



# Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanserinin Tedavisinde Nanopartiküllerin Rolü

## Role of Nanoparticles in the Treatment of Noninvasive Bladder Cancer

Dr. Erem Bilensoy<sup>1</sup>, Uzm. Ecz. Nazlı Erdoğar<sup>1</sup>, Dr. Aydın N. Mungan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye

### Özet

Mesane kanseri dünyada en yaygın görülen dokuzuncu kanser türü olup yüzeysel mesane kanseri, kanser hücrelerinin morfolojisine bağlı olarak bütün mesane kanseri türlerinin %90'ını oluşturmaktadır. Tedavi yöntemi olan transüretral rezeksiyonu (TUR) takiben nüks oranı %50-80 arasında olup hastalığın ilerlemesi ise %14 civarındadır. Bu nedenle nüksü geciktirmek ya da önlemek adına intravezikal kemoterapi ya da immünoterapiye ihtiyaç duyulmaktadır. Intravezikal ilaç uygulama yöntemi, mesanenin ulaşılabilir ve kapalı bir bölge olması nedeniyle manipülasyona uygun olması, kateterin kolayca erişimi ve ilaçların direkt verilmesi sonucu dokularla yüksek miktarda etkileşiminin sağlanması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Diğer taraftan periyodik boşalma sonucu görülen hızlı ilaç dilüsyonu kateterizasyonun tekrarlanmasına neden olmakta, ilaç etkinliğini azaltmaktadır. Aynı zamanda ürotelyumun yapısından dolayı sistemik dolaşıma geçecek olan moleküllerin absorpsiyonu kısıtlanmakta ve tümörlü mesane dokusuna ilaçların etkili difüzyonu engellenmektedir. Günümüzde nanoteknolojinin biyomedikal alanda uygulamaları giderek artmakta olup mesane kanserinde kemoterapi ile ortaya çıkan bu problemlerin üstesinden gelmek için yeni ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde durulmakta ve bu kapsamda da biyoadeziv nanopartiküller geliştirilmektedir. Nanopartiküller, submikron boyutta, genellikle 10 ile 1000 nanometre arasında değişen çapta, spesifik fizikokimyasal özelliklere sahip polimerlerden hazırlanan ve ilaç yüklenerek taşıyıcı sistem olarak kullanabilen, katı, koloidal partiküllerdir. Nanopartiküller ile mukozal bir doku olan mesane duvarında ilaçların kalış süresi uzatılmakta ve mesane permeabilite bariyeri geçilebilmektedir. Sahip oldukları büyüklük ve yüzey yükü sayesinde, mukozayla etkileşim artmakta buna bağlı olarak ilacın kanserli dokularda salımı uzatılmaktadır. İlaç asidik idrar pH'sından korunarak biyolojik membranlardan adsorpsiyonun artışı sağlanmakta, böylece bir ilaç rezervuarı oluşturulmaktadır. Bu çalışmada güncel literatür bilgileri kullanılarak nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeysel mesane kanserindeki uygulama alanları, rolü ve grubumuzca bu konuda yapılan çalışmalar derlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mesane kanseri, nanopartikül, intravezikal, mitomisin C, BCG

### Summary

Bladder cancer is the ninth most common cancer types in the world and transitional bladder cancer constitutes 90% of all bladder cancer neoplasms depending on cancer cell morphology. Clinical choice of treatment is transurethral resection (TUR), after which the recurrence rate is 50-80% and the tumor has a 14% chance of progression. To avoid recurrence and progression, adjuvant intravesical chemotherapy or immunotherapy is required. Intravesical drug delivery has many advantages. Bladder allows manipulation since it is easily accessible and a closed area, allows catheterization rendering this organ to be an advantageous site for localized drug delivery. Drugs are administered into urinary bladder directly resulting in greater exposure of tissues to drug. On the other hand, because of periodical discharge, rapid drug dilution necessitates repeated catheterization and results in loss of drug efficacy. Another disadvantage is the very low permeability of urothelium. Urothelium limits the absorption of molecules into the systemic circulation and prevent adherence of foreign agents on the urothelial surface exerting the same effect of drugs and drug delivery systems. To overcome these problems, nanotechnological approach in the biomedical field seems promising and in this frame new drug carrier systems were focused and bioadhesive nanoparticles were developed. Nanoparticles are submicron, solid, colloidal particles in a size ranging between 10 to 1000 nm. Nanoparticles are generally prepared from biodegradable polymers with specific physicochemical properties and are loaded with active molecules to act as drug delivery systems. Bioadhesive nanoparticles allow prolonged residence time of drug in the mucosal tissues such as bladder wall and can be promising to pass the bladder permeability barrier. Due to their particle size and surface charge, they sustain the drug release at cancerous tissues and protect the drug from acidic urine pH and other degradation factors such as hydrolysis and photodegradation. In addition, nanoparticulate carriers form a drug reservoir in the action site to reduce drug loss and to improve drug efficacy. In this study, we aim to review the role and application of nanoparticles in noninvasive bladder tumors with current literature.

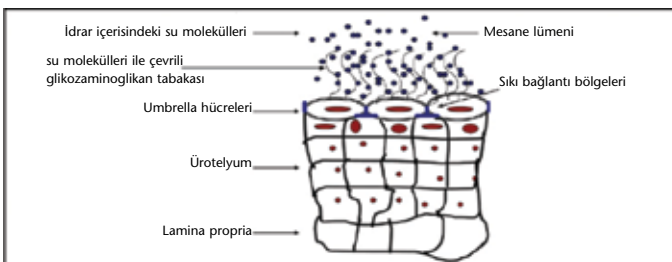
**Key Words:** Bladder cancer, nanoparticle, intravesical, mitomycin C, BCG

## Giriş

Mesane kanseri en sık teşhis edilen kanser türlerinden birisi olup dünya çapında görülme sıklığı dokuzuncu sıradadır (1). Mesane kanserlerinin %70-80'i kasa invazif olmayan türdendir ve tedavi endoskopik rezeksiyon işlemi ile sağlanmaktadır. Transüretral rezeksiyon işlemi mesane duvarından tümör nodülünün cerrahi olarak çıkarılması işlemidir. Bununla birlikte transüretral rezeksiyonu takiben beş yıl içerisinde kasa invazif olmayan kanserlerin %50-70'i tekrar görülmekte ve %20-30'u tümörün daha ileri bir evreye nüksetmesi sonucu metastazla sonuçlanmaktadır (2,3). Mesane kanserinin tedavisinde en sık kullanılan terapötik yaklaşım transüretral rezeksiyonu takiben intravezikal terapidir.

## Intravezikal Terapi

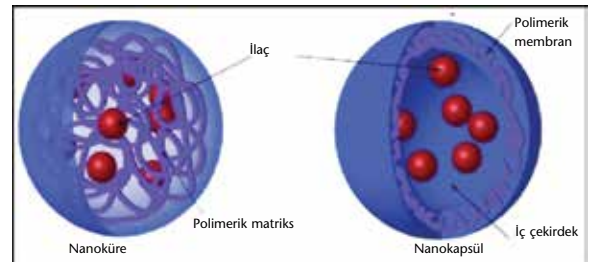
Intravezikal terapi, lokal kemoterapi boyunca tümör nüksünün ilerlemesini azaltmak veya önlemek için ilaçların mesane içine kateter yardımıyla direkt olarak verilmesidir (4). Intravezikal terapinin etkinliği; ilacın mesane duvarındaki kalış süresine, mesane duvarına yapışma ve penetre olma yeteneğine bağlıdır (5). Mesaneye ilaçların direkt verilmesi sonucu ilk geçiş etkisinden kurtulmuş olup etkili ve yüksek dozda tedavi sağlanabilmekte ve düşük yan etkiler gözlenebilmektedir (6). Aynı zamanda mesane manipülasyona uygun bir organ olup üretra aracılığıyla ulaşımı kolaydır. Ürotelyum, idrarla kan dolaşımı arasında bariyer görevi görerek sistemik absorpsiyonu ve potansiyel toksisiteyi azaltmaktadır (7). Ancak intravezikal ilaç taşınımı mesane fizyolojisine bağlı olarak gelişen çeşitli faktörlerden dolayı etkisiz olabilir. Yaklaşık olarak her iki saatte bir mesanenin periyodik olarak boşaltılması gerekliliği bu faktörlerden en önemlisidir. Bu durumda ilaç idrarla hızlı bir şekilde dilüe olmakta, ilaç konsantrasyonunda görülen azalma sonucu tekrarlayan kateterizasyon gerekmektedir (5,6,8). Tekrarlanan intravezikal terapi idrara çıkma sırasında irritasyona sebep olmakta, mesanede fibrozis, enfeksiyon ve kemoterapötik ajanlar vücutta çeşitli toksik etkiler ortaya çıkarabilmektedir (5). Diğer bir dezavantaj ise 'mesane permeabilite bariyeri' olarak adlandırılan ürotelyumun düşük permeabilitesidir (Şekil 1). Ürotelyum glikozaminoglikan müsin tabakasından oluşmakta ve bu tabaka derin dokulara moleküllerin mukozal absorpsiyonunu sınırlandırmakta aynı zamanda tedavi sırasında ilaçların mesane mukozasına adezyonunu önlemektedir (5,8). Günümüzde biyoadeziv nanopartiküllerle mesanede ilaç taşıyıcı sistemlerin kalış süresini uzatmak, dokulardan ilaç alımını arttırmak ve permeabiliteyi düzeltmek için çeşitli teknolojik yaklaşımlar geliştirilmektedir.



Şekil 1. Mesane permeabilite engeli

## Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Kanser Tedavisindeki Rolü

Nanoteknoloji, kemoterapi ajanlarına seçici sitotoksikite profili sağlayan ve böylece hedeflenmiş tedavi ile yan etkileri azaltan yaklaşımlarla kanser tedavisinde önemli bir etki oluşturma potansiyeline sahiptir (9,10). Nanopartiküller istenen bölgeye kontrollü bir şekilde ilaçların taşınmasında kullanılmak üzere, biyoparçalanır, biyodegradabl, sentetik polimerler, lipitler ve inorganik materyallerden oluşan, nano boyutta, düzenli şekilde disperse olmuş partiküllerdir. Nanopartiküller, ilaç moleküllerini tümörlü dokuya ulaştırırken ilacı ya enkapsüle ederek ya da nanopartikül yüzeyine ilaç moleküllerini kovalent bağlı olarak taşırlar. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler kanser tedavisinde çok fazla sayıda avantaja sahiptir. Nanopartiküller saklama ve raf ömrü sırasında ve fizyolojik koşullar altında ilacın parçalanmasını azaltarak stabilitesini düzeltirler. İlacın biyoyararlanımı için gerekli ilk basamak olan çözünürlüğünü, ve permeabilitesini dolayısıyla da farmakokinetik ve farmakodinamik profilini düzeltirler. Pasif ve aktif hedeflendirme yöntemleri ile sağlıklı dokularda biriken ilaç konsantrasyonunu ve buna bağlı olarak gelişen toksik yan etkileri azaltır, EPR etkisi ve aktif hedeflendirme ve tümöre penetrasyon sağlayan yüzey modifikasyon yöntemleri ile tümörlü dokuda ilaç konsantrasyonunu artırır ve ilacın organelere spesifik taşınımını ve hücre içi internalizasyonu iyileştirir. Bütün bu avantajlar ile zayıf farmakokinetiğe sahip etkili ilaçlar için nanopartiküllerin kullanımı sağlanmaktadır. Geçtiğimiz son iki yılda, kanser terapisi için çok sayıda nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem değerlendirilmiştir. Bazıları kliniğe taşınmış ya da ilerleyen prelinik evreler için araştırılmaya başlanmıştır (11). Nanopartiküller, nanoküre ve nanokapsülleri içeren, büyüklükleri 1 ile 1000 nm arasında değişen, koloidal partiküller olarak tanımlanır. Genellikle ilaçlar enkapsüle halde ya da yüzeye disperse/adsorbe edilerek taşınır (Şekil 2) (12,13). Nanopartiküller in situ polimerizasyon ya da önceden oluşturulan polimerlerden hareketle emülsiyon/çözücü buharlaştırma, nanopresipitasyon, çapraz bağlama, iyonotropik jelyasyon gibi farklı tekniklerle hazırlanmaktadır (14). Nanoküreler ilacın polimer matrikste çözündüğü, hapsoldüğü, enkapsüle olduğu, kimyasal olarak bağlandığı ya da adsorbe olduğu, matriks tipi, katı, koloidal partiküllerdir. Partikül büyüklükleri genellikle 100-200 nanometre arasında olup oldukça polidispers yapıya sahiptirler (12). Saklama sırasında iyi bir stabilite ve uzun yarılanma ömrü sergilerler. Bu özellikleri nanokürelerin hedef organ veya dokulara hedeflenmelerini sağlamaktadır. Genellikle küresel şekillidirler ancak literatürde farklı şekillere de rastlanmaktadır (14).



Şekil 2. Nanoküre ve nanokapsüllerin yapıları

Nanokapsüller ise koloidal büyüklükte, veziküler sistemler olup ilacın bir rezervuar olarak ya da polimerik membran tarafından çevrili iç çekirdekten oluşan kavitede olduğu yapılarıdır (12,13,15). Kavite etkin maddeyi sıvı, katı ya da moleküler dispersiyon halinde içerebilir (16). Diğer taraftan rezervuar kullanılan materyale ve hazırlama metoduna göre lipofilik ya da hidrofilik olabilir. Nanokapsüller ilaçları yüzeylerinde ya da polimerik membran içine hapsederek taşırlar.

## Nanopartiküllerle Mesane Tümörlerinde Güncel Tedavi Yaklaşımları

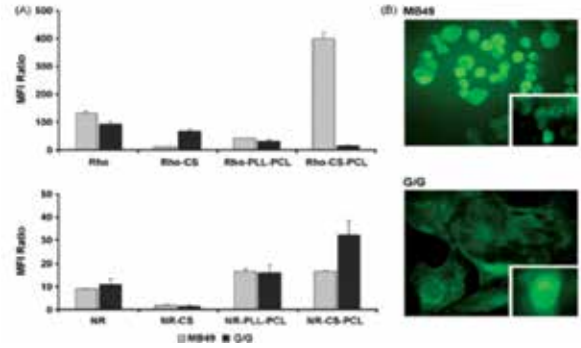
Yüzeysel mesane kanseri görülen hastalarda en sık kullanılan intravezikal ajanlar mitomisin C (MMC), tiyotepa, etoglusid, doksorubisin ve epirubisin gibi antrasiklinler, Bacillus Calmette Guerin (BCG), taksol ve yeni mitomisin türevi olan KW-2149'dur (17).

2012 yılında grubumuz tarafından yapılan çalışmada, MMC kullanılarak biyoadeziv ve katyonik özellikte nanopartikül formülasyonları geliştirilmiştir (18). MMC idrar pH'sında stabil olmayan bir ilaç olup sistemik alım süresince doza bağlı olarak çeşitli alerjik reaksiyonlar ve kimyasal sistit gözlenebilmektedir (19,20). Aynı zamanda mesanenin periyodik olarak boşaltılması gerekliliği sonucu ilaç kaybı fazla olmaktadır. Tüm bu problemlerin üstesinden gelmek için mukoadezif katyonik bir polimer olan kitosan nanopartikülleri (CS) nanopresipitasyon yöntemi ile, diğer yandan kitosan kaplı polikaprolakton nanopartikülleri (CS-PCL) ve poli-l-lizin kaplı polikaprolakton nanopartikülleri (PLL-PCL) ise çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. İn vitro karakterizasyon çalışmalarında nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, yüzey yükü, enkapsülasyon etkinliği ve in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında nanopartiküllerin özellikle CS-PCL'nin MB49 mesane karsinoma hücre hattında hücrelerle yüksek oranda etkileştiği, hücre alımının arttığı gözlenmiştir. Bu artış sağlıklı mesane hücre hattı olan G/G hücrelerinden alımla karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermektedir (Şekil 3).

İn vivo çalışmalar başlığı altında ise sağlıklı rat modelinde ilacın mesanede kalış süresi ve MMC verilisinin idrar hacmi üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; partikül büyüklüğü 160-320 nm arasında olup pasif hedeflendirmeye yani tümör dokusundaki poröz vasküler epiteller aracılığıyla birikime uygun bulunmuştur. Yüzey yükü 10-35 mV arasında ve pozitif yüklüdür. Enkapsülasyon etkinliği çalışmaları sonucu, hidrofilik özellikte olan MMC'nin kullanılan çift emülsiyon yöntemi ile etkinliğinin arttığı ispatlanmış, kitosan kaplı polikaprolakton nanopartiküllerinde (CS-PCL) en yüksek enkapsülasyon etkinliğine rastlanmış ve ilacın %35'i nanopartikül içine hapsedilebilmiştir. MMC çözeltisi ve MMC yüklü nanopartikül formülasyonları için iki farklı pH'da (pH 6,0 ve pH 7,8) in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. Bütün nanopartikül formülasyonlarında her iki pH'da da hızlı ve tamamlanmış bir salım gözlenirken, MMC'nin çözelti formu ise salım süresince pH 6,0'da stabil bulunmamıştır. İn vivo çalışmalar kapsamında ilk olarak MMC çözeltisinin ve MMC yüklü nanopartikül formülasyonlarının mesanede kalış süresi tayin edilmiştir. Bu amaçla 24 erkek Sprague-Dawley cinsi siçana kanül yardımıyla intravezikal yoldan ilaç verilmesini takiben bir gün boyunca metabolik kafeste tutularak belirli zaman aralıklarında (2., 4. ve 6. saatlerde) idrar örnekleri toplanmıştır (Şekil 4).

Toplanan örnekler santrifüj edilerek yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde MMC miktarının tayini yapılmıştır. Nanopartiküllerin sahip oldukları biyoadeziv ve katyonik özelliklerinden dolayı güçlü mukozal ve hücreyel etkileşimler gözlenmiş, MMC çözeltisine göre önemli oranda bir farklılıkla mesanede kalış süreleri uzun bulunmuştur (Şekil 5).

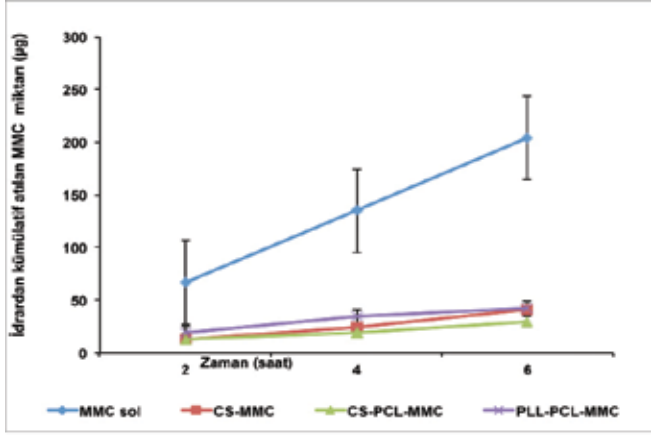
Şekil 5, MMC çözeltisi ve MMC yüklü farklı biyoadeziv nanopartikül formülasyonları için idrardan kümülatif atılan MMC miktarları ilacın mesanede kalış süresi ile ilgili bilgi vermektedir. Aynı zamanda MMC çözeltisinin idrardan atılan miktarı nanopartikül formülasyonları ile karşılaştırıldığında oldukça



Şekil 3. Normal mesane epitel ve malign kanser hücre hatlarından floresan biyoadeziv nanopartiküllerin hücreyel alımı (A-Rodamin 123 ve Nil kırmızısı yüklü nanopartiküllerle tedavi edilen MB49 ve G/G hücre hattında yapılan akış sitometrisi analizlerinden elde edilen ortalama floresan intensiteleri B-Rodamin-CS-PCL nanopartikülleriyle tedavi edilen MB49 ve G/G hücre hatlarının fotomikrografları) (21) Normal mesane epitel ve malign kanser hücre hatlarından floresan biyoadeziv nanopartiküllerin hücreyel alımı (A-Rodamin 123 ve Nil kırmızısı yüklü nanopartiküllerle tedavi edilen MB49 ve G/G hücre hattında yapılan akış sitometrisi analizlerinden elde edilen ortalama floresan intensiteleri B-Rodamin-CS-PCL nanopartikülleriyle tedavi edilen MB49 ve G/G hücre hatlarının fotomikrografları) (21)



Şekil 4. Metabolik kafeste tutulan siçanlarda yapılan idrar toplama çalışmalarından bir kesit



Şekil 5. Mitomisin C (MMC) çözeltisi ve MMC yüklü farklı biyoadeziv nanopartikül formülasyonları için idrardan kümülatif atılan MMC miktarları (18)

fazladır. İdrar hacmi açısından bir değerlendirilme yapıldığında ise sıçanlardan örnek alımı sırasında idrar miktarları kaydedilmiş ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Yani kullanılan polimerlerin şişmesi sonucu idrar yollarında olabilecek herhangi bir tıkanıklığa veya mesanede herhangi bir irritasyona rastlanmamıştır (18).

Elde edilen bilgiler ışığında MMC'nin nanopartiküllerle düşük dozda verilerek rezervuar bir sistem oluşturabileceği ve böylece kateterizasyon sıklığının azaltılarak intravezikal kemoterapinin etkinliğinin artırılabilmesi sonucuna varılabilir. Mesane mukozasında düzelen ilaç konsantrasyonu lokal verilmiş bölgede ilacın artan epitelyal difüzyonu sayesinde mesane bariyerinin üstesinden gelmektedir. Küçük partikül büyüklüğü, nanopartiküller arası sterik engeli azaltarak glikozaminoglikan adı verilen tabakadaki uzun zincirler arasında nanopartikül permeabilitesini arttırmış, bu sayede dokuda yüksek konsantrasyonda ilaç birikimi sağlamıştır. İn vitro salım çalışmalarında, nanopartiküllerin geniş yüzey alanına sahip olması sonucu her iki pH'da da hızlı ve tamamlanmış bir salım gözlenmiştir. Stabilité açısından nanopartiküller salım boyunca MMC'yi asidik pH'dan koruyarak ilacın stabilitesini sağlamıştır. MMC çözeltisi ile karşılaştırıldığında ilaç yüklü katyonik nanopartiküllerden ümit vaat edici veriler elde edilmiştir. Sahip olduğu pozitif yüzey yükü nedeniyle biyolojik membranlarla etkileşim ve yüksek mukoadezyon sayesinde bütün katyonik nanopartiküller mesanede daha uzun süre kalmıştır. Diğer etkileyici parametre ise ilacın nanopartiküle bağlı formundan yavaşça ayrılmasıdır. Bütün bu parametreler MMC'nin mesanede kalış süresini uzatmakta buna bağlı olarak da mesane duvarında permeabilitede artış ve etkinlikte artış gözlenmektedir. Aynı zamanda kitosanın kaspaz-3 aktivatörü olarak intrinsik antikanser etkinliği de bu ümit vaat edici sonuçların doğmasına sebep olmaktadır (18).

Bu çalışmanın devamı olarak aynı grup tarafından 2014 yılında yayınlanan çalışmada katyonik çekirdek-kabuk nanopartiküller kullanılarak tümör oluşturulmuş sıçanlarda intravezikal kemoterapinin güvenliği ve etkinliği çalışmaları yapılmıştır (8). Antitümör etkinlik çalışmaları; sağ kalım oranı, histopatolojik değerlendirme, mesane ağırlığı ve MMC'nin sistemik dolaşıma geçişinin değerlendirilmesi olmak üzere dört başlık altında

değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında öncelikle 42 erkek Sprague Dawley cinsi sıçanda 8 hafta boyunca içme suyuna BBN koyulmak üzere yüzeysel mesane kanseri oluşturulmuştur. Daha sonra MMC çözeltisi, kitosan nanopartikülleri, kitosan kaplı polikaprolakton nanopartikülleri, MMC yüklü kitosan nanopartikülleri ve MMC yüklü kitosan kaplı polikaprolakton nanopartikülleri tümör indüklenmiş sıçanlara 4 hafta boyunca haftada bir olmak üzere intravezikal yolla uygulanmıştır. Bunun dışında pozitif kontrol grubu olan tümör indüklenmiş sıçanlara herhangi bir tedavi yöntemi uygulanmamıştır. Uygulamayı takiben bütün sıçanlar her gün düzenli olarak kontrol edilmiş, hematüri, ekstremitelerde kanlanma, kilo kaybı gibi parametreler açısından değerlendirme yapılmış, ölüm zamanları ve hayvan sayıları kaydedilerek grafik çizilmiş ve bütün formülasyonlar sağ kalım oranı açısından değerlendirilmiştir. On iki haftanın sonunda MMC yüklü kitosan kaplı polikaprolakton nanopartikülleri ile tedavi edilen grup en uzun sağ kalım oranına sahiptir. Sağ kalım oranı eğrisi negatif yüklü polikaprolaktonun pozitif yüklü kitosan ile kaplanması ile elde edilen kabuk-çekirdek nanopartiküllerinin MMC'nin intravezikal verilmesi için optimum formülasyon olduğunu doğrulamıştır. Bilensoy ve ark.'nın önceden yaptığı hücre kültürü çalışmalarıyla da çeşitli kanser hücrelerinde MMC yüklü kitosan kaplı polikaprolakton nanopartiküllerinin yüksek sitotoksik aktivite ve yüksek hücre salım gösterdiği ispatlanmıştır (21). Diğer taraftan literatürde ideal intravezikal tedavi için uygulama sayısı ve sıklığı net olmamasına karşın en sık kullanılan prosedür 8 haftadan bir yıla kadar ayda bir uygulama olmasıdır. Ancak ilacın verilmesi azaltılması ile azalan toksisite gözlenecek ve hastanın yaşam kalitesi artacaktır. Bizim uyguladığımız 8 haftalık tedavi şeması ile bu amaca erişilerek düşük dozda ve daha az sıklıkta verilmesi güvenli bir tedavi sağlanmıştır.

Histopatolojik değerlendirme için deney sonunda bütün sıçanların anestezisi altında mesaneleri çıkartılarak boşaltılmış ve mesane ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir. Sağlıklı hayvanlardan (negatif kontrol) elde edilen mesane ağırlık değerleri ile kıyaslama yapılarak tedavi edilen gruplarda ve pozitif kontrol grubundaki mesane ağırlığının yüzde cinsinden artışı hesaplanmıştır. Daha sonra mesaneler çeşitli işlemlere maruz bırakılarak transmisyon elektron mikroskobu altında histopatolojik değerlendirmeye tabi tutulmuştur. MMC çözeltisi ile tedavi edilen grupta tümör ilerlemesini doğrulayan yapıda atipik hücreler gözlenmiştir. Doku hasarı tespiti yapılarak bütün tedavi uygulanan gruplar değerlendirilmiştir. Buna ilave olarak tedavi uygulanmayan ancak tümör oluşturulan grupta tümör dokusunun oluştuğunu gösteren iğne benzeri yapılar rastlanmıştır. MMC yüklü kitosan kaplı polikaprolakton nanopartikülleri uygulanan grupta ise mitokondri normal yapısal bir görünüme sahip olup edema gözlenmemiştir. Hücre çekirdeği pürüzsüzdür yani genellikle hücreler sağlıklıdır. Aynı zamanda en fazla nanopartikül birikimi bu grupta gözlenmiş olup en uzun sağ kalım oranına sahip olması da durumla doğru orantılıdır (Şekil 6).

MMC'nin sistemik dolaşıma geçişinin kontrolü ise anestezisi altındaki sıçanlardan intrakardiyak yolla kan örnekleri alınmış ve çeşitli işlemleri takiben yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde MMC'nin analizi yapılmıştır. Yapılan çalışmanın amacı biyoadeziv özellikte nanopartiküllerle mesane yüzeyinde lokal etkiyi arttırmaktır. Bununla birlikte MMC sistemik dolaşıma geçtiğinde istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır. En sık görülen yan etki kemik iliği supresyonu, trombositopeni

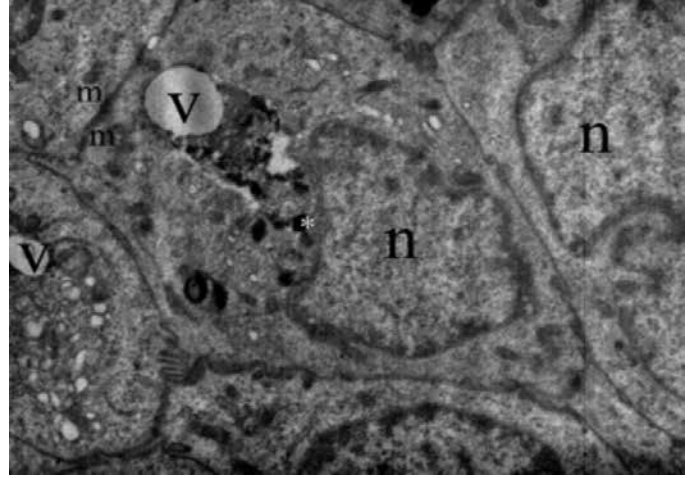
ve lökopenidir. Elde edilen analiz sonuçlarında bütün gruplarda kan sirkülasyonunda MMC'ye rastlanmamış olup bu durum bizim temel amacımızla korele olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak pozitif yüzey yüklü kaplama ajanı kitosanla negatif yüklü çekirdek polikaprolaktonun oluşturduğu nanopartikül formülasyonu mesane duvarının mukus jel tabakası boyunca iyileştirilmiş penetrasyonu, biyoçeçimliliğinin iyi olması, kitosan kaplamanın mukoadezif özellikleri, intrinsik antikanser özellikleri ve ürotelyal bariyer penetrasyonu özelliklerine sahip olması nedeniyle ümit vaat edici bir sistem olmuştur (8).

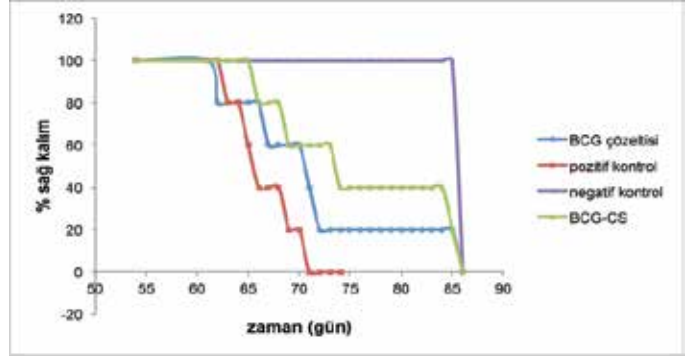
Biyoadezif nanopartiküllere örnek olarak grubumuzca yapılan çalışmalardan biri de mesane tümörü oluşturulmuş sıçan modelinde intravezikal immünoterapi için BCG yüklü kitosan nanopartiküllerinin antitümör etkinliğinin araştırılmasıdır. BCG immünoterapisi günümüzde sıklıkla kullanılmakla beraber intravezikal kemoterapi ile karşılaştırıldığında lokal ve sistemik reaksiyonlara sebep olduğu bilinmektedir. Bu duruma ilave olarak mesanede yaygın bir şekilde iltihaplı değişimler ve ateşten sepsise kadar değişebilen çok çeşitli yan etkiler gözlenmektedir. Çalışmamız kapsamında kitosan nanopartikülleri sahip oldukları pozitif yüzey yükü ve mukoadezif özellikleri ile bütün bu yan etkilerin üstesinden gelmek amaçlı geliştirilmişlerdir. Çalışmamızın amacı, mesane tümörü oluşturulmuş sıçan modelinde intravezikal verilişi takiben antitümör etkinlik açısından katyonik kitosan nanopartiküllerin optimizasyonudur. Antitümör etkinlik, BCG çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak histopatolojik değerlendirme ve sağ kalım oranı parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Şekil 7'de görüldüğü gibi, BCG yüklü nanopartiküller piyasada yer alan BCG'nin çözelti formu ile karşılaştırılmıştır. BCG yüklü nanopartiküllerle tedavi edilen sıçanların istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek hayatta kalım oranına sahip oldukları gözlenirken, BCG çözelti formu ile tedavi edilen grupta ise tedavinin 2. defa uygulanması aşamasında ölüm oranında ani artış görülmüştür. BCG ticari çözeltisinin sistemik yan etkilerinden biri olan hemoraji ve kanama görülmesi makroskopik olarak değerlendirilmiş ve bu etki nanopartikül formunda daha az gözlenmiştir. BCG'nin nanoenkapsülasyonu ile daha düşük doz ile tedavi sağlanarak doza bağlı yan etkilerde azalma sağlanmıştır.

Histopatolojik açıdan değerlendirme; negatif kontrol grubu (sağlıklı sıçan grubu), pozitif kontrol grubu (mesane kanseri oluşturulan ancak herhangi bir tedavi uygulanmayan grup), ticari BCG çözelti formu ile tedavi edilen grup ve BCG yüklü nanopartiküller ile tedavi edilen grup olmak üzere 4 grup üzerinden gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol grubunda oldukça sağlıklı bir mesane dokusu görünümüne rastlanırken, pozitif kontrol grubunda mesane kanserinin belirtisi olan hücreler atipik görünümde olup yüksek dejenerasyon gözlenmiştir. Ticari BCG çözelti formu ile tedavi edilen grupta atipik görünümü ifade eden çift çekirdek yapısı görülmüş ve fibrozis derecesi pozitif kontrol grubu ile eşdeğer bulunmuştur. Fibrozis tamamlanmamış veya etkili olmayan terapinin devamlılığını ifade etmektedir ve kanser hücrelerinde BCG çözeltisinin birikimi önemsiz orandadır. BCG yüklü CS nanopartikülleri ile tedavi edilen grupta ise mesane dokusunda hücre membranlarının etrafında, pozitif yüzey yüküne bağlı olarak yüksek oranda nanopartiküllerin akümüasyonu gözlenmiştir.



Şekil 6. Mitomisin C yüklü CS-PCL nanopartikül formülasyonu ile tedavi edilen gruba ait histopatolojik bir görüntü (m: mitokondri, v: vakuol, n: çekirdek, \*: nanopartiküller) (8)



Şekil 7. Tedavi edilen grupların hayatta kalım yüzdesi ( $p < 0,05$ )  $n=8$ /tedavi edilen grup (8)

Sonuç olarak yüzeysel mesane kanseri görülen hastalarda tümör ilerlemesi ve nüks etmesinin azaltılması etkili ve güvenli immünoterapi ile sağlanabilir. Kitosan gibi katyonik ve mukoadezif nanopartiküler taşıyıcılar, BCG'nin mesane ile etkileşimini arttırarak antitümör etkinliği düzeltmede, hayatta kalım süresini arttırmada ve lokal uygulanan BCG'nin sistemik alımından kaynaklı yan etkileri azaltmada umut vaat edici yaklaşımlardır (22).

## Sonuç

Nanopartiküllerle ilaçların intravezikal verilişi yüzeysel mesane kanserinin lokal kemoterapisi ve nüksü önlemek için umut vaat edici bir yaklaşımdır. Bu sistemlerle, mesanede ilacın kalış süresinin uzatılması ve hedef bölgede ilaç rezervuarının oluşması sağlanmaktadır. Geliştirilen nanopartiküller intravezikal yolla kolayca enjekte edilerek mesane duvarına kolayca yapışmaktadır. Sahip oldukları adeziv özellikler nedeniyle ilaç kaybı azalmakta ve mesanede daha uzun süre kalabilmektedirler.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## Kaynaklar

1. Zhang Q, Neoh GK, Xu L et al. Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles with Mucoadhesive and Sustained Drug Release Properties for Potential Bladder Cancer Therapy. *Langmuir* 2014;30:6151-6161.
2. Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, et al. Antitumor activity of the antimicrobialpeptide magainin II against bladder cancer cell lines. *Eur Urol* 2006;50:141-147.
3. Miyake H, Eto H, Hara I, et al. Synergistic antitumor activity by combined treatment with gemcitabine and antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in an intravesical administration model against human bladder cancer kotcc-1 cells. *J Urol* 2004;171:2477-2481.
4. Malmstrom PU. Intravesical therapy of superşcial bladder cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;47:109-126.
5. Jin S, Zhang Y, Yu C, et al. Transferrin-modified PLGA nanoparticles significantly increase the cytotoxicity of paclitaxel in bladder cancer cells by increasing intracellular retention. *J Nanopart Res* 2014;16:2639-2650.
6. Martin DT, Steinbach JM, Liu J, et al. Surface-modified nanoparticles enhance transurothelial penetration and delivery of survivin siRNA in treating bladder cancer. *Mol Cancer Ther* 2014;13:71-81.
7. Ahn JJ, McKiernan JM. Intravesical Therapy, In: Management of Bladder Cancer. Editors: Badrinath R. Konety, Sam S. Chang. Springer New York Heidelberg Dordrecht London, 2014:223-239.
8. Erdoglar N, İskit AB, Erođlu H, et al. Cationic core-shell nanoparticles for intravesical chemotherapy in tumor-induced rat model:Safety and efficacy. *Int J Pharm.* 2014;471:1-9.
9. Alexis F, Pridgen FM, Langer R, Farokhzad OC. Nanoparticle Technologies for cancer therapy. *Handb Exp Pharmacol* 2010;197:55-86.
10. Tiwari M. Nanocancer therapy strategies. *J Cancer Res Ther* 2012;8:19-22.
11. Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 2009;3:16-20.
12. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;65:259-269.
13. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010;385:113-142.
14. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res* 2009;26:1025-1058.
15. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery vehicles. *J Control Release* 2001;70:1-20.
16. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989;55:R1-R4.
17. Heijden van der AG, Witjes JA. Intravesical chemotherapy: an update-new trends and perspectives. *EAU Update Series* 2003;2:73-79.
18. Erdoğar N, İskit AB, Mungan AN. Prolonged retention and in vivo evaluation of cationic nanoparticles loaded with Mitomycin C designed for intravesical chmeotherapy of bladder tumors. *J Microencapsul* 2012;29:576-582.
19. Stolk LM, Fruijtier A, Umans R. Stability after freezing and thawing of solutions of mitomycin C in plastic minibags for intravesical use. *Pharm Weekbl Sci* 1986;8:286-288.
20. Thrasher JB, Crawford ED. Complications of intravesical chemotherapy. *Urol Clin North Am* 1992;19:529-539.
21. Bilensoy E, Sarisözen C, Esendađlı G, et al. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. *Int J Pharm* 2009;371:170-176.
22. Erdoğar N, İskit AB, Erođlu H et al. Antitümör efficacy of Bacillus Calmette Guerin loaded cationic nanoparticles for intravesical immunotherapy of bladder tumor induced rat model. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, accepted 2015.