
204. Szlasa W, Zendran I, Zalesińska A, Tarek M, Kulbacka J. Lipid composition of the cancer cell membrane. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2020;52(5):321-42.
205. Wang Za, Wang Y, Li Z, Xue W, Hu S, Kong X. Lipid metabolism as a target for cancer drug resistance: progress and prospects. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14.
206. Lei Z-N, Tian Q, Teng Q-X, Wurlpel JND, Zeng L, Pan Y, et al. Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm*. 2023;4(3):e265.
207. Kesharwani P, Sheikh A, Abourehab MAS, Salve R, Gajbhiye V. A combinatorial delivery of survivin targeted siRNA using cancer selective nanoparticles for triple negative breast cancer therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;80:104164.

208. Peetla C, Vijayaraghavalu S, Labhasetwar V. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(13-14):1686-98.
209. Sharma A, Virmani T, Kumar G, Sharma A, Virmani R, Gugulothu D, et al. Mitochondrial signaling pathways and their role in cancer drug resistance. *Cellular Signalling*. 2024;122:111329.
210. Jeena MT, Kim S, Jin S, Ryu JH. Recent Progress in Mitochondria-Targeted Drug and Drug-Free Agents for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2019;12(1).
211. Kroemer G. Mitochondria in cancer. *Oncogene*. 2006;25(34):4630-2.
212. Wisnovsky S, Lei Eric K, Jean Sae R, Kelley Shana O. Mitochondrial Chemical Biology: New Probes Elucidate the Secrets of the Powerhouse of the Cell. *Cell Chemical Biology*. 2016;23(8):917-27.
213. Murphy MP, Smith RAJ. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007;47(Volume 47, 2007):629-56.
214. Li Q, Huang Y. Mitochondrial targeted strategies and their application for cancer and other diseases treatment. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2020;50(3):271-93.
215. Wang H, Gao Z, Liu X, Agarwal P, Zhao S, Conroy DW, et al. Targeted production of reactive oxygen species in mitochondria to overcome cancer drug resistance. *Nature Communications*. 2018;9(1):562.
216. Ahn J, Lee B, Choi Y, Jin H, Lim NY, Park J, et al. Non-peptidic guanidinium-functionalized silica nanoparticles as selective mitochondria-targeting drug nanocarriers. *Journal of Materials Chemistry B*. 2018;6(36):5698-707.
217. Amin ML. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights*. 2013;7(1).
218. Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays in Biochemistry*. 2011;50:161-78.
219. Matsuo H, Wakasugi M, Takanaga H, Ohtani H, Naito M, Tsuruo T, et al. Possibility of the reversal of multidrug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK-16, a monoclonal antibody to P-glycoprotein. *Journal of Controlled Release*. 2001;77(1):77-86.
220. Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon AA. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6 5:1949-57.
221. Malmö J, Sandvig A, Vårum KM, Strand SP. Nanoparticle mediated P-glycoprotein silencing for improved drug delivery across the blood-brain barrier: a siRNA-chitosan approach. *PloS one*. 2013;8(1):e54182.
222. Pawar CS, Rajendra Prasad N, Yadav P, Muthu Vijayan Enoch IV, Manikantan V, Dey B, et al. Enhanced delivery of quercetin and doxorubicin using β -cyclodextrin polymer to overcome P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023;635:122763.
223. Abuwatfa WH, Pitt WG, Hussein GA. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. *Journal of Biomedical Science*. 2024;31(1):7.
224. Foxall R, Narang P, Glaysher B, Hub E, Teal E, Coles M, et al. Developing a 3D B Cell Lymphoma Culture System to Model Antibody Therapy. *Frontiers in Immunology*. 2021;11.

225. van Beek JHDA, de Moor MHM, de Geus EJC, Lubke GH, Vink JM, Willemsen G, et al. The Genetic Architecture of Liver Enzyme Levels: GGT, ALT and AST. *Behavior Genetics*. 2013;43(4):329-39.
226. Das SK, Sen K, Ghosh B, Ghosh N, Sinha K, Sil PC. Molecular mechanism of nanomaterials induced liver injury: A review. *World Journal of Hepatology*. 2024;16(4):566.
227. Abdelhalim MAK, Abdelmottaleb Moussa SA. The gold nanoparticle size and exposure duration effect on the liver and kidney function of rats: In vivo. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2013;20(2):177-81.
228. Kadam RS, Bourne DWA, Kompella UB. Nano-Advantage in Enhanced Drug Delivery with Biodegradable Nanoparticles: Contribution of Reduced Clearance. *Drug Metabolism and Disposition*. 2012;40(7):1380.
229. Wang T, Zhang D, Sun D, Gu J. Current status of in vivo bioanalysis of nano drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020;10(3):221-32.
230. Thomas SN, French D, Jannetto PJ, Rappold BA, Clarke WA. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nature Reviews Methods Primers*. 2022;2(1):96.
231. Gilkey M, Krishnan V, Scheetz L, Jia X, Rajasekaran A, Dhurjati P. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Fluorescently Labeled Block Copolymer Nanoparticles for Controlled Drug Delivery in Leukemia Therapy. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*. 2015;4(3):167-74.
232. Li Z, Zheng W, Wang H, Cheng Y, Fang Y, Wu F, et al. Application of Animal Models in Cancer Research: Recent Progress and Future Prospects. *Cancer Management and Research*. 2021;13:2455-75.
233. Wu W, Li Y, Wu X, Liang J, You W, He X, et al. Carnosic acid nanocluster-based framework combined with PD-1 inhibitors impeded tumorigenesis and enhanced immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *Functional & Integrative Genomics*. 2024;24(1):5.
234. Bascuas T, Moreno M, Mónaco A, Reyes L, Paolino A, Oliver P, et al. A novel non-Hodgkin lymphoma murine model closer to the standard clinical scenario. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14(1):323.
235. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine*. 2000;6(4):443-6.
236. Voltan R, Secchiero P, Ruozi B, Forni F, Agostinis C, Caruso L, et al. Nanoparticles Engineered with Rituximab and Loaded with Nutlin-3 Show Promising Therapeutic Activity in B-Leukemic Xenografts. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(14):3871-80.
237. Moscalu M, Moscalu R, Dascălu CG, Țarcă V, Cojocaru E, Costin IM, et al. Histopathological Images Analysis and Predictive Modeling Implemented in Digital Pathology—Current Affairs and Perspectives. *Diagnostics*. 2023;13(14):2379.
238. Plichta JK, Thomas SM, Vernon R, Fayanju OM, Rosenberger LH, Hyslop T, et al. Breast cancer tumor histopathology, stage at presentation, and treatment in the extremes of age. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2020;180(1):227-35.
239. Erdoğan N, Esendağlı G, Nielsen TT, Esendağlı-Yılmaz G, Yöyen-Ermiş D, Erdoğan B, et al. Therapeutic efficacy of folate receptor-targeted amphiphilic cyclodextrin nanoparticles as a novel vehicle for paclitaxel delivery in breast cancer. *Journal of Drug Targeting*. 2018;26(1):66-74.

240. Chen J, Li Z, Han Z, Kang D, Ma J, Yi Y, et al. Prognostic value of tumor necrosis based on the evaluation of frequency in invasive breast cancer. *BMC Cancer*. 2023;23(1):530.
241. Imodoye SO, Adedokun KA, Bello IO. From complexity to clarity: unravelling tumor heterogeneity through the lens of tumor microenvironment for innovative cancer therapy. *Histochemistry and Cell Biology*. 2024;161(4):299-323.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni

EK-2: Turnitin Dijital Makbuz

EK-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

EK-4: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-27

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 23.02.2021 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2021/02
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2020/57 (ONAY TARİHİ: 25.11.2020)
KARAR NUMARASI	: 2021/02- 12
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 25.11.2025
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Erem BİLENSOY
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI, Dr. Gamze VARAN,
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Ecz. Nurbanu DEMİRTÜRK (Doktora Tezi)
DİĞER YARDIMCI	: Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN, Prof. Dr. İbrahim
ARAŞTIRMACILAR	: BARIŞTA, Prof. Dr. Ali VARAN, Dr. Öğr. Üyesi
	Sadık KAĞA
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 156 Adet Balb/c Fare (7-8 Hafta)

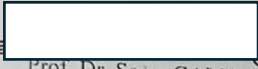


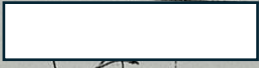
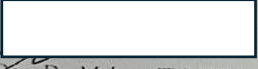

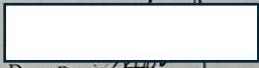

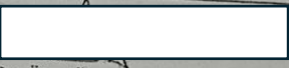
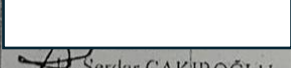

Kurulumuzun 25.11.2020 tarihli toplantısında 2020/57 kayıt numarası ile onaylanmış olan Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Erem BİLENSOY'un araştırma yürütücüsü olduğu "Non-Hodgkin Lenfoma Tedavisinde İlaç Direncini Yenmek Amacıyla Aktif Hedeflendirilmiş, Çoklu İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Geliştirilmesi ve in vitro-in vivo Etkinlik ve Güvenliliğinin Değerlendirilmesi" başlıklı proje için verilen 08.02.2021 tarihli dilekçe Kurulumuzun 23.02.2021 tarihli toplantısında görüşülmüş ve uygun bulunmuştur. Proje ekibine doktora tezi öğrencisi Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Ecz. Nurbanu DEMİRTÜRK hayvan deneylerinde görevli araştırmacı olarak dahil edilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Kurul Üyesi Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI çıkar çatışması nedeniyle tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ VE SAATI : 23.02.2021 (SALI)
TOPLANTI SAATI : 15:00
TOPLANTI SAYISI : 2021/02
PROJE NUMARASI : 2020/57 (ONAY TARİHİ: 25.11.2020)
KARAR NUMARASI : 2021/02-12

 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	 Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Üye)	 Prof. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)
(KATILMADI) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	 Prof. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)
 Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)	 Doç. Dr. Güray SOYDAN (Üye)	 Doç. Dr. H. ÜNBAŞILAR (Üye)
(İZİNLİ) Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)	 Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)	 Dr. Öğr. Üyesi Esin Akbay ÇETİN (Üye)
(İZİNLİ) Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	 Dr. Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	 Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-424

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 23 ŞUBAT 2021 SALI
Toplantı No : 2021/04
Proje No : GO 21/40(Onay Tarihi: 05.01.2021)
Karar No : 2021/04-10

Kurulumuzun 05.01.2021 tarihli toplantısında GO 21/40 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Erem BILENSOY'un sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. İbrahim BARIŞTA, Prof. Dr. Ali VARAN, Dr. Gamze VARAN ile birlikte çalışacakları, GO 21/40 kayıt numaralı, "*Non-Hodgkin Lenfoma Tedavisinde İlaç Direncini Yenmek Amacıyla Aktif Hedeflendirilmiş, Çoklu İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Geliştirilmesi ve İn-vitro-İn-vivo Etkinlik ve Güvenliliğinin Değerlendirilmesi*" başlıklı proje için vermiş olduğunuz 08.02.2021 tarihli araştırmacı eklenmesi ve araştırmanın niteliği ile ilgili dilekçe talebiniz Kurulumuzun 23.02.2021 tarihli toplantısında görüşülmüş ve çalışmanın bireysel araştırma projesi kapsamından çıkarılarak Ecz. Nurbanu DEMİRTÜRK'ün doktora tezi kapsamına alınması uygun bulunmuştur. Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarından Ecz. Nurbanu DEMİRTÜRK çalışmaya yardımcı araştırmacı olarak dahil edilmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

- | | | | |
|------------------------------|--------|---------------------------------|-------------|
| 1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN | Başkan | 7. Doç. Dr. [Redacted] | AYDAR (Üye) |
| 2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN | (Üye) | 8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK | [Redacted] |
| 3. Prof. Dr. M. Özgür UYANLI | (Üye) | 9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ | [Redacted] |
| 4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER | (Üye) | 10. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR | [Redacted] |
| İZİNLI | | 11. Av. Serap MORALIOĞLU | [Redacted] |
| 5. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN | (Üye) | | |
| 6. Doç. Dr. Can Ebru KURT | (Üye) | | |

EK-2: Turnitin Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: nurbanu demirtürk
Ödev başlığı: nurbanu demirtürk tez
Gönderi Başlığı: nurbanu demirtürk tez
Dosya adı: Turtinin_nurbanu.docx
Dosya boyutu: 9.26M
Sayfa sayısı: 136
Kelime sayısı: 26,463
Karakter sayısı: 188,671
Gönderim Tarihi: 01-Kas-2024 11:01ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2504753870



EK-3: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

nurbanu demirtürk tez

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 8	% 5	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 5
2	Nurbanu Demirtürk, Gamze Varan, Sadık Kağa, Milo Malanga, Erem Bilensoy. "Optimization and characterization of Rituximab targeted multidrug loaded cyclodextrin nanoparticles against Non-Hodgkin Lymphoma", International Journal of Pharmaceutics, 2024 Yayın	% 1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	Leo M.L. Nollet. "Handbook of Food Analysis - Volume 1: Physical Characterization and Nutrient Analysis", CRC Press, 2019 Yayın	<% 1
5	www.offa-journal.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Firat Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1

EK-4: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

589/5804



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



hadmek | Hayvan Deneyleri
Merkezi Etik
Kurulu

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Sayın NURBANU DEMİRTÜRK

06.03.2019 - 22.03.2019 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlinde düzenlenen “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. SEMA ÇALIŞ
HADYEK BAŞKANI

Prof. Dr. Haluk ÖZEN
Rektör



EK-5: Tez İle İlgili Yayın

International Journal of Pharmaceutics 662 (2024) 124488



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Optimization and characterization of Rituximab targeted multidrug loaded cyclodextrin nanoparticles against Non-Hodgkin Lymphoma

Nurbanu Demirtürk^{a,*}, Gamze Varan^b, Sadık Kağa^c, Milo Malanga^d, Erem Bilensoy^a^a Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey^b Department of Vaccine Technology, Vaccine Institute, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey^c Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Afyon Kocatepe University, 03300 Afyon, Turkey^d CarboHyde Zrt., Berlin u. 47-49, 1045 Budapest, Hungary

ARTICLE INFO

Keywords:

Non-Hodgkin Lymphoma
Cyclodextrin
Monoclonal antibody
Nanomedicine
Active targeting
Drug resistance

ABSTRACT

Currently, Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) constitutes 85–90 % of all lymphomas. Clinical treatment of NHL is based on the “4-drug regimen” known as CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone). Rituximab (RTX) is added to increase the effectiveness and selectivity of the treatment and is the first-line standard treatment for NHL patients. However, success is often prevented by the development of drug resistance. In this study, it was aimed to overcome drug resistance by using two novel tumor-targeted derivatives: guanidine-amphiphilic cyclodextrin (ACD) and guanidine-cyclodextrin polymer (PCD) nanoparticles (NP). These constructs display promise in overcoming drug resistance and enhancing the effectiveness of R-CHOP treatment while potentially eliminating the need for corticosteroid. NP were found to be smaller than 200 nm by dynamic light scattering (DLS). Hemolytic activity and cytotoxicity data on L929 cells demonstrated the safety of the newly synthesized CD derivatives. Additional *in vitro* characterization studies, including surface charge, physical stability, drug loading capacity, drug release profile, and imaging, as well as conventional and 3D cell culture studies were carried out. Compared to drug solutions, the viability of Daudi human lymphoma cells was statistically significantly decreased in both drug-loaded ACD and PCD NP formulations ($p < 0.05$). Additionally, RTX-conjugated and drug-loaded ACD NPs exhibited the lowest cell viability due to RTX dependent cytotoxicity.

1. Introduction

Lymphoma is a type of cancer arising from lymphocytes in the lymph nodes and other tissues in the lymphatic system and may originate and/or be involved in the organs where the lymph tissue is located (Lymphoma Research Foundation, 2018). NHL is one of the most common cancers in the United States, accounting for about 4 % of all cancers. The American Cancer Society estimates that 80.620 people will be diagnosed with NHL in 2024, including approximately 44,590 men and 36,030 women (American Cancer Society, 2020). Overall, nearly 50 % of patients with NHL can be treated. Most relapses occur within the first 2 years after treatment. While indolent NHL responds to

immunotherapy, radiation therapy and chemotherapy, a persistent recurrence is often observed in the advanced stages. The probability of recurrence after treatment is higher in patients who present with a diagnosis of aggressive NHL or who develop into these forms. Clinical remission is observed in many patients. However, approximately 30 % to 40 % of patients who fail initial therapy due to primary resistance (~15 %) or relapse (~25 %) have a poor prognosis (Juskevicius et al., 2017).

In the management of NHL, chemotherapy basically uses a 4-drug regimen known as CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone). In this treatment regimen, corticosteroids are given orally along with three different anticancer drugs administered

Abbreviations: NHL, Non-Hodgkin lymphoma; CD, Cyclodextrin; Gua-CD, Guanidine-cyclodextrin; ACD, Guanidine-amphiphilic cyclodextrin; PCD, Guanidine-cyclodextrin polymer; RTX, Rituximab; DOX, Doxorubicin; VRC, Vincristine; CYC, Cyclophosphamide; R-CHOP, Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone; NP, Nanoparticle; MW, Molecular weight; MWCO, Molecular weight cut-off; PS, Mean particle size; PDI, Polydispersity index; ZP, Zeta potential; PBS, Phosphate buffered saline; FBS, Fetal bovine serum; LDH, Lactate dehydrogenase; DMF, *N,N*-dimethylformamide; SDS-PAGE, Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

* Corresponding author.

E-mail address: eremino@hacettepe.edu.tr (N. Demirtürk).<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124488>

Received 6 May 2024; Received in revised form 16 July 2024; Accepted 17 July 2024

Available online 18 July 2024

0378-5173/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

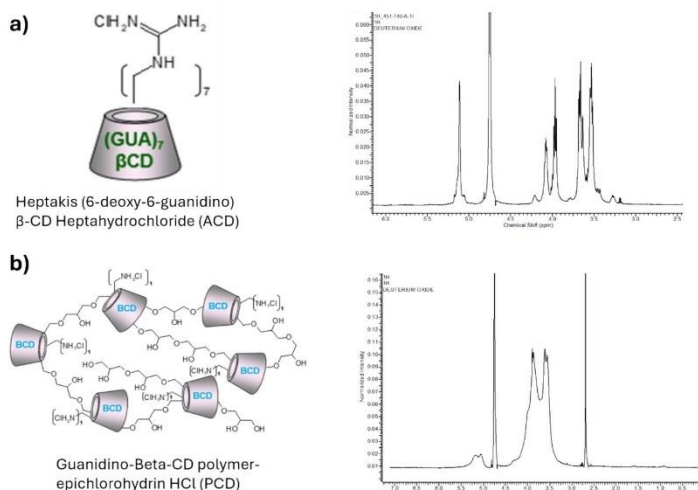


Fig. 1. CD derivatives that are used for preparing nanoparticles. PCD consists approximately 15–16 units of ACD. a) Structure and NMR result of ACD b) Structure and NMR result of PCD.

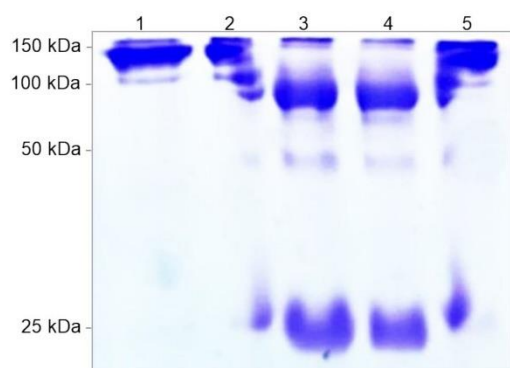


Fig. 2. Adamantane-mAb conjugate SDS PAGE analysis. Sample 1 (NHS activated adamantane (0.09 mg/mL), 1 mg/mL mAb, 20 % DMF), Sample 2 (NHS activated adamantane (0.09 mg/mL), 1 mg/mL mAb, 20 % DMF 5 % glycerol), Sample 3 (NHS activated adamantane (0.09 mg/mL), 1 mg/mL mAb, 20 % DMF, 20 mM 2-mercaptoethanol), Sample 4 (NHS activated adamantane (0.09 mg/mL), 1 mg/mL mAb, 20 % DMF 5 % glycerol, 20 mM 2-mercaptoethanol), Sample 5 (1 mg/mL mAb (PBS)).

intravenously. In addition, R-CHOP, in which the monoclonal antibody RTX is included in the treatment to increase the effectiveness of the treatment, is currently used as the first-line standard treatment for NHL patients (Crockett et al., 2018). RTX is an anti-CD20 monoclonal antibody that has proven its effectiveness in patients with various lymphoid malignancies and is used especially in the treatment of NHL derived from B cells overexpressing CD20 antigen (Plosker et al., 2003) and causes B cell death through different early and long-term mechanisms, such as antibody-dependent cellular cytotoxicity, direct cross-linking of CD20, complement-dependent cytotoxicity, and opsonization-induced phagocytosis. RTX was approved by the FDA in 1997 for the treatment of B-cell-derived NHL, as the first monoclonal antibody approved for use in cancer treatment (Ghennassia et al., 2018). CD20 was discovered in

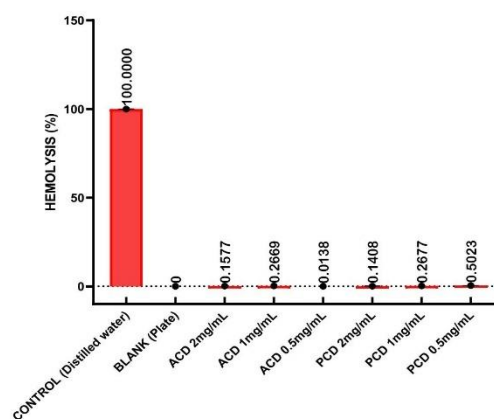


Fig. 3. Hemolysis values of blank ACD and PCD at different concentrations after 30 min incubation ($n = 3 \pm SD$).

1980 as the first specific B cell marker. It is a nonglycosylated tetraspanin of the membrane-spanning 4-A family with two extracellular loops containing epitopes for anti-CD20 antibodies such as RTX (Marshall et al., 2017). Unfortunately, drug resistance encountered in cancer treatment brings with it the failure of the treatment. Drug resistance and the resulting ineffectiveness of drug therapy are known to be responsible for 90 % of cancer-related deaths (Wang et al., 2019). One of anticancer drugs that is using for the treatment, DOX is a chemotherapeutic belonging to the anthracycline group and is effective in the treatment of hematological cancers such as NHL. However, multiple recurrences are still a common problem in NHL patients, and cardiotoxicity may occur in these patients due to the cumulative dose of DOX during salvage therapy. This is the most important dose-limiting parameter in DOX treatment and causes irreversible damage (Visani and Isidori, 2009). VRC, another anticancer drug in the R-CHOP

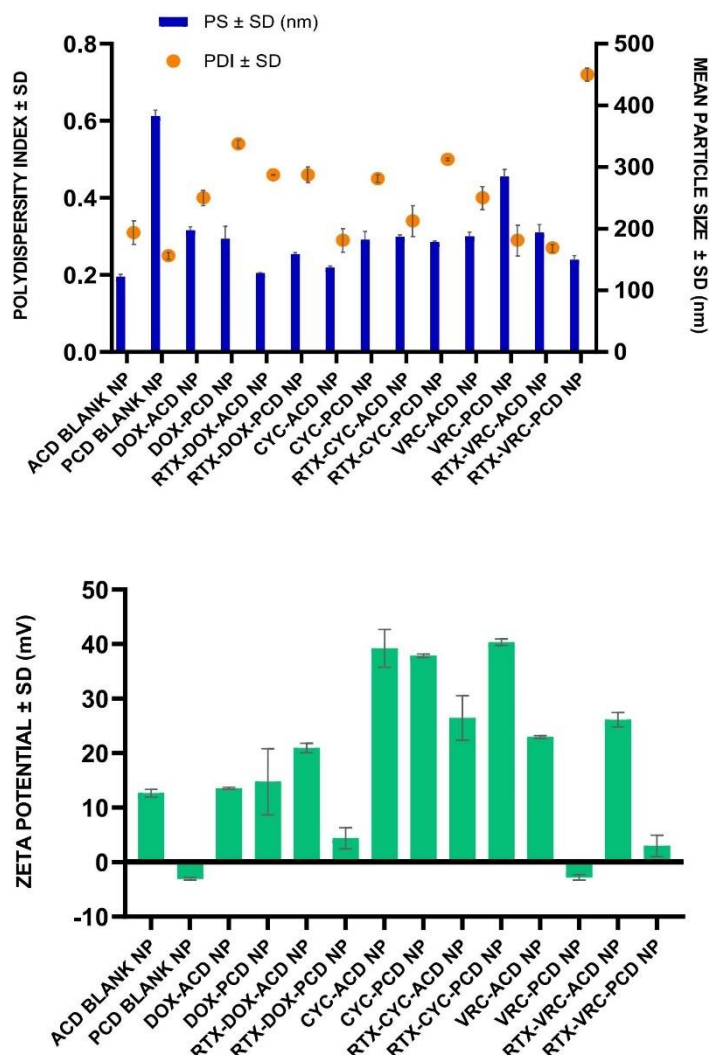


Fig. 4. Mean particle size (PS), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ZP) results of NPs ($n = 3 \pm SD$).

treatment regimen, is a plant-derived anticancer molecule belonging to the vinca alkaloids class. VRC has low oral bioavailability and is therefore formulated for intravenous administration as VRC sulfate, but it has serious side effects due to its vesicant properties (Mora et al., 2016). The third anticancer drug used in R-CHOP is CYC, is an inactive prodrug that requires enzymatic and chemical activation. In combination with other antineoplastic agents, it is used to treat a variety of cancers, including breast, lymphoid, and pediatric malignancies. The most common side effects in the clinic include bone marrow suppression, cardiac and gonadal toxicity, hemorrhagic cystitis and carcinogenesis, and the cumulative dose is the main risk factor (Emadi et al., 2009; Iqbal et al., 2019). Prednisone, which is clinically used together with anticancer drugs in the R-CHOP regimen in the treatment of NHL, is a member of

the steroid hormone class called glucocorticoids, and the main purpose of using in this treatment is to reduce nausea, pain, anorexia and other side effects seen in chemotherapy, in addition to its anticancer activity. Although it is used in many therapeutic settings, it has many side effects such as weight gain, immunosuppression, and osteoporosis (Lamar, 2016). Various approaches are being developed to increase treatment success by reducing the side effects of other drugs used in treatment. The most current approach is the development of NP drug delivery systems for NHL treatment (Demirtürk and Bilensoy, 2022). Drug delivery systems can reach to the targeted area by two mechanisms. One of them is passive targeting, ensures that drug delivery systems remain in the blood for a long time and accumulate in pathological areas (tumors, inflammations and infarcted areas) where the vascular structure is

Table 1
The loading efficiency (%) of ACD and PCD NPs.

Nanoparticles	Loading Efficiency % of Anticancer Drug	Loading Efficiency % of RTX
DOX-ACD NP	60,3	–
RTX-DOX-ACD NP	83,6	99,4
VRC-ACD NP	73,7	–
RTX-VRC-ACD NP	74,7	92,7
CYC-ACD NP	56,4	–
RTX-CYC-ACD NP	58,7	94,7
DOX-PCD NP	62,1	–
RTX-DOX-PCD NP	46,5	94,1
CYC-PCD NP	65,2	–
RTX-CYC-PCD NP	59,5	91,9
VRC-PCD NP	91,8	–
RTX-VRC-PCD NP	85,2	101,4

affected and leaky, thanks to the increased permeability and retention (EPR) effect. Second one is active targeting strategy, is the specific targeting of specific ligand-modified drug carriers to the necessary pathological areas in the body, facilitating targeted delivery to hard-to-reach areas (Torchilin, 2010).

Cyclodextrins (CDs) are rings of sugar molecules formed through the enzymatic digestion of starch. The α -, β -, and γ -CDs consist of 6, 7, and 8 glucopyranose units, respectively, with primary and secondary hydroxyl groups situated on the narrower and wider edges of a cone-shaped structure that has been truncated (Varan et al., 2017). In our study, amphiphilic monomeric or polymeric β -CD derivatives containing guanidino groups in their structure were used to improve the R-CHOP treatment, which is currently applied in the clinic but has limitations, in the form of a nanosized drug delivery system. The objective was to deliver NHL chemotherapy while reducing or eliminating its side effects and negating the requirement for corticosteroid usage during treatment. This nanosystem was engineered to target mitochondria and enhance cellular uptake through the guanidino groups installed onto the CD units. Moreover, NPs were tailored to specifically target cancerous B cells by incorporating RTX. Thus, a comprehensive study was conducted focusing on the application of nanotechnology in the clinic with a realistic approach, which allowed for a clear evaluation of the advantages and potential challenges of applying the currently used treatment in the form of nanomedicine (Song et al., 2017). The optimization and thorough characterization of these actively targeted CD NPs for NHL treatment have paved the way for further pre-clinical studies in the disease model and will also enlighten the pharmacokinetic properties of this nanosystem in future studies.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Amphiphilic guanidino- β -CD (Heptakis (6-deoxy-6-guanidino) β -CD Heptahydrochloride) (ACD) (MW: 1677,6 g/mol) and polymeric guanidino- β -CD (guanidino- β CD polymer cross-linked with epichlorohydrin HCl) (PCD) (MW: 26.000 g/mol) were synthesized and characterized at CycloLab R&D Laboratory (Hungary). DOX, VRC and CYC were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) and EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide hydrochloride) were purchased from Thermo Scientific™. Active targeting of CD derivatives was achieved via host-guest complexation with CD20 protein-specific Rituximab conjugated to adamantane. Dialysis tubing cellulose membrane (avg. flat width 25 mm, MWCO: 5000 Da) was obtained from Sigma & Aldrich (Germany). Mouse IL-2 ELISA detection kit (E-ELM0042) was purchased from Elabscience (China). L929 mouse fibroblast and Daudi human lymphoma cell lines (CCL-213™, non-resistant, B lymphoblast) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit (K311-400) was purchased from

Biovision (USA). Ultrapure water was obtained from Millipore Simplicity 185 Ultrapure Water System (Millipore, France). All other chemicals used were of analytical grade and obtained from Sigma & Aldrich (Germany).

2.2. Hemolysis assay

As a preliminary screening for assessing the safety of the Gua-CD derivatives (Fig. 1), the hemolytic properties of the compounds on erythrocytes were determined. For this purpose, blood samples taken from healthy volunteers, with the approval of the Hacettepe University Non-invasive Clinical Research Ethics Committee, were centrifuged at 5000 rpm in citrate tubes. After centrifugation, precipitated erythrocytes were separated and washed with phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4). Then, Gua-CD derivatives were dissolved in PBS at different concentrations (2 mg/mL, 1 mg/mL and 0.5 mg/mL), including the concentration to be used in NP preparation. Erythrocyte suspension (50 μ L) was added to the prepared Gua-CD solutions (1 mL) and mixed. Then, the samples were incubated in a 37 °C water bath for 30 min and then samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The collected supernatants were assayed spectrophotometrically at 543 nm for hemoglobin content. Since the sample treated with distilled water underwent total hemolysis (100 %), in the equation given below, the % hemolysis values of the samples were determined as a function of the UV absorbance of the total hemolyzed sample (Szente et al., 2018; Memişoğlu et al., 2003).

2.3. Preparation of targeted cyclodextrin nanoparticles

For the conjugation of RTX to CDs, RTX was first modified with adamantane.EDC/sulfo NHS activation was used as strategy for the modification of adamantane carboxylic acid. In the second step, NHS activated adamantane carboxylic acid reacted with the amine groups of RTX generating a stable amide bond. These two steps were accomplished by according to supplier's protocols (Thermo Fisher Scientific Inc., 2011). RTX denaturation and aggregation test after adamantane conjugation was assessed by the classical SDS PAGE method. Protein concentrations were measured using the BCA assay method before Adamantane-mAb Conjugate SDS PAGE analysis.

NPs were prepared under sonication by modifying the nanoprecipitation method (Erdog̃ar et al., 2021). For NPs prepared with ACD: ACD was dissolved in ultrapure water (1 mg/mL). DOX, CYC, or VRC were dissolved separately in ethanol (absolute) (0.1 mg/mL). In order to obtain active targeted NP formulations, 1 mg/mL RTX-adamantane conjugation was diluted 0.05 mg/mL in the organic phase. Then, the organic phase was added dropwise to the aqueous phase with a Gilson syringe. Mixing was allowed under sonication for 20 min and then organic solvent was evaporated under vacuum.

For NPs prepared with PCD: PCD was dissolved (1 mg/mL) in the mixture of ethanol: water (75:25) and ethanol: tetrahydrofuran (1:1). DOX, CYC, or VRC were dissolved separately in ultrapure water (0.1 mg/mL). To obtain active targeted NP formulations, 1 mg/mL RTX-adamantane conjugation was diluted to 0.05 mg/mL in ethanol: tetrahydrofuran (1:1) and prepared as described above (Seripracharat et al., 2022; Hedayati et al., 2020). After loading each drug into ACD and PCD NPs, in order to obtain final formulation, drug loaded NPs were physically mixed before administration. In this way, neither drug affected each other's loading efficiency and stability.

2.4. Size distribution and surface charge of nanoparticles

The PS and PDI analysis of all developed CD NPs was carried out with the Malvern Zetasizer Nano ZS device at the angle of 173° and temperature of 25 °C, using the DLS photon correlation spectroscopy method based on the measurement of Brownian motions. The zeta potential (ZP) value, which is an indicator of the surface charge of NP

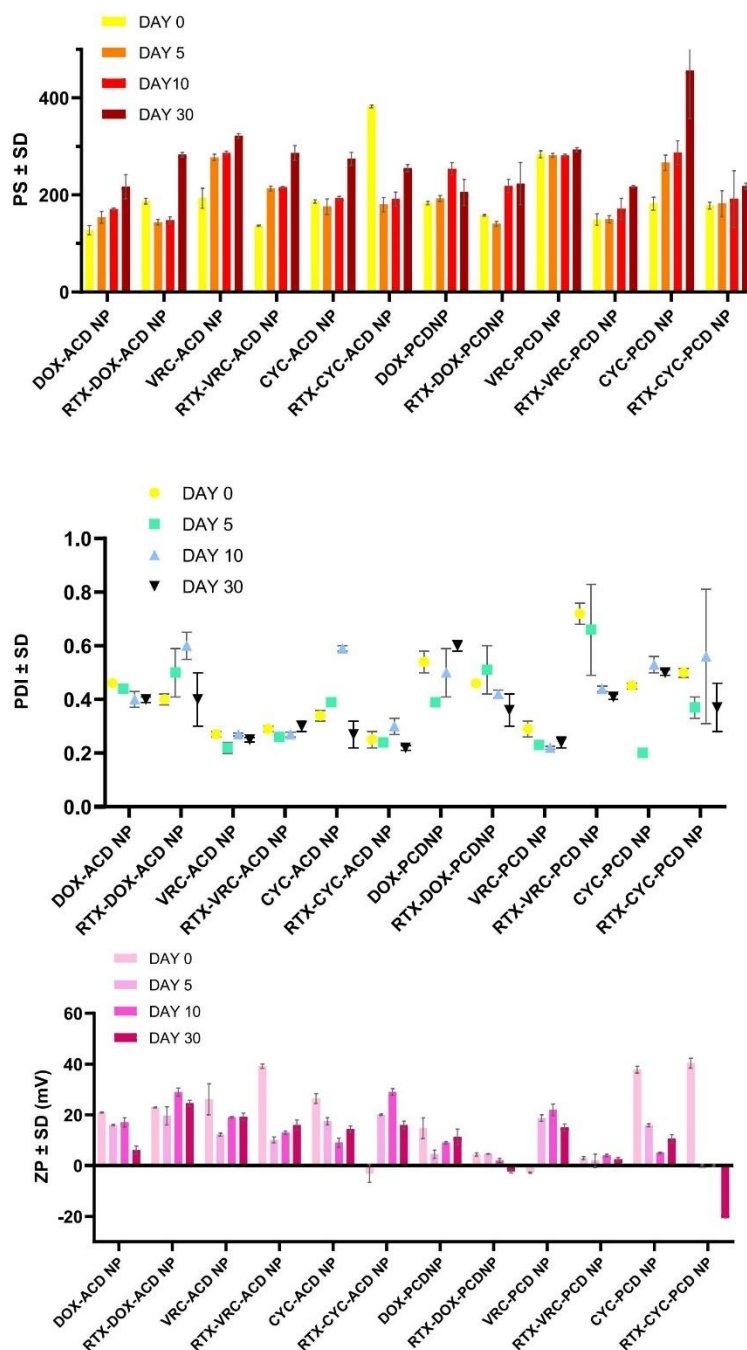


Fig. 5. Particle size, PDI and zeta potential values of NP formulations at specified time intervals. (n = 3 ± SD).

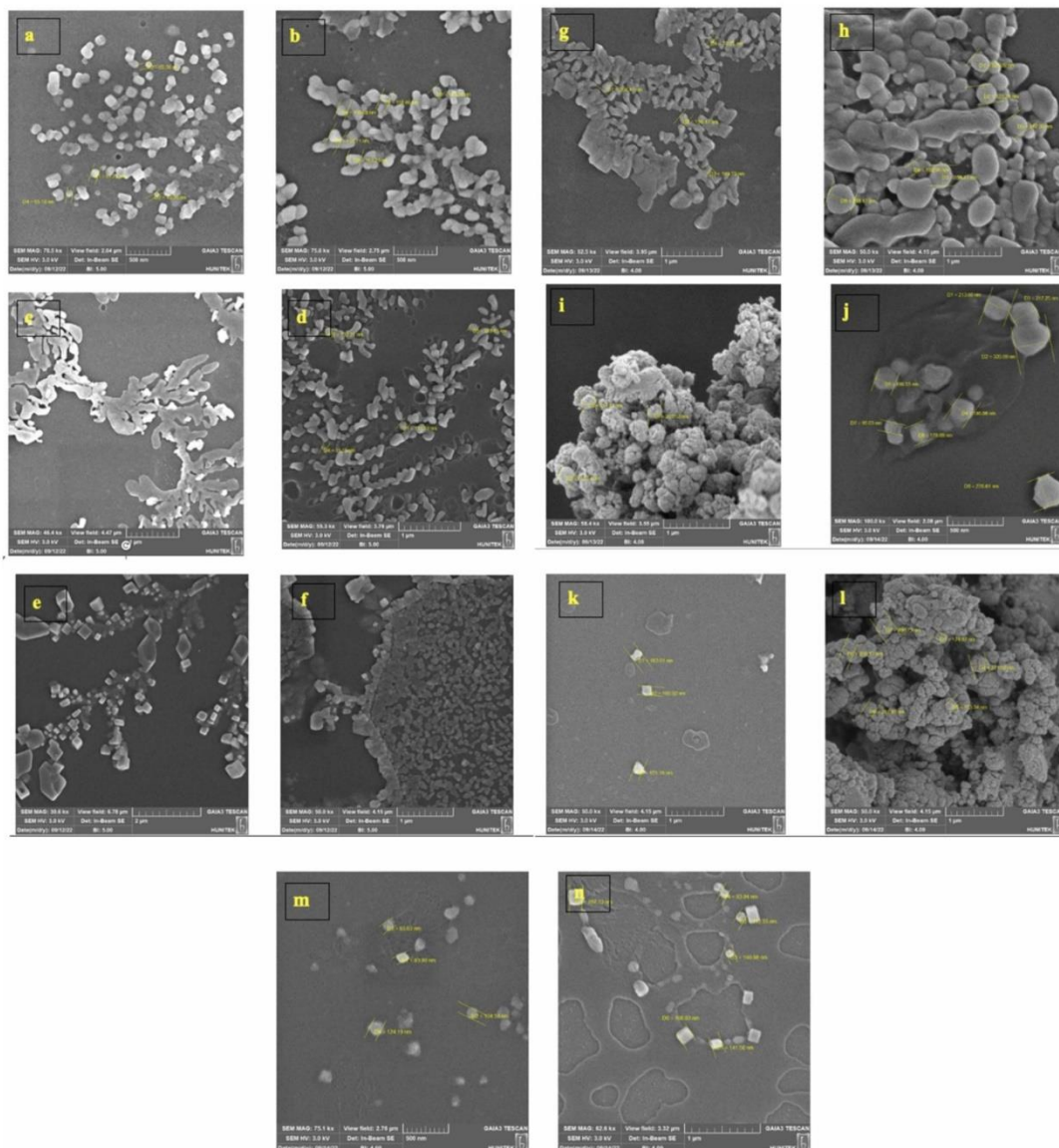


Fig. 6. SEM images of nanoparticles a) blank ACD NP, b) DOX-ACD NP, c) VRC-ACD NP, d) CYC-ACD NP, e) RTX-DOX-ACD NP, f) RTX-VRC-ACD NP, g) RTX-CYC-ACD NP, h) blank PCD NP, i) DOX-PCD NP, j) VRC-PCD NP, k) CYC-PCD NP, l) RTX-DOX-PCD NP, m) RTX-VRC-PCD NP, n) RTX-CYC-PCD NP.

formulations, was measured in mV for each formulation with the Malvern Zetasizer Nano ZS device at an angle of 12.8° and temperature of 25°C (Varan et al., 2021). All measures for performed in triplicate and expressed in terms of mean \pm SD.

2.5. Loading efficiency of cyclodextrin nanoparticles

Drug loading efficiency for DOX, CYC and VRC loaded NPs was determined using the indirect method. The reason why the direct

determination method is not used is that water-soluble drugs cannot be removed directly by centrifugation or dialysis. For this purpose, filtered centrifuge tubes were used (MWCO: 10000 Da). In the formulations that were centrifuged at 4500 rpm for 40 min, the free drug passed through the filter and accumulated below (Ding et al., 2018). Loading efficiency was calculated as the ratio of the amount of drug found at the end of HPLC analysis to the amount of drug initially encapsulated into the formulation.

The amount of RTX in formulations was quantified using the micro

Table 2
Amount of NPs formulation aqueous colloidal dispersion before and after the sterilization process.

Nanoparticles	Amount (Before Filtration) (g)	Amount (After Filtration) (g)	% Yield
RTX-DOX-ACD NP	1,1786	1,1701	99,28
RTX-VRC-ACD NP	1,0945	0,9906	90,50
RTX-CYC-ACD NP	0,6324	0,5247	82,96
RTX-DOX-PCD NP	1,0790	1,0547	97,74
RTX-CYC-PCD NP	0,8314	0,7828	94,16
RTX-VRC-PCD NP	1,0101	0,9635	95,39

BCA kit. Initially, protein concentrations were determined using the BCA kit by serial dilution in PBS, employing the protein standard included in the commercially available kit. A calibration curve and equation were established from the obtained data. Subsequently, the same kit was used to analyze formulations containing RTX. Samples were incubated for 30 min at 37 °C, and the protein content was measured using a microplate reader at 562 nm (Song et al., 2019; Saqr et al., 2019).

2.6. Evaluation of physical storage stability

The aqueous dispersions of anticancer drug loaded NP formulations were stored at + 4 °C for 30 days. At specified time intervals (5th, 10th and 30th days), PS, PDI and ZP values of the NP formulations were determined and evaluated in terms of physical storage stability over time (Varan and Bilensoy, 2017).

2.7. Imaging of nanoparticles

NP morphology was examined using the Scanning Electron Microscope (SEM) method. For this purpose, freshly prepared liquid samples were dried on aluminum tape and allowed to stand overnight and coated with a 10 nm-thick layer of gold / palladium using the Gatan 682 Precision Etching and Coating System (PECS). Imaging was performed using the FEI Quanta 200 FEG ESEM device and the Everhardt-Thornley SED detector (Akkin et al., 2022).

2.8. Sterilization of nanoparticles

The NPS, prepared by aseptic technique in a sterile environment, were obtained as a final aqueous colloidal dispersion. Subsequently, they were filtered through a 0.22 µm porous membrane filter in a Class IIB laminar flow cabinet and sterilized via filtration. The yield of NPs after sterilization was calculated as a percentage by comparing the weights of the aqueous colloidal dispersions before and after filtration (Memisoglu-Bilensoy and Hincal, 2006). A top-loading balance was used during the weighing process. The glass containers were first tared, and then the final aqueous colloidal dispersions were weighed.

2.9. Determination of drug release profile

The in vitro release profile of drug loaded and active targeted NPs was determined by the dialysis membrane method. For this purpose, drug-loaded NP formulations were placed into the dialysis membrane (MWCO: 5000 Da). Elimination of glycerol, which acts as a humectant, was achieved by rinsing the membrane under running water for 3–4 h. Removal of sulfur compounds was accomplished by treating the membrane with 0,3% (w/v) sodium sulfide solution for 1 min at 80 °C. Then, it was rinsed with hot water (60 °C) for 2 min, followed by acidification using 0,2% (v/v) sulfuric acid solution, followed by rinsing with hot water to neutralize the acid. Then, the dialysis membrane was placed in an environment containing an amount of PBS (pH 7.4) to provide sink condition and incubated in a water bath at 100 rpm at 37 °C. At specified

time intervals (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min and 2, 4, 6, 12, 24 h), samples were taken from the external PBS environment and replaced with the same amount of fresh PBS kept at the same temperature. Samples were then analyzed by HPLC for drug content (Ganassin et al., 2017; Dong et al., 2015).

2.10. Determination of the structural integrity of Rituximab in formulation

SDS-PAGE analysis was performed to determine the stability of RTX, used for active targeting, in terms of structural change during NP preparation processes. For this purpose, samples were diluted 1:1 with 2X Laemmli sample loading buffer [65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 26,3% (w/v) glycerol, 2,1% SDS, 0,01 % bromophenol blue]. 25 µL of each sample was taken and loaded onto a 4 – 10 % Bis-Tris acrylamide gradient protein gel (Bio-Rad). Precision Plus Protein Unstained Protein Standards (Bio-Rad) was used to determine the relative molecular weights of the samples. Samples were run in Tris-Glycine Running Buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% SDS, pH 8,3) at 100 V for 30 min. Gel images were captured using the Bio-Rad ChemiDOC MP Imaging System and ImageLab Imaging Software version 6,1 (Devrim et al., 2011).

2.11. Cell culture studies

2.11.1. Determining the safety of blank nanoparticles

In order to determine the cytotoxic effect of NPs that do not contain any drug on healthy cells, L929 mouse fibroblast cell line recommended by USP<87 > Biological Reactivity Tests 2015, were used. DMEM containing 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 mg/mL) was used as medium for the cells. Cells incubated in 75 cm² cell flasks in an oven with 37 °C and 5 % CO₂. After incubation, the cells were planted in 96-well cell culture plates at 1x10³ cells in 100 µL DMEM in each well. After 24 h of incubation under appropriate conditions, the DMEM was removed from the cells, and blank ACD and blank PCD NPs diluted with DMEM were added. The cells were then incubated for an additional 48 h. Cell viability was then determined by the WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt) test. For this purpose, the formulations diluted with DMEM in the wells were removed and 100 µL of fresh medium containing 10 µL of WST-1 was added to each well and incubated for approximately 3 h. Then, absorbance measurements were made at 450 nm with a microplate reader and cell viability was calculated as a percentage compared to the control group. During the experiments, cells incubated with DMEM alone were used as a control group (Cannella et al., 2019).

2.11.2. Determination of antibody-dependent cellular cytotoxicity

An antibody-dependent cellular cytotoxicity study was conducted to determine the biological activity of adamantane-conjugated RTX contained in NPs formulations. For this purpose, CD20 + Daudi lymphoma cells were used as target cells and macrophage cells were used as effector cells. 2,5 x10⁵ macrophages and 1x10⁴ Daudi cells were planted in each well in 100 µL of medium in 96-well U-bottom plates, with the effector cell: target cell ratio being 25:1. Cells were then incubated with RTX solution or RTX-containing Gua-CD NP formulations at 37 °C for 4 h (Li et al., 2015). Then, toxicity was determined by applying the protocol in the Lactate dehydrogenase (LDH) kit provided (Biovision K-311). For this purpose, at the end of the incubation, the cells were centrifuged at 5000 rpm for 20 min using a microplate centrifuge. Then, 100 µL of supernatant was taken from each sample in 8 replicates and added to a new 96-well cell culture plate. 100 µL of LDH detection dye was added to the samples and incubated for 30 min at room temperature. After incubation, absorbances were determined with a microplate reader at 495 nm (Nupur et al., 2018). During the study, cells incubated with 1 % TritonX-100 were used as a positive control, and calculations were made

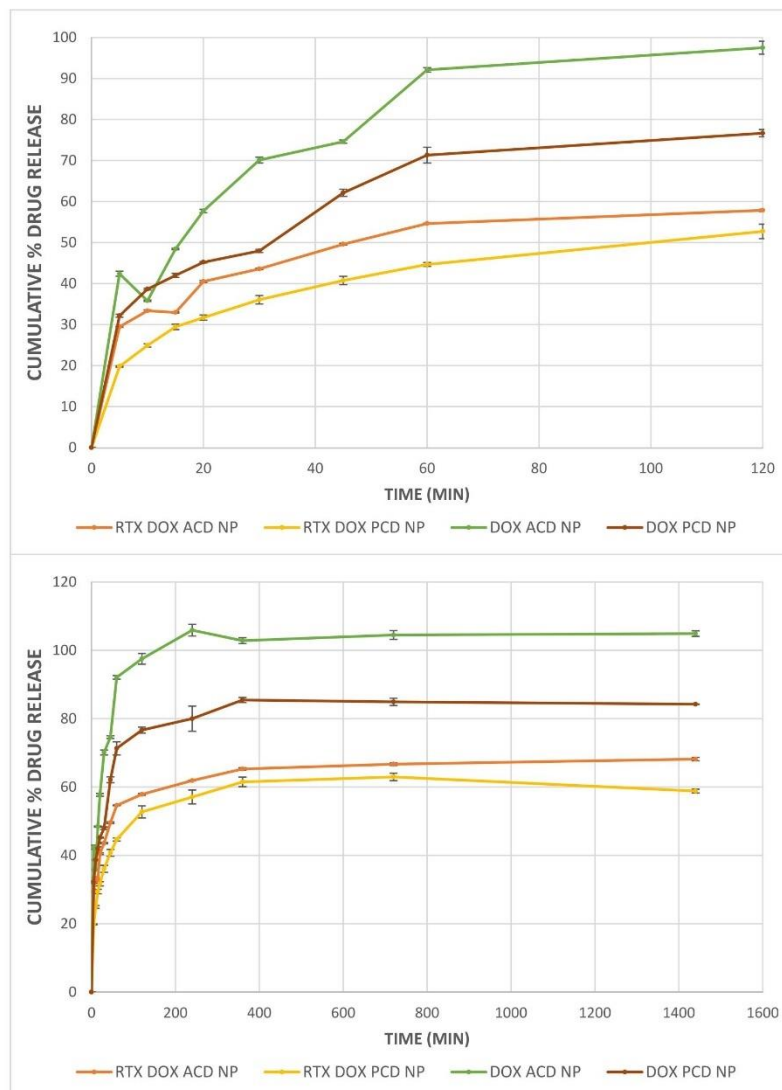


Fig. 7. Time-dependent release results of DOX ($n = 3 \pm SD$) in PBS (pH 7.4) to provide sink condition and incubated in a water bath at 100 rpm at 37 °C. The chart below is an expansion of the first 120 min.

by accepting the absorbance obtained from this group as 100 % LDH release.

2.11.3. Determining the antiproliferative activity of nanoparticles

Anticancer activity studies of blank Gua-CD NPs, NPs loaded with DOX, CYC, VRC or combination of DOX/CYC/VRC and RTX conjugated analogues were determined on Daudi human lymphoma cell lines. For this purpose, cells were first planted in 96-well cell culture plates in RPMI-1640 medium containing 10 % FBS. Since Daudi cells are suspended cells, they need cell-cell interactions to proliferate. For this

reason, the cells were planted in U-bottom 96-well plates before the experiments. As a result of 24- and 48-hour incubations, cell viability was determined by the WST-1. Cells incubated with only medium were used as the control group, and cell viability in the test groups was determined by calculation compared to the control group (Varan et al., 2018).

2.11.4. Cholesterol extraction study

In addition to their use as a drug delivery system, CDs are employed to manipulate the cholesterol composition in various cells (Szente et al.,

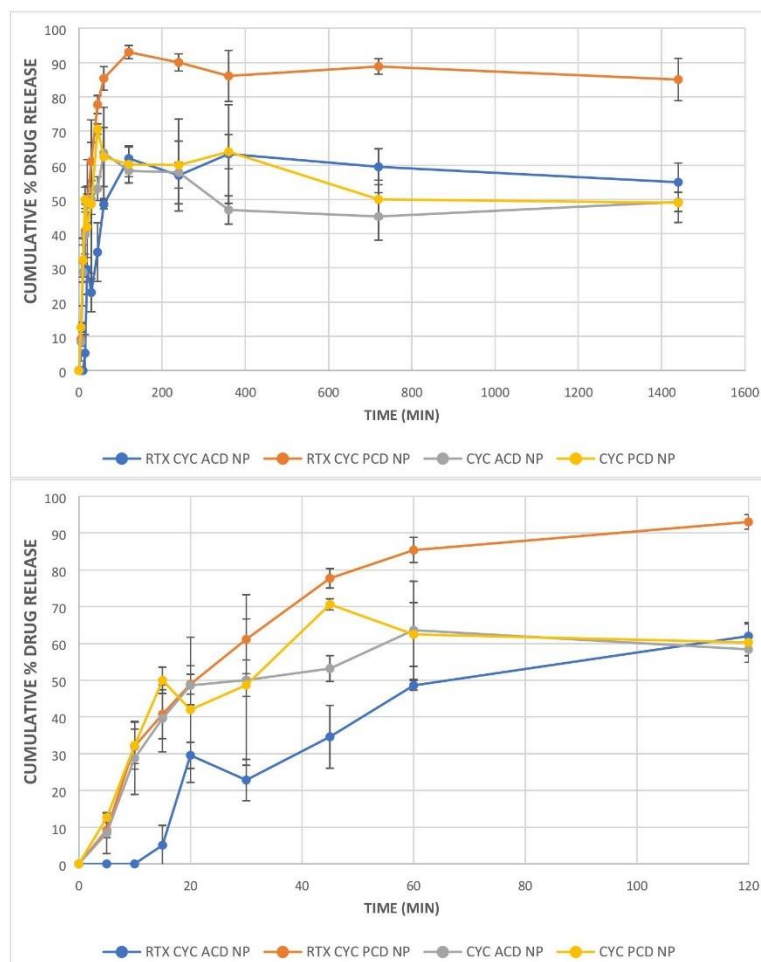


Fig. 8. Time-dependent release results of CYC ($n = 3 \pm SD$) in PBS (pH 7.4) to provide sink condition and incubated in a water bath at 100 rpm at 37 °C. The chart below is an expansion of the first 120 min.

2018; Tian et al., 2020). The effectiveness of removing cholesterol from the membrane depends on the CD derivative used, its concentration, time, and temperature of incubation with the cell, and cell type. In particular, β -CD has been shown to be the most effective cholesterol-removing CD derivative (Lopez et al., 2011). The cholesterol affinity of Gua-CD derivatives synthesized within the scope of this study on cancer cells was determined. For this purpose, the amount of cholesterol in Daudi cells incubated with different Gua-CD derivatives was determined with a commercially available cholesterol kit. (Varan et al., 2016). For comparison, methyl- β -CD, which is known to have very high cholesterol removal activity, was used as a reference standard.

2.11.5. Survivin assay

Survivin is an anti-apoptotic gene that is highly synthesized in cancer cells, and the survivin protein formed because of its expression inhibits the activation of Caspase-9, preventing cells from going to apoptosis. Additionally, it has been shown in the literature that cell apoptosis is

prevented due to increased survivin expression in NHL and drug resistance increases due to proliferation (Li and Wu., 2006; Ansel et al., 2004). In studies conducted by our group using different CD derivatives, it was determined that amphiphilic CD derivatives suppress survivin in various cancer cells, leading the cell to apoptosis. For this reason, the effect of Gua-CD derivatives to be used within the scope of the study on the survivin protein in NHL cells was evaluated. Daudi cells were incubated with drug-loaded and active targeted NPs prepared with CD derivatives. As a result of incubation, the effect of NPs on the expression of the survivin gene in NHL cells was determined using the commercially available Human Survivin ELISA Kit, in accordance with the protocol recommended by the kit. Cells incubated with medium only were used as the control group. To carry out this experiment, 100 μ L of cells were plated onto each well of a 96-well cell culture plate at a density of 5×10^3 cells per well. After 24 h, the cell culture media was replaced with DMEM containing NPs. Following an additional 48 h of incubation, the kit protocol was followed. Absorbance values of the samples were

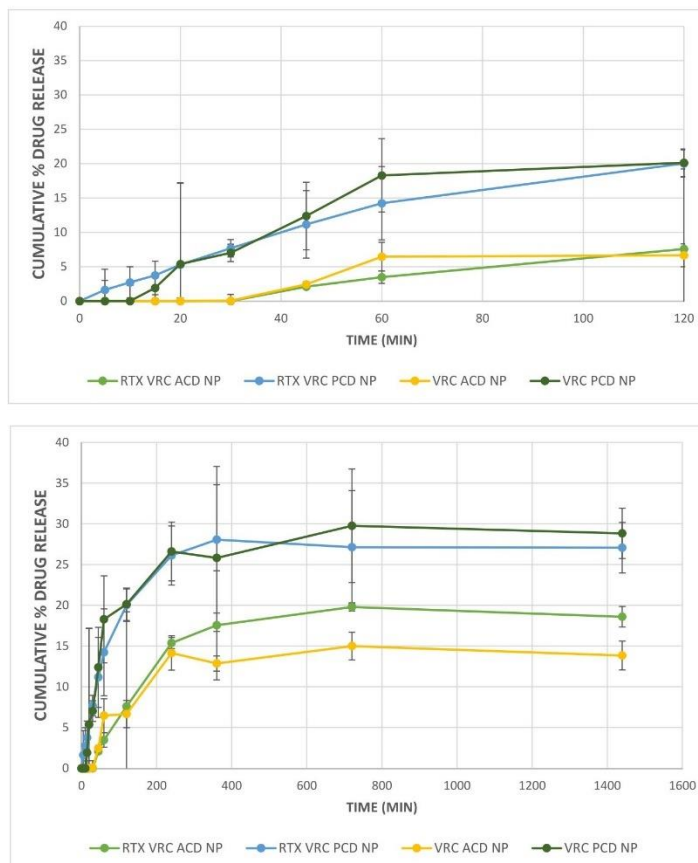


Fig. 9. Time-dependent release results of VRC ($n = 3 \pm SD$) in PBS (pH 7.4) to provide sink condition and incubated in a water bath at 100 rpm at 37 °C. The chart below is an expansion of the first 120 min.

then measured at 450 nm. The concentration of Survivin protein in the samples was determined using an equation derived from standard solutions (Ercan et al., 2021).

2.11.6. Mitochondria isolation

Gua-CDs used in this study have the potential to be actively targeted in cell mitochondria, due to the guanidino groups in their structures. To determine the amount of Gua-CD accumulated in the mitochondria, 20×10^5 Daudi cells were incubated with DOX-loaded Gua-CDs or an equal amount of DOX solution for 24 h at 37 °C in a 5 % CO₂ environment (Ahn et al., 2018). After incubation, mitochondria of the cells were isolated according to the protocol in the commercial mitochondria isolation kit (Thermo 89874). After incubated cells were centrifuged at 5000 rpm for 20 min, the supernatant was removed and 800 μ L of Reagent A from the kit was added onto the cells and kept on ice for 2 min. Then, 10 μ L of Reagent B was added and kept on ice for 5 min, while mixing by vortexing 5 times for 10 s. Then, 800 μ L of Reagent C was added and centrifuged at 700 g at + 4 °C for 10 min. Afterwards, the supernatant was collected and centrifuged again at 12.000 g for 15 min. The supernatant was discarded and the pellet containing the mitochondria was centrifuged again at 12.000 g for 5 min with 500 μ L Reagent C. The pellet containing mitochondria was taken and the amount

of DOX was measured with a fluorescence microplate reader (Spectramax ID3) at excitation and emission wavelengths of 470 and 560 nm, respectively.

2.11.7. 3D tumor model studies

3D spheroids were prepared by the hanging drop method using the Daudi human lymphoma cell line for the first time in literature. A cell suspension of 1×10^4 cells in 20 μ L was prepared in a medium enriched with 1 % methylcellulose. Then, after adding 1 mL of medium to the wells of the 24-well cell culture plates, 20 μ L of the prepared cell suspension was added to the cover of the plate, corresponding to each well, and the cover was closed by turning it upside down. Hanging drop cultures were incubated for 24 h at 37 °C, 5 % CO₂. To prepare agarose-coated plates, 24-well plates coated with medium containing 1 % agarose were kept at 4 °C for 24 h. Then, the cell droplets were transferred to agarose-coated plates and incubated for 10 days. Then, the medium on the cells was incubated with drug-loaded NP formulations and appropriate drug solutions for 48 and 72 h. As a result of incubation, cell viability of cell aggregates was determined by WST-1 analysis. Cells incubated with only medium were used as the control group, and the viability of the cells in this group was accepted as 100 % (Decaup et al., 2013).

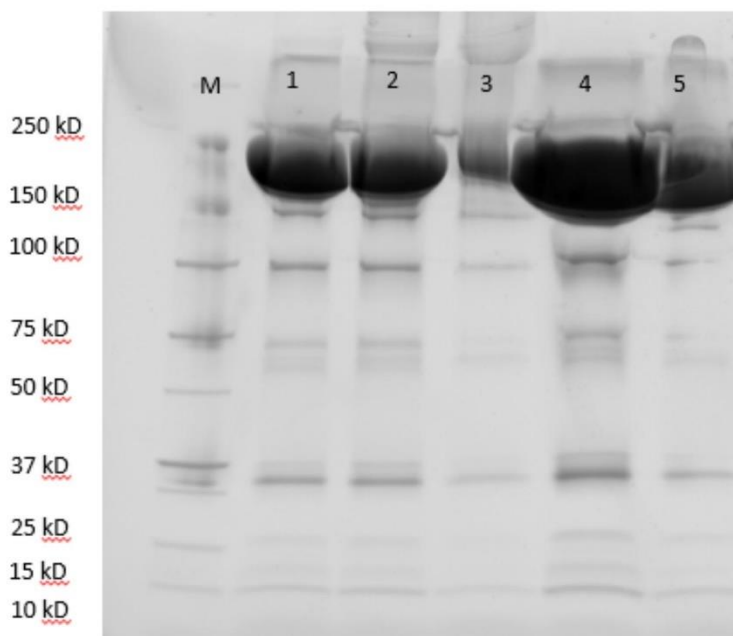


Fig. 10. SDS-PAGE analysis results under native conditions to determine the structural integrity of RTX in CD NP s. Line M: Precision Plus Protein Unstained Protein Standards; Line 1: RTX standard; 2: RTX-ACD NP; 3: RTX-PCD NP; 4: RTX-drug loaded (DOX/CYC/VRC) ACD NP; 5: RTX-drug loaded (DOX/CYC/VRC) PCD NP.

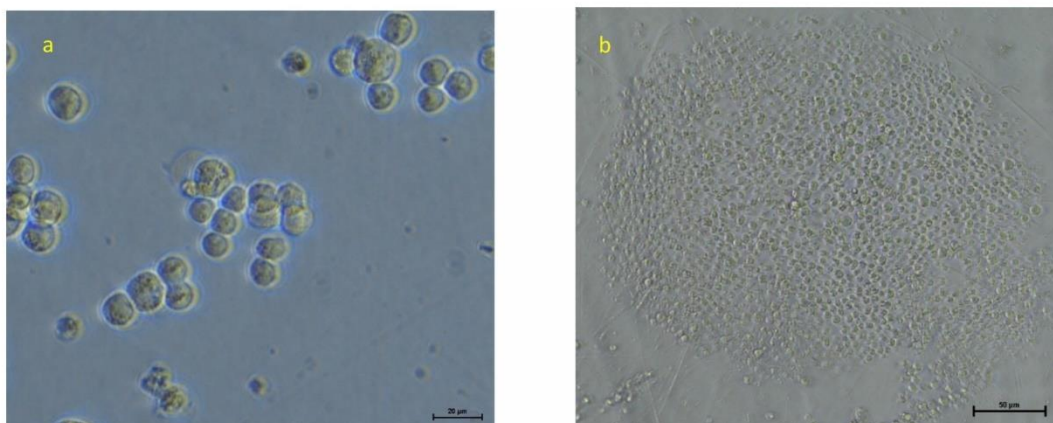


Fig. 11. Microscopic images of non-resistant Daudi cells (scale bar a: 20 µm b: 50 µm).

2.11.8. Statistical analysis

All statistical analyses were performed by Student *t*-test. $p < 0.05$ was considered to denote a statistically significant difference.

3. Results and discussion

Some of the NHL patients develop primary resistance to one or more of the drugs used in R-CHOP, and some develop resistance at any stage of treatment. Among patients who fail R-CHOP treatment, 20 % suffer from

primary refractory disease (progression during or immediately after treatment), while 30 % relapse after achieving complete remission (Coiffier and Sarkozy, 2016). Nanotechnology, especially applied in cancer diagnosis and treatment, has become one of the most promising alternatives to traditional chemotherapy. In the following years, nano-sized carrier systems used as drug delivery systems have been examined in various types such as lipid or polymer-based, drug-related, inorganic and viral NPs. Liposomal Doxil (DOX), non-PEGylated liposomal Myocet (DOX), albumin-based NP Abraxane (paclitaxel), polymeric micelle

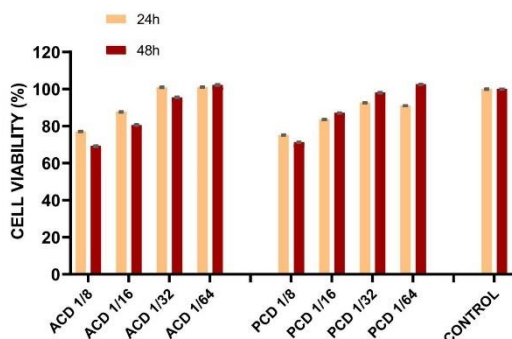


Fig. 12. Effect of different concentrations of Gua-CDs on cell viability in L929 healthy fibroblast cells for 24 h and 48 h ($n = 6 \pm SD$). CD solutions were prepared by diluting with DMEM in different concentrations. L929 cells in DMEM without CDs were used as a control group, cell viability was accepted 100 % and other cell viabilities were calculated according to control group.

Genexol-PM (paclitaxel), liposome Marqibo (VRC sulfate) are commercially approved examples (Demirtürk and Bilensoy, 2022).

In this study, ACD and -PCD, which are new, tumor-targeted derivatives based on CD were used for the first time in a lymphoma model to increase CHOP and R-CHOP treatment efficacy and to eventually overcome drug resistance. In the literature, mitochondria are targeted with the subcellular targeting approach based on guanidine targeting. Song *et al* stated that cyclomethylated iridium-guanidinium complexes, as anticancer agents targeting mitochondria, exhibited higher cytotoxicity than cisplatin against a cisplatin-resistant cell. They also stated that these complexes could be efficiently accumulated into HeLa cells and could be used to specifically target mitochondria (Song *et al.*, 2017). By combining this effect and the active targeting strategy with RTX, it is

aimed to both increase the anticancer effectiveness of the nanodrug and increase the safety of the drug with increased selectivity. PS, PDI and ZP values of NPs prepared by nanoprecipitation method using CDs, the safety was proven through hemolysis study, were measured. The amounts of anticancer drugs and targeting agent RTX loaded into the prepared NPs were determined by HPLC and BCA kit, respectively. Optical imaging was performed with SEM to compare with the dynamic light scattering method and to obtain morphological information. In addition to stability studies, in vitro drug release studies and sterilization studies were carried out. After it was shown that the structure of RTX did not change in formulation, cell culture studies were started. The safety of CD polymers was determined in the L929 mouse fibroblast cell line, and their anticancer activities were determined in Daudi human lymphoma cancer cells. In addition to conventional cell culture studies, 3D cell culture was also studied.

3.1. Adamantane-mAb conjugate and SDS-PAGE analysis

When analyzing the denaturation and aggregation of the adamantane-mAb conjugate through SDS-PAGE analysis, it was observed that in samples 1 and 2, the conjugation reaction occurred successfully in an environment of either 20 % N,N-dimethylformamide (DMF) alone or 20 % DMF with 5 % glycerol, and the antibody remained undenatured compared to the control. However, upon examination of the gel images for samples 3 and 4, it was observed that the conjugation reaction occurred in a medium of 20 % DMF alone or in a medium of 20 % DMF with 5 % glycerol along with the addition of 2-mercaptoethanol. In these cases, denaturation occurred, leading to the formation of antibody fragments with molecular weights of 100 kDa, 50 kDa, and 25 kDa (Fig. 2).

3.2. Hemolysis assay

CDs have a wide range of uses for pharmaceutical purposes due to their various advantages. The high affinity of CDs toward cholesterol

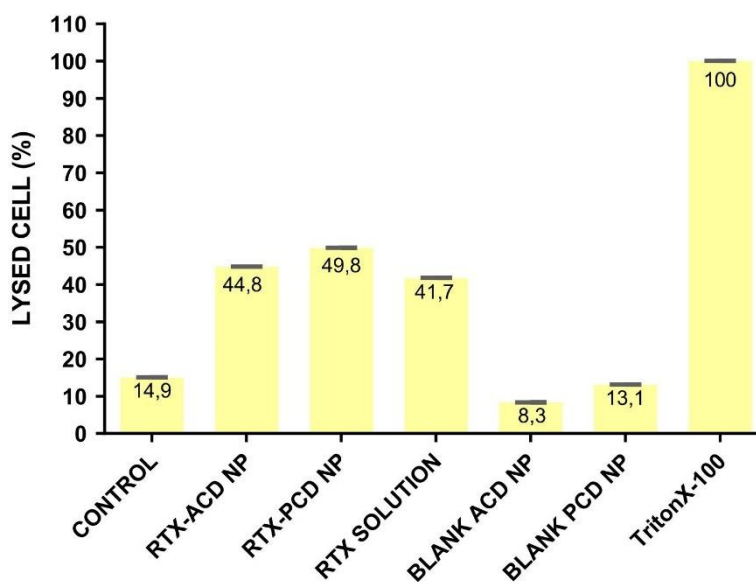


Fig. 13. Percentage of lysis rate in lymphoma cells incubated with different NP formulations and drug solutions ($n = 8 \pm SD$) $p < 0.05$. As a positive control group, Triton-X, known for its lytic effect on cells, was used and by comparing LDH values lysed cells (%) were determined for formulations.

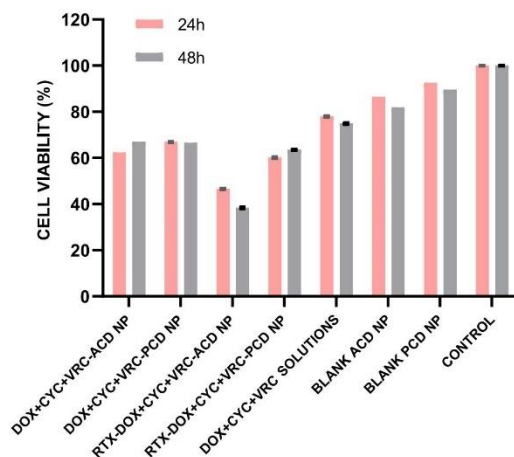


Fig. 14. Cell viability (%) ($n = 3$, \pm SD) in Daudi human lymphoma cells incubated with different NP formulations loaded with three different anticancer drugs (DOX, VRC, CYC), blank CD NPs, and three different drug solutions for 24 h and 48 h. $p < 0.05$. Cell viability was evaluated by WST-1 assay.

and phospholipids found in the structure of biological membranes also causes toxicity. It is reported that β -CDs, one of the most commonly used CD derivatives in the pharmaceutical field, can cause nephrotoxicity and hemolysis by intravenous administration (Fu et al., 2015; Yokoo et al., 2015). Its high affinity for lipids causes it to disrupt the membrane integrity of erythrocytes. To overcome this side effect, CD derivatives are synthesized with different modifications. One of the main reasons for synthesizing amphiphilic CD derivatives is to prevent hemolysis (Varan et al., 2017; Memişoğlu et al., 2003). For this purpose, a hemolysis study was conducted to determine the safety of newly synthesized CD derivatives to be used in NP preparation within the scope of the study, and in line with the findings, it was determined that the newly synthesized CDs did not cause hemolysis in human blood under the selected

experimental conditions. In particular, it was determined that ACD and PCD derivatives exhibited no hemolytic effect on erythrocytes across various concentrations. Regardless of the dosage, the percent hemolysis values ranged from 0.01 to 0.5 % (Fig. 3). Based on these results, the CDs used were seemed safe with respect to hemolysis.

$$\% \text{Hemolysis} = \frac{\text{RedBloodCellsincubatedwithCDderivatives}}{\text{RedBloodCellsincubatedwithdistilledwater}} \times 100$$

3.3. Size distribution and surface charge of prepared CD nanoparticles

By incorporating RTX into the formulation, generally smaller particle sizes were obtained, except for DOX loaded ACD formulations. Nevertheless, as seen in Fig. 4, all drug loaded NP formulations were smaller than 200 nm, which could be advantageous for lymphatic targeting. Thus, it can be thought that NPs may benefit from passive targeting in the body, with a homogeneous particle size distribution suggesting dose uniformity. The incorporation of the macromolecule RTX-adamantane did not disrupt integrity and structure of the NP but rather resulted in a more compact nanostructure, as can be seen in Fig. 4 based on mean diameter and PDI data. Working with the small molecule ACD resulted in more homogeneous NPs ranging from 120-190 nm. However, it is noteworthy that PCD NPs, when loaded with anticancer drugs and RTX,

Table 3

Amount of survivin protein in Daudi cells incubated with blank and three different drug loaded NP formulations and triple drug solutions ($n = 3 \pm$ SD) $p < 0.05$.

Nanoparticle	Survivin Protein Amount (PG/ML)	% Survivin Amount
RTX-DOX+CYC+VRC-ACD NP	3178 \pm 0,22	11,3
RTX-DOX+CYC+VRC-PCD NP	10818 \pm 0,09	38,3
DOX+CYC+VRC-ACD NP	5213 \pm 0,05	18,5
DOX+CYC+VRC-PCD NP	8421 \pm 0,08	29,8
BLANK ACD NP	17623 \pm 0,06	62,5
BLANK PCD NP	21765 \pm 0,08	77,1
DOX+CYC+VRC SOLUTIONS	20421 \pm 0,11	72,4
CONTROL	28219 \pm 0,04	100

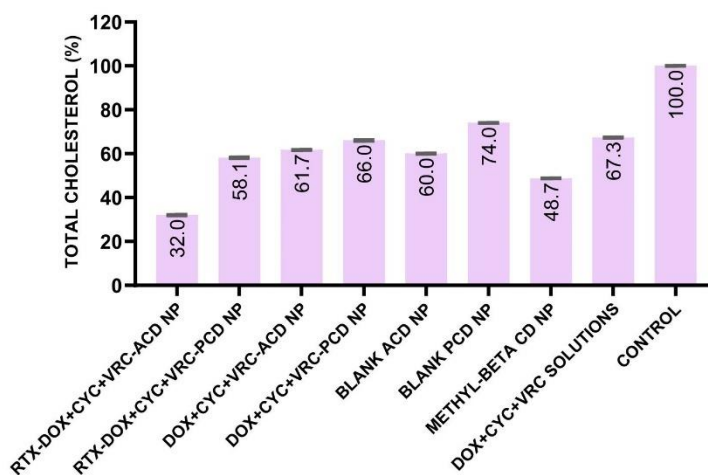


Fig. 15. Cholesterol amount (%) in Daudi human lymphoma cells incubated with different NP formulations loaded with three different anticancer drugs (DOX, CYC, VRC), blank CD NPs and three different drug solutions ($n = 3$, \pm SD) $p < 0.05$. Methyl-beta CD is a gold standart about cholesterol extraction from cell membrane so it is used as a positive control group.

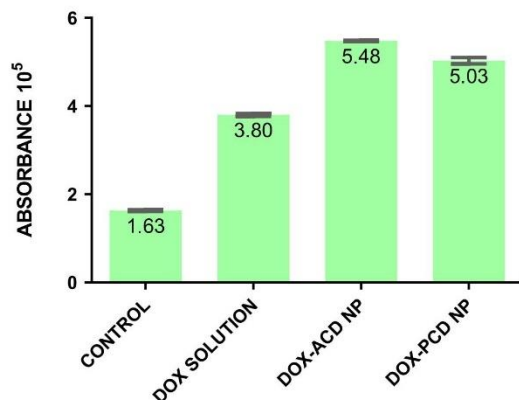


Fig. 16. Amount of DOX detected in the mitochondria of Daudi human lymphoma cells incubated with DOX-loaded Gua-CD NPs and DOX solution ($n = 8$, \pm SD) $p < 0.05$. DOX absorbances in mitochondria was evaluated, after mitochondria isolation by commercial kit, using fluorescence microplate reader at excitation and emission wavelengths of 470 and 560 nm, respectively.

showed enhanced stability with a size reduction from around 400 nm to a range of 140–190 nm.

When a guest molecule is introduced, it leads to an expansion in the surface area of the amphiphilic CD, consequently altering its ability to self-align at interfaces. As a result, when NPs are loaded with drugs, the state and position of the encapsulated drug can induce notable variations in the size of the NPs (Çarpanlı et al., 2009). This can explain why blank and drug loaded NPs differ in size. PCD NPs have a larger mean

size than ACD NPs, which is an expected result. This is because monomeric ACD has single CD unit, whereas PCD is composed of a network of multiple CDs. As observed in Fig. 4, even the blank PCD NPs are clearly larger than the blank ACD NPs.

Zeta potential, which reflects the surface charge of colloidal dispersions, is a valuable tool for assessing and managing dispersion stability. By examining zeta potential data, the physical stability of CD NPs in aqueous-based dispersions can be determined and the presence of drugs on the particle surface can be confirmed.

Since cell membranes are negatively charged, positively charged NPs are expected to interact more effectively with cell membranes than those that are neutral or negatively charged. This interaction is assumed to result from positive electrostatic interactions conjugated and drug-loaded ACD NPs exhibit a zeta potential of around 20 mV, indicating a cationic nature. On the other hand, RTX conjugated and drug-loaded PCD NPs, except for CYC-loaded ones, are nearly neutral as observed in Fig. 4. Given this comparison, it can be inferred that ACD NPs may have a higher of cellular uptake. However, the beneficial traits of cationic polymers come with drawbacks when used in vivo. Their propensity to activate the complement system leads to rapid clearance from circulation as they bind with plasma proteins, hindering the delivery of active substances like drugs or nucleic acids to tumor cells (Bilensoy, 2010).

3.4. Loading efficiency of CD nanoparticles

Loading efficiency was determined by the ratio of the drug amount measured by HPLC analysis to the amount of anticancer drugs initially encapsulated in the formulation. A BCA kit was used to quantify the RTX content in the formulation. As shown in Table 1, incorporating RTX into the structure increased the loading efficiency of the ACD formulations and decrease it in the PCD formulations for anticancer drugs. This suggests that RTX may reduce premature drug release from ACD NPs, a

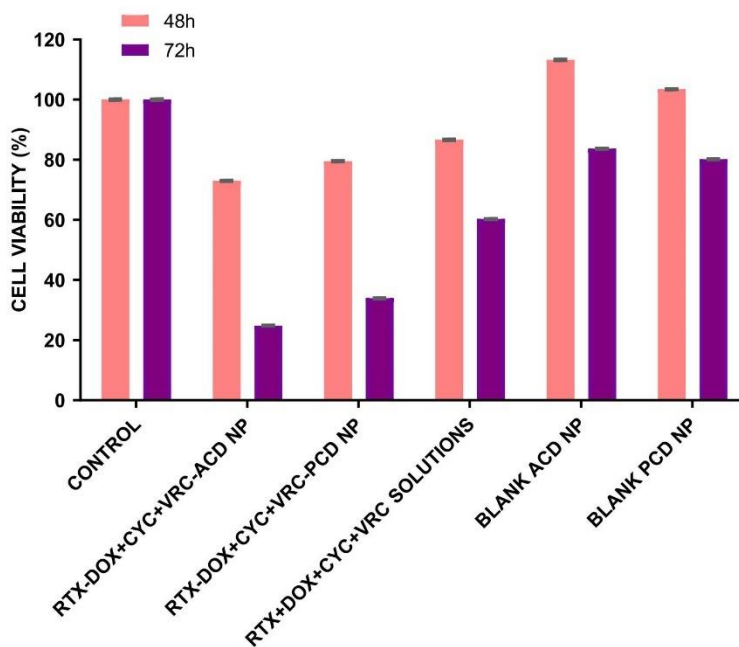


Fig. 17. Cell viability after 48 and 72 h in 3D lymphoma spheroids incubated with different NP formulations and blank NPs ($n = 6 \pm$ SD) $p < 0.05$. Spheroids were formed in U bottom 24-well plate and after formulation exposing, cell viability (%) was calculated by WST-1 assay.

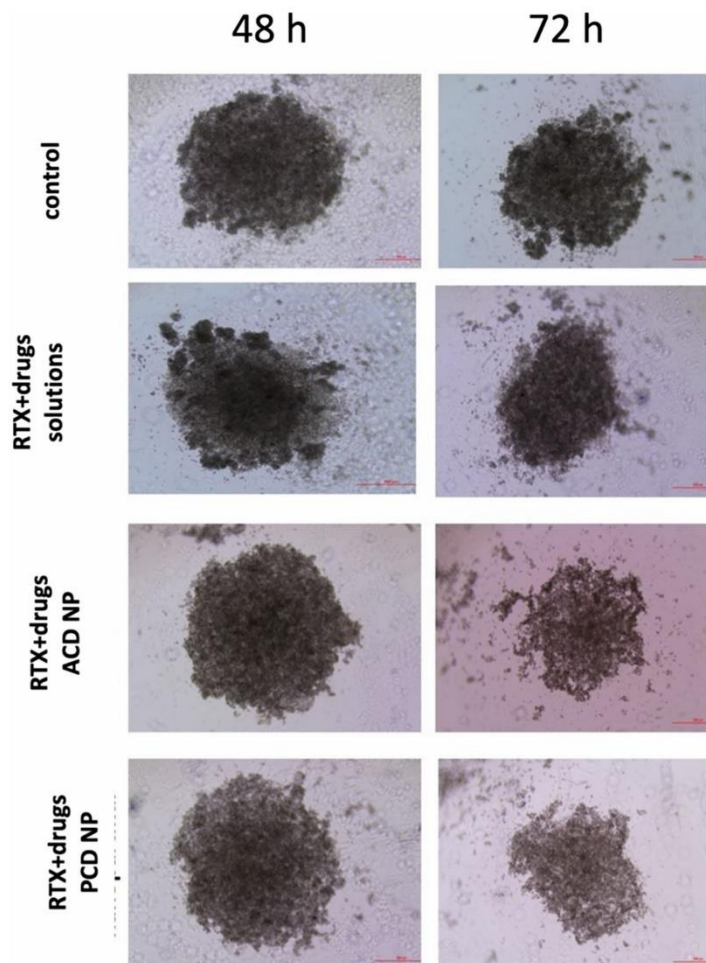


Fig. 18. Microscope images of 3D lymphoma spheroids incubated with different formulations after 48 and 72 h. The morphological structure of spheroids was observed under the light microscope.

hypothesis supported by subsequent release studies. This study broadens the potential applications within the swiftly expanding realm of NP drug delivery. It not only facilitates the simultaneous delivery of combination drugs but also holds promise for mitigating side effects linked with premature systemic drug dispersal. Therapeutic NPs harboring multiple drug types demonstrate heightened efficacy against cancer cells; however, they also pose risks to healthy tissues. Thus, substituting NPs with cancer cell-specific ligands for targeted delivery constitutes a crucial step toward enhancing NP accumulation at tumor sites and augmenting the therapeutic potency of multidrug-loaded NPs (Aryal et al, 2011).

3.5. Evaluation of physical stability

Particle size and zeta potential values are critical for the stability and biodistribution of NPs, as well as for the interaction of nanocarriers with cell membranes and their cellular uptake. Therefore, ensuring the stability of NPs is essential to achieve the desired effects. According to the

results presented in Fig. 5, there is no significant change in the characteristics of the freshly prepared particles up to day 5. Consequently, it is suggested that the particles can be stored under refrigeration for up to 1 week without the addition of preservatives.

3.6. Imaging of nanoparticle

Morphological images of the NPs were captured using scanning electron microscopy (SEM). Examination of the SEM images revealed that the particle size distribution of the NPs corresponded with the results from DLS analysis. However, it was visually observed that NPs containing RTX in their structure tended to aggregate more than non-targeted NPs (Fig. 6).

3.7. Sterilization of nanoparticles

Since the application route of NPs will be intravenous, it is

mandatory to assess the sterility of the formulation. However, to avoid problems with stability, the filtration method under aseptic conditions was chosen as it is one of the most reliable methods. As seen in Table 2, the lost formulation volume is less than 20 %. In all in vitro studies, dose calculations were made taking these losses into consideration. Since the NPs were below 200 nm, the filtration method was found suitable.

3.8. Determination of drug release profile

In vitro release profiles provide valuable insights for comparing formulations and predicting the in vivo release kinetics of NPs and they also serve as a quality control measure. Examining the DOX release results shown in Fig. 7, it is evident that DOX-loaded ACD and PCD NP formulations initially release more drug than those targeted with RTX. By the end of the 4th hour, non-targeted DOX-loaded PCD NPs released 80 % of the drug, while non-targeted DOX loaded ACD NPs achieved 100 % cumulative drug release. In contrast, CD treatments targeted with RTX exhibited a slower release, with only 60 % of the drug released even after 24 h.

In the release profile results of CYC depicted in Fig. 8, it was observed that targeting CYC-loaded ACD and PCD NP formulations with RTX resulted in increase drug release. Specifically, CYC-loaded PCD NPs targeted with RTX released more than 80 % of the drug within the first 2 h.

Results of targeted and non-targeted VRC-loaded ACD and PCD NP s are shown in Fig. 9. It was observed that targeting the VRC-loaded ACD NP formulations with RTX increased the drug release, whereas targeting the PCD NP formulations with RTX decreased it. At the end of 24 h, the cumulative drug release from formulations using PCD NPs was around 30 %, while those using ACD NP s ranged from 10-20 %.

3.9. Determination of the structural integrity of Rituximab in nanoformulation

As indicated in Fig. 10, RTX in NP formulations prepared with ACD and PCD derivatives exhibits the same bands as free RTX. These results demonstrate that the NP preparation and formation processes do not affect the structural integrity of RTX. Additionally, the bands corresponding to RTX, as obtained by SDS-PAGE analysis, were found to be consistent with previous data reported in literature (Chao et al., 2010).

3.10. Cell culture studies

Microscopic images of Daudi cells, both in the flask and in the well, are shown in Fig. 11.

3.10.1. Determining the safety of blank nanoparticles

The concentrations of CD derivatives used in their formulations were diluted with DMEM in specific ratios and applied to L929 cells. Fig. 12 show the percentage viability of L929 cells exposed to various CD dilutions, revealing that cell viability remained around 70 % for both CD derivatives, even at high concentrations (1/8CD:DMEM). According to USP, this value must exceed 70 % for polymeric materials to be considered safe (Cannella et al., 2019).

3.10.2. Determination of antibody-dependent cellular cytotoxicity

Antibody-dependent cellular cytotoxicity is a type of immune response in which target cells coated with antibodies are killed by macrophage cells. RTX (antiCD20) activates the effector cell by specifically binding to CD20 + Daudi cells. The proportion of lysed cells was determined by measuring the amount of LDH released from lysed lymphoma cells by the stimulated effector cells. According to the results shown in Fig. 13, it was found that CD NPs containing RTX stimulated the effector cells at least as effectively as free RTX. This indicates that there is no loss in the biological activity of RTX during the NP preparation stages. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity is a

commonly used method in determining the biological activities of antibodies and comparing biosimilars (Singh et al., 2018; Li et al., 2015).

3.10.3. Determining the antiproliferative activity of nanoparticles

The results of cell viability analysis at 24 and 48 h with Daudi human lymphoma cells are shown in Fig. 14. From the results, it is evident that the final formulation, obtained by physically mixing of all three drug-loaded NP formulations, resulted in a greater decrease in cell viability compares to the drug solutions alone. Among the formulations, the active targeted ACD NP exhibited the least cell viability. When the effectiveness of the RTX solution was examined, it was observed that it maintained cell viability above 80 % at both 24 and 48 h. The fact that RTX had no direct effect on cell viability, but significantly increased the effectiveness of both PCD and ACD NPs when included in the formulation ($p < 0.05$ compared to CD NPs without RTX-containing formulations), suggests that NPs may have increased the cellular uptake of RTX. Since ACD NPs are smaller, more rigid and more cationic in structure, they are thought to interact more effectively with the negatively charged cell membrane. The PCD structure, being a combination of several CDs, has a more complex structure. For these reasons, ACD NPs provided a statistically more significant reduction in viability compared to PCD NPs.

3.10.4. Cholesterol extraction study

Cholesterol serves as a key constituent in the structure of cell membranes and is vital for maintaining cell viability. Nevertheless, both clinical observations and experimental evidence indicate that cholesterol metabolism might exert a significant influence on carcinogenesis and the progression of tumors. Cancer cells typically exhibit elevated levels of cholesterol in their membranes compared to healthy cells. Additionally, it has been established that tumor cells resistant to anticancer drugs possess higher cholesterol content in their membranes compared to drug-sensitive cancer cells (Varan et al., 2021). The cholesterol extraction data are shown in Fig. 15. Methyl- β -CD solution was used as a positive control group during the studies. When the findings obtained were evaluated, the cholesterol content (31.9 ± 0.2 %) in the cells incubated with the ACD NP formulation loaded with all three anticancer drugs and containing RTX was the lowest. It was significantly lower than that the cells incubated with non-targeted drug-loaded ACD NP and the drug solution group ($p < 0.05$). The cholesterol removal efficiency of drug-loaded but non-targeted NPs was found to be similar to that of the group incubated with drug solutions. The cholesterol content in cells incubated with blank ACD NP was also observed to be similar to that of drug-loaded ACD NPs. The presence of excessive amounts of negatively charged cholesterol in cancer cells increases the interaction of ACD NPs with the cell membrane. Thanks to their unique structure and charge, ACD NPs bind more to cholesterol, facilitating its removal from the membrane. Furthermore, this mechanism is also thought to contribute to the antiproliferative effects of ACD NPs.

3.10.5. Survivin assay

The results showing the change in the amount of survivin in Daudi cells are as presented in Table 3. Survivin is an anti-apoptotic protein and, considering its role in cellular cycles, it is significantly reduced by the drug-loaded NPs. Compared with the control group, there was activation of the inhibitor of apoptosis in lymphoma cells ($p < 0.05$), thereby inducing apoptosis. In particular, the fact that ACD NP s reduce the amount of survivin to approximately 10 % shows that ACD NP formulations are more advantageous in treatment.

3.10.6. Mitochondria isolation

According to the mitochondria isolation analysis results shown in Fig. 16, it can be stated that both CD derivatives deliver higher amounts of DOX to the mitochondria than the solution form. Among samples containing the same amount of DOX, it was statistically determined the PCD derivative delivered 1.32 times more DOX to the mitochondria,

while the ACD derivative delivered 1.44 times more.

3.10.7. 3D tumor model studies

According to the findings shown in Fig. 17, over 70 % cell viability was observed after 48 h of incubation in drug-loaded NP s and drug solutions. However, cell viability in both drug-loaded ACD and PCD NP formulations is statistically significantly lower than in drug solutions ($p < 0.05$). A dramatic decrease in cell viability was observed in all groups in the 72-hour analysis results. The least cell viability was observed with RTX-conjugated and drug-loaded ACD NPs. It has been observed microscopically that formulations containing the same amount of active ingredient have different effects on 3D lymphoma spheroids. The resulting microscope images are shown in Fig. 18. While the spheroids applied to drug solutions generally maintained their spherical structure, it was clearly observed that the spheroids were distorted in those incubated with the CD derivative in a time dependent manner.

4. Conclusions

Currently, NHL is a type of cancer that has not yet been overcome, and it is predicted that these diseases will increase with population growth. Unfortunately, the main reason for the failure of the treatment the development of resistance to the drugs used in the R-CHOP regimen, which is applied as first-line treatment in NHL patients, especially RTX and DOX and resistance is the main reason for the recurrence of the disease. In particular, multidrug resistance frequently develops in combined chemotherapy, and unfortunately, resistance to one drug causes another anticancer molecule to be ineffective. The biggest advantage of using nanosized drug delivery systems in cancer treatment is the potential reduction of drugs in a more targeted manner. In this study, the actively targeted drug delivery system was developed by using RTX, a monoclonal antibody (Mab) employed in clinical settings, loaded with three commonly used anticancer drugs (DOX, CYC, VRC) for the treatment of NHL. Reducing drug dosages while effectively combining Mab targeting via enhanced permeability and retention (EPR) effect and mitochondrial targeting with Gua-CD NPs could potentially prevent drug resistance.

This assertion is supported by in vitro characterization and cell culture studies. Each drug was loaded onto a CD derivative and then physically mixed. Cell culture studies revealed that the combined effect of three drugs was always more effective than that of single drug or combined drugs solutions. Both ACD and PCD NP groups had particle sizes below 200 nm, facilitating exploitation of the EPR effect. NPs prepared with ACD exhibited more homogeneous particle sizes and lower polydispersity index (PDI) values compared to PCD NPs. Evaluation of loading efficiency and stability revealed no significant differences between the two CD groups. Morphologically, spherical NPs were observed, but PCD groups were more prone to aggregation due to their polymeric structure composed of multiple CD units, which are challenging to control. The reason for this is that the polymeric structure consists of the combination of many CD units making it difficult to control their numbers. The anticancer effectiveness of our NPs has been clearly demonstrated through cell culture studies. ACD NPs loaded with active targeted drugs were found to be more effective than PCD NPs in both antiproliferative effect and cholesterol extraction, but both groups are much more effective than drug solutions on cancer cells. Particularly notable was the reduction in Survivin levels with active targeted and drug loaded ACD NP, indicating enhanced potential for inducing apoptosis.

Overall, the final formulations—NP derived from Gua-CD actively targeted by RTX and loaded with three different anticancer drugs—proved highly effective in reducing NHL cancer cell viability in cell culture studies. In vitro characterization studies confirmed the stability, homogeneity, and reliability of these particles, suggesting their promising potential as a new treatment approach for NHL.

CRedit authorship contribution statement

Nurbanu Demirtürk: Writing – original draft, Validation, Project administration, Methodology, Investigation, Data curation. **Gamze Varan:** Writing – review & editing, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Sadık Kağa:** Writing – review & editing, Methodology, Data curation. **Milo Malanga:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Data curation. **Erem Bilensoy:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Erem Bilensoy reports financial support was provided by Scientific and Technological Research Council of Turkey. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgement

TÜBİTAK ARDEB, BİDEB ve Horizon MSCA BICYCLOS This project has received funding from the European Union's Horizon Europe research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement Bicyclos N° 101130235. Views and opinions expressed are however those of the author(s) only and do not necessarily reflect those of the European Union. Neither the European Union nor the granting authority can be held responsible for them.

References

- Ahn, J., Lee, B., Choi, Y., Jin, H., Lim, N.Y., Park, J., Kim, J.H., Bae, J., Jung, J.H., 2018. Non-peptidic guanidinium-functionalized silica nanoparticles as selective mitochondria-targeting drug nanocarriers. *J. Mater. Chem. B* 6, 5698–5707.
- Akkan, S., Varan, G., Aksit D., Malanga, M., Ercan, A., Şe,n M., Bilensoy, E., 2022. "A different approach to immunochemotherapy for colon Cancer: Development of nanoplexes of cyclodextrins and Interleukin-2 loaded with 5-FU" *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 623, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121940. American Cancer Society, 2020 <https://www.cancer.org/cancer/types/lymphoma.html> Last access date: 21 march 2024.
- Ansell, S.M., Arendt, B.K., Grote, D.M., Jelinek, D.F., Novak, A.J., Weller, L.E., Remstein, E.D., Fielding, A., 2004. Inhibition of survivin expression suppresses the growth of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 18 (3), 616–623.
- Bilensoy, E., 2010. Cationic nanoparticles for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* 7 (7), 795–809. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.485983>. PMID: 20446858.
- Cannella, V., Altomare, R., Chiaramonte, G., Di Bella, S., Mira, F., et al., 2019. Cytotoxicity Evaluation of Endodontic Pins on 1929 Cell Line. *Biomed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2019/3469525>.
- Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, Myklebust JH, Varghese B, Gill S, Jan M, Cha AC, Chan CK, Tan BT, Park CY, Zhao F, Kohrt HE, Malumbres R, Briones J, Gascoyne RD, Lossos IS, Levy R, Weissman IL, Majeti R. 2010. "Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma" *Cell*. Sep 3;142(5):699-713.
- Çirpanlı, Y., Bilensoy, E., Lale, D.A., Çaliş, S., 2009. Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (1), 82–89.
- Coiffier, B., Sarkozy, C., 2016. Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? *Hematology* 1, 366–378.
- Crockett, D.G., Armitage, J.O., Vose, J.M. 2018. "Diagnosis and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma of Adults". *Neoplastic Diseases of the Blood*. Editors: Wiernik P., Dutcher J., Gertz M. Springer.
- Decaup, E., Jean, C., Laurent, C., Gravelle, P., Fruchon, S., Capilla, F., Marrot, A., Saati, T.A., Frenois, F.X., Laurent, G., Klein, C., Varoquaux, N., Savina, A., Fournie, J.J., Bezombes, C., 2013. Anti-tumor activity of obinutuzumab and rituximab in a follicular lymphoma 3D model. *Blood Cancer J.* 3 (8), e131.

- Demirtürk, N., Bilensoy, E., 2022. Nanocarriers targeting the diseases of the pancreas. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 170, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.11.006>. PMID: 34852262.
- Devrim, B., Bozkır, A., Canefe, K., 2011. Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhlL-2: I. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *J. Microencapsul.* 28 (6), 582–594.
- Ding, Y., Nielsen, K.A., Nielsen, B.P., Boje, N.W., Müller, R.H., Pyo, S.M., 2018. 'Lipid-drug-conjugate (LDC) solid lipid nanoparticles (SLN) for the delivery of nicotine to the oral cavity—optimization of nicotine loading efficiency'. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 128, 10–17.
- Dong, X., Wang, W., Qu, H., Zheng, J., Sun, G., 2015. Targeted delivery of doxorubicin and vincristine to lymph cancer: evaluation of novel nanostructured lipid carriers in vitro and in vivo. *Drug Deliv.* 23, 1374–1378.
- Emadi, A., Jones, R.J., Brodsky, R.A., 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6 (11), 638–647.
- Ercan, A., Celebier, M., Öncül, S., Varan, G., Koçak, E., Benito, J.M., Bilensoy, E., 2021. Polycationic cyclodextrin nanoparticles induce apoptosis and affect antitumoral activity in HepG2 cell line: An evaluation at the molecular level. *Int. J. Pharm.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120379>.
- Erdog r, N., Akkin, S., Nielsen, T.T., et al., 2021. Development of oral aprepitant-loaded chitosan-polyethylene glycol-coated cyclodextrin nanocapsules: formulation, characterization, and pharmacokinetic evaluation. *J. Pharm. Investig.* 51, 297–310. <https://doi.org/10.1007/s40005-020-00511-x>.
- Fu, Y., Wang, X., Zhang, Y., Liu, Z., Xue, W., 2015. Effect of cyclodextrins on the structure and functions of blood components in vitro. *J. Bioact. Compat. Polym.* 30 (5), 541–554. <https://doi.org/10.1177/0883911515585184>.
- Ganassin, R., Merker, C., Rodrigues, M.C., Felipe, N., Ferreira, Q.S., da Silva, S.V., Ombredane, A.S., et al., 2018. Nanocapsules for the co-delivery of selol and doxorubicin to breast adenocarcinoma 4T1 cells in vitro. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 46 (8), 2002–2012.
- Ghrensasia, E., Mariotte, E., Azoulay, E., 2018. "Rituximab-related Severe Toxicity". Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2018. Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine. Editor: Vincent, J.L. Springer, Cham.
- Hedayati, S., Niakousari, M., Mohsenpour, Z., 2020. Production of tapioca starch nanoparticles by nanoprecipitation-sonication treatment. *Int. J. Biol. Macromol.* 143, 136–142.
- Iqbal, A., Iqbal, M.K., Sharma, S., Ansari, M.A., Najmi, A.K., Ali, S.M., Ali, J., Haque, S. E., 2018. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sci.* 218, 112–131.
- Juskevicius D, Dirnhofer S, Tzankov A. Genetic background and evolution of relapses in aggressive B-cell lymphomas. *Haematologica.* 2017 Jul;102(7):1139-1149. doi: 10.3324/haematol.2016.151647. Epub 2017 May 29. PMID: 28554945; PMCID: PMC5566014.
- Lamar, Z.S., 2016. The Role of Glucocorticoids in the Treatment of NonHodgkin Lymphoma. *Annals of Hematology & Oncology* 3 (7), 1103.
- Li, H., Zhang, G., Jiang, C., Zhang, F., Ke, C., Zhao, H., Sun, Y., Zhao, M., Chen, D., Zhu, X., Zhang, L., Li, B., Dai, J., Li, W., 2015. "Suppression of Rituximab-resistant B-cell lymphoma with a novel multi-component anti-CD20 mAb nanocluster". *Oncotarget.* Sep 15;6(27):24192-204.
- Li, J., Wu, H., 2006. Expression of survivin in human non-Hodgkin lymphoma and its correlation with proliferation and angiogenesis. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.* 26 (5), 504–507.
- Li, H., Zhang, G., Jiang, C., Zhang, F., Ke, C., Zhao, H., Sun, Y., Zhao, M., Chen, D., Zhu, X., Zhang, L., Li, B., Dai, J., Li, W., 2015a. Suppression of Rituximab-resistant B-cell lymphoma with a novel multi-component anti-CD20 mAb nanocluster. *Oncotarget* 6 (27), 24192–24204.
- Lopez, C.A., de Vries, A.H., Marrink, S.J., 2011. Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. *PLoS Comput Biol* 7, e1002020.
- Lymphoma Research Foundation, 2018 <https://lymphoma.org/understanding-lymphoma/> Last access date: 21 march 2024.
- Marshall, M.J., Stopforth, R.J., Cragg, M.S., 2017. Therapeutic antibodies: what have we learnt from targeting CD20 and where are we going? *Front. Immunol.* 8, 289045.
- Memişoğlu, E., Boçot, A., Özalp, M., Şen, M., Duchene, D., Hincal, A.A., 2003. Direct Formation of Nanospheres from Amphiphilic β -Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Pharm. Res.* 20 (1), 117–125.
- Memişoğlu-Bilensoy, E., Hincal, A., 2006. "Sterile, injectable cyclodextrin nanoparticles: Effects of gamma irradiation and autoclaving" *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 311, Issues 1–2.
- Mora, E., Smith, E.M.L., Donohoe, C., Herts, D.L., 2016. Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *Am. J. Cancer Res.* 6 (11), 2416–2430.
- Nupur, N., Chhabra, N., Dash, C., Rathore, A. S. 2018. "Assessment of structural and functional similarity of biosimilar products: Rituximab as a case study" *mAbs*, 10:1, 143-158.
- Plosker, G.L., Figgitt, D.P., 2003. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 63 (8), 803–843. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363080-00005>. PMID: 12662126.
- Santosh & Hu A., Che-Ming & Fu, Victoria & Zhang, Liangfang. 2011. "Nanoparticle drug delivery enhances the cytotoxicity of hydrophobic-hydrophilic drug conjugates" *J. Mater. Chem.* 22, 994-999. 10.1039/C1JM13834K.
- Saqr, A., Vakkil, M.R., Huang, Y.H., Lal, R., Lavasanifar, A., 2019. Development of Traceable Rituximab-Modified PEO-Polyester Micelles by Postinsertion of PEG-phospholipids for Targeting of B-cell Lymphoma. *ACS Omega* 4 (20), 18867–18879.
- Seripracharot, C., Sinthuvanich, C., Karpkird, T., 2022. Cationic cyclodextrin-adamantane poly(vinyl alcohol)-poly(ethylene glycol) assembly for siRNA delivery. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 68 (103052).
- Singh, S.K., Pokalwar, S., Bose, S., Gupta, S., Almal, S., Ranbhor, R.S., 2018. "Structural and functional comparability study of anti-CD20 monoclonal antibody with reference product" *Biologics.* Nov 23;12:159-170.
- Song, X.D., Kong, X., He, S.F., Chen, J.X., Sun, J., Chen, B.B., Zhao, J.W., Mao, Z.W., 2017. Cyclometalated iridium(III)-guanidinium complexes as mitochondria-targeted anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* 29 (138), 246–254.
- Song, L., Zhang, W., Chen, H., Zhang, X., Wu, H., Ma, M., Wang, Z., Gu, N., Zhang, Y., 2019. Apoptosis-promoting effect of rituximab-conjugated magnetic nanoparticles on malignant lymphoma cells with CD20 overexpression. *Int. J. Nanomed.* 14, 921–936.
- Szente, L., Singhal, A., Domokos, A., Song, B., 2018. Cyclodextrins: Assessing the Impact of Cavity Size, Occupancy, and Substitutions on Cytotoxicity and Cholesterol Homeostasis. *Molecules (basel, Switzerland)* 23 (5), 1228.
- Thermo Fisher Scientific Inc., 2011. <https://tools.thermo.com/content/sfs/manuals/MAN0011309.NHIS.SulfonHIS.UG.pdf> (accessed 03.05.2024).
- Tian, B., Hua, S., Liu, J., 2020. "Cyclodextrin-based delivery systems for chemotherapeutic anticancer drugs: A review" *Carbohydrate. Polymers* 232, 115805.
- Torchilin, V.P., 2010. Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example. In: Schäfer-Korting, M. (Ed.), *Drug Delivery. Handbook of Experimental Pharmacology*, 197. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_1.
- Varan, G., Akkin, S., Demirtürk, N., Benito, J.M., Bilensoy, E., 2021. Erlotinib entrapped in cholesterol-depleting cyclodextrin nanoparticles shows improved antitumoral efficacy in 3D spheroid tumors of the lung and the liver. *J. Drug Target.* 29 (4), 439–453. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1853743>.
- Varan, C., Bilensoy, E., 2017. Cationic PEGylated polycaprolactone nanoparticles carrying post-operation docetaxel for glioma treatment. *Beilstein J. Nanotechnol.* 1446–1456 <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.144>.
- Varan, G., Varan, C., Erdog r, N., Hincal, A.A., Bilensoy, E., 2017. "Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles" *Int J Pharm.* 2017 Oct 15;531(2):457-469. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.06.010. PMID: 28596142.
- Varan, G., Öncül, S., Ercan, A., Benito, J.M., Mellet, O.C., Bilensoy, E., 2016. Cholesterol-Targeted Anticancer and Apoptotic Effects of Anionic and Polycationic Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 105 (10), 3172–3182.
- Varan, G., Patrula, V., Borchard, G., Bilensoy, E., 2018. Cellular Interaction and Tumoral Penetration Properties of Cyclodextrin Nanoparticles on 3D Breast Tumor Model. *Nanomaterials* 8, 67. <https://doi.org/10.3390/nano8020067>.
- Visani, G., Isidori, A., 2009. Nonpegylated liposomal doxorubicin in the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma: where we stand. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 9 (3), 357–363.
- Wang, X., Zhang, H., Chen, X., 2019. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist* 2, 141–160.
- Yokoo, M., Kubota, Y., Motoyama, K., Higashi, T., Taniyoshi, M., et al., 2015. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. *PLoS One* 10 (11), e0141946.

9. ÖZGEÇMİŞ