

**KEMİK TÜMÖRLERİNDE LİPOZOMAL  
KANNABİNOİDLERİN RESEPTÖR ARACILI  
ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF RECEPTOR-MEDIATED  
ANTIPROLIFERATIVE AND APOPTOTIC EFFECTS OF  
LIPOSOMAL CANNABINOIDS ON BONE TUMORS**

**BAŞAK IŞIL ZORBA**

**PROF. DR. PETEK KORKUSUZ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

## ÖZET

# KEMİK TÜMÖRLERİNDE LİPOZOMAL KANNABİNOİDLERİN RESEPTÖR ARACILI ANTİPROLİFERATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Başak Işıl ZORBA**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ**

**Haziran 2022, 85 sayfa**

Primer osteosarkom hızlı metastaz özelliği ile bilinen, çocuklarda ve gençlerde en sık izlenen osteojenik tümördür. Klinikte uygulanan tedavi yöntemlerinin sınırlılıkları ve hastalarda görülen yan etkiler yeni tedavi ajanlarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Endokannabinoidler, insan kas-iskelet sisteminde sentezlendiği bilinen, osteoblast, osteoklast ve osteoprogenitör hücrelerde CB1, CB2 ve TRPV1 reseptörleri aracılığıyla kemik yapımı ve yıkımını düzenlediği bildirilmiş lipit yapılı ligandlardır. Kannabinoidlerin osteosarkom hücrelerinde CB2 veya TRPV1 reseptörleri aracılı hücre çoğalmasını azaltıcı ve apoptozu indükleyici etkileri bildirilmiştir. Hepatokarsinom ve endometriyum kanserinde antiproliferatif ve apoptotik etkinliği bildirilen sentetik spesifik CB2 reseptör agonisti CB65, CB2 reseptörü aracılı olarak osteosarkom hücrelerinde antiproliferatif ve apoptotik etki gösterebilir. CB65'in osteosarkom için ilaç adayı olarak kontrollü salımını sağlayabilecek ve biyoyararlanımını arttırabilecek

biyoyumlu lipozom taşıma sistemi kullanılabilir. Varsayımı test etmek amacıyla *in vitro* koşullarda deney ve kontrol gruplarını içeren gözlemsel bir çalışma tasarlanmıştır. Tez çalışmasında insan Saos-2 osteosarkom hücre hattında pozitif kontrol A549 hücrelerine göre qRT-PCR ile yüksek CB2 reseptör ekspresyonu saptanmıştır. İnsan MG63 ve Saos-2 hücrelerinde *in vitro* koşullarda akım sitometrisi ile hücre içi ve hücre zarındaki CB1 ve CB2 reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Buna göre MG63 ve Saos-2 hatlarında yüksek oranda CB2 immün işaretlenme saptanmıştır. MG63 ve Saos-2 hatlarında WST-1 ile saptanan  $10^{-12}$  –  $10^{-8}$  M antiproliferatif etkili doz penceresi gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile değerlendirildiğinde MG63 için  $1.11 \times 10^{-11}$  M ve Saos-2 için  $4.95 \times 10^{-11}$  M ED50 hesaplanmıştır. CB65'in osteosarkom hatlarındaki proliferasyonu azaltıcı etkisi CB2 antagonisti AM630 ile bloke olmuş, CB65'in CB2 reseptörü aracılı etki gösterdiği saptanmıştır. ED50 CB65, *Annexin/PI* işaretlemesi ile MG63 hücrelerinde geç apoptozu ilk 48 saatte %7.31 ve Saos-2 hücrelerinde ilk 24 saatte %19.06 oranında indüklemiştir. CB65, ince film oluşturma yöntemi ile lipozomal sisteme %51.12 oranla yüklenmiş ve 24 saatlik kontrollü salımı sağlanmıştır. Lipozomal sistemden  $1.11 \times 10^{-11}$  M CB65 salındığında gerçek zamanlı proliferasyon analizinde MG63 ve Saos-2 hücrelerinde 16. saatten 56. saate kadar hücre çoğalmasını azaltıcı etki göstermiştir. Sonuç olarak, yeni stabil ve erken etkili lipozomal CB65 yüklü kontrollü salım sistemi başarıyla oluşturulmuş ve *in vitro* koşullarda insan osteosarkom hücrelerindeki CB2 reseptör aracılı agonistik antiproliferatif ve apoptotik etkisi doğrulanmıştır. Ortopedik onkoloji klinikleri, *in vivo* validasyonun ardından ilaç adayını pediatrik kemik kanserlerini iyileştirmek için hedefli ve akıllı bir araç olarak kullanabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Osteosarkom, Kannabinoid, CB65, Lipozom

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF RECEPTOR-MEDIATED ANTIPROLIFERATIVE AND APOPTOTIC EFFECTS OF LIPOSOMAL CANNABINOIDS ON BONE TUMORS**

**Başak Işıl ZORBA**

**Master of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ**

**June 2022, 85 pages**

Primary osteosarcoma is the most common osteogenic tumor in children and adolescents, known with its rapid metastasis. The limitations of the treatment approaches applied in the clinic and the side effects observed in patients reveal the necessity of investigating novel treatment agents. Endocannabinoids are lipid-structured ligands that are known to be synthesized in the human musculoskeletal system and have been reported to regulate bone formation and resorption through CB1, CB2 and TRPV1 receptors in osteoblast, osteoclast and osteoprogenitor cells. Cannabinoids have been reported to reduce proliferation and induce apoptosis in osteosarcoma cells through CB2 or TRPV1 receptors. Synthetic specific CB2 receptor agonist CB65, which has been reported to have antiproliferative and apoptotic effect on hepatocarcinoma and endometrial cancer, may exert CB2 receptor-mediated antiproliferative and apoptotic effects on osteosarcoma cells. A biocompatible liposome delivery system can be used providing the controlled

release and increasing the bioavailability of CB65 as a drug candidate for osteosarcoma. To test the hypothesis, an *in vitro* observational study with experimental and control groups was designed. In the thesis, human Saos-2 osteosarcoma cell line showed higher CB2 receptor expression when compared to positive control A549 cells by qRT-PCR. The presence of intracellular and membrane CB1 and CB2 receptors was demonstrated by flow cytometry in MG63 and Saos-2 cell lines *in vitro*. Accordingly, high CB2 immunolabeling was detected in MG63 and Saos-2 lines. When dose and time-dependent antiproliferative dose range of  $10^{-12}$ – $10^{-8}$  M CB65, by WST-1, was applied to MG63 and Saos-2 lines, ED50 of  $1.11 \times 10^{-11}$  M for MG63 and  $4.95 \times 10^{-11}$  M for Saos-2 cells were calculated by real-time proliferation analysis. The antiproliferative effect of CB65 on osteosarcoma lines was inhibited by CB2 antagonist AM630, showing its CB2 receptor-mediated effect. ED50 CB65 induced late apoptosis of 7.31% of MG63 cells at 48 hours and 19.06% of Saos-2 cells at 24 hours by *Annexin/PI* labelling. CB65 was loaded into liposomal system with a ratio of 51.12% by thin film formation method and 24 hour-controlled release was achieved. Liposomes releasing a dose of  $1.11 \times 10^{-11}$  M CB65 reduced proliferation of MG63 and Saos-2 cells from 16–56 hours. In conclusion, a new stable and early effective liposomal CB65 delivery system has been successfully generated and validated for its CB2 receptor-mediated agonistic antiproliferative and apoptotic effect on human osteosarcoma cells *in vitro*. The orthopaedic oncology clinics might translate the new formulation as a targeted and smart tool for bone tumors to cure paediatrics bone cancers following *in vivo* validation.

**Keywords:** osteosarcoma, cannabinoid, CB65, liposome

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile hayatıma yön veren, desteğini her zaman hissettiren, çalışma disiplini ve iş ahlakını örnek aldığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Petek KORKUSUZ'a; her adımında yanımda olan, yol gösteren Özge BOYACIOĞLU'na; desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve olanaklarını paylaşan Sayın Prof. Dr. İpek EROĞLU ve Eczacılık Anabilim Dalı laboratuvar çalışmalarımız süresince destek veren Tuğba ÇAĞLAYAN'a; değerli katkıları için Sayın Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya; her konuda yanımda olduğunu hissettiğim çok sevgili ekip arkadaşlarım Eda DEDE ÇİFTÇİ, Merve GİZER, Dr. Sefa Burak ÇAM, Selin ÖNEN, Nazlıhan GÜRBÜZ ve Oya Elif DALDAL'a; daima yanımda olup destekleyen hayat arkadaşım Barış Berk ZORBA'ya; bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem, babam ve kardeşim İdil'e teşekkür ediyorum. Bu tez çalışmasına maddi destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (#TYL-2021-19573) teşekkür ediyorum.

Başak Işıl ZORBA

Haziran 2022, Ankara

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                                    |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                                                                                          | i    |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                     | iii  |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                                                                     | v    |
| İÇİNDEKİLER.....                                                                                                                                   | vi   |
| ŞEKİLLER .....                                                                                                                                     | ix   |
| ÇİZELGELER.....                                                                                                                                    | xii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                                                                                       | xiii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                                                     | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                                                                                             | 4    |
| 2.1. Kemik Tümörleri .....                                                                                                                         | 4    |
| 2.1.1. Osteosarkom Tedavisi .....                                                                                                                  | 5    |
| 2.2. Kannabinoid Sistemi, Endokannabinoidlerin Kemikte Dağılımı ve Etkileri.....                                                                   | 6    |
| 2.3. Kannabinoidler ve Kemik Tümörleri.....                                                                                                        | 9    |
| 2.4. Sentetik Spesifik CB2 Reseptör Agonisti CB65.....                                                                                             | 10   |
| 2.5. Kannabinoidler için İlaç Salım Sistemleri: Lipozomlar .....                                                                                   | 11   |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....                                                                                                                       | 16   |
| 3.1. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında CB Reseptör Düzeylerinin Saptanması.....                                                                      | 17   |
| 3.1.1. Hücre Kültürü .....                                                                                                                         | 17   |
| 3.1.2. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında Reseptör Varlığının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yöntemiyle Değerlendirilmesi ..... | 17   |
| 3.1.3. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında Reseptör Varlığının Akım Sitometrisi Yöntemiyle Değerlendirilmesi .....                                     | 19   |
| 3.2. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında CB65'in Hücre Çoğalmasına Etkisinin Değerlendirilmesi .....                                                   | 20   |
| 3.3. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında CB65'in Proliferasyonu Azaltıcı ED50'sinin Gerçek Zamanlı Olarak Değerlendirilmesi .....                      | 21   |
| 3.4. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında CB65'in Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi .....                                                           | 22   |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5. ED50'si Belirlenen CB65'in Kontrollü Salınımını Sağlayabilecek Lipozom Temelli İlaç Taşıma Sisteminin Geliştirilmesi.....                                                                                                                                                                                | 22 |
| 3.5.1. CB2 Agonisti CB65 Yüklü Lipozom Formülasyonunun Hazırlanması .....                                                                                                                                                                                                                                     | 22 |
| 3.5.2. Lipozomal Formülasyonunun <i>in vitro</i> Koşullarda Karakterizasyonu.....                                                                                                                                                                                                                             | 24 |
| 3.6. CB65 Yüklü Lipozom Salım Sisteminin <i>in vitro</i> Koşullarda MG63 Hücre Hattındaki Proliferasyonu Azaltıcı Etkisinin Değerlendirilmesi.....                                                                                                                                                            | 28 |
| 3.6.1. Gerçek Zamanlı Proliferasyon Analizi .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 28 |
| 3.7. Sonuçların İstatistiksel Analizi.....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 29 |
| 4. BULGULAR.....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 30 |
| 4.1. MG63 ve Saos-2 Osteosarkom Hücre Hatları Yüksek Düzeyde CB2, Düşük Düzeyde CB1 Reseptörü Bulundurmaktadır .....                                                                                                                                                                                          | 30 |
| 4.1.1. Hücre Kültürü .....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 30 |
| 4.1.2. Saos-2 Hücre Hattı Kannabinoid Reseptörlerini qRT-PCR Yöntemiyle Değişen Oranlarda İfade Etmektedir .....                                                                                                                                                                                              | 31 |
| 4.1.3. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatları Akım Sitometrisi Yöntemiyle CB1 Reseptörlerini Düşük CB2 Reseptörlerini Yüksek Bulundurmaktadır.....                                                                                                                                                                      | 31 |
| 4.2. CB2 Reseptörünü En Yüksek Seviyede Bulunduran MG63 ve Saos-2 Hücrelerinde Sentetik Spesifik CB2 Agonisti CB65 Hücre Çoğalmasını Azaltmaktadır.....                                                                                                                                                       | 34 |
| 4.3. Osteosarkom Hücrelerinde CB65'in Gerçek Zamanlı Spesifik Yarı Maksimum Antiproliferatif Etki Penceresi MG63 Hattı için 48. Saatte $1.11 \times 10^{-11}$ M ve Saos-2 Hattı için 24. Saatte $4.95 \times 10^{-11}$ M Olarak Saptanmıştır. Spesifik Etki CB2 Reseptör Antagonisti ile Bloke Olmuştur ..... | 36 |
| 4.4. Sentetik Spesifik Kannabinoid CB2 Agonisti CB65 Akım Sitometrisi ile MG63 ve Saos-2 Osteosarkom Hücre Hatlarında Geç Apoptozu %7.31 ve %19.06 Oranında Arttırmaktadır .....                                                                                                                              | 41 |
| 4.5. CB2 Agonisti CB65'i ED50'de Salınım Kontrollü Lipozomal Salım Sistemi Geliştirildi. Lipozomal Formülasyon <i>in vitro</i> Koşullarda % 51,12 EE ile Karakterize Edildi, 24 Saatlik Salım Özelliği Belirlendi .....                                                                                       | 43 |
| 4.6. CB65 Yüklü Lipozom Salım Sistemi <i>in vitro</i> Koşullarda MG63 Osteosarkom Hattında Proliferasyonu Gerçek Zamanlı Olarak Azaltmıştır .....                                                                                                                                                             | 46 |
| 4.6.1. CB65 Yüklü Lipozom Salım Sistemi <i>in vitro</i> Koşullarda MG63 ve Saos-2 Osteosarkom Hatlarında Proliferasyonunu 16. Saatten İtibaren Gerçek Zamanlı Olarak Azaltmıştır .....                                                                                                                        | 46 |

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 5. TARTIŞMA .....                           | 50 |
| SONUÇLAR .....                              | 64 |
| KAYNAKLAR.....                              | 65 |
| EKLER .....                                 | 83 |
| EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu..... | 83 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                              | 84 |



## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. 15-19 yaş grubunda 5 yıllık %68 sağ kalım oranı gösterilmiştir.....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 4  |
| Şekil 2.2. Kemik metabolizması osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından CB1, CB2 ve TRPV1 reseptörleri aracılı olarak düzenlenir.....                                                                                                                                                                                                                  | 9  |
| Şekil 2.3. Sentetik, spesifik CB2 agonisti CB65'in osteosarkom hücrelerinde CB2 reseptörü aracılı olası antiproliferatif, anti-invaziv ve apoptotik etkisi ve etki mekanizmaları gösterilmiştir. ....                                                                                                                                                   | 15 |
| Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında yapılan deneylere ait iş akışı şematize edilmiştir....                                                                                                                                                                                                                                                              | 17 |
| Şekil 3.2. Lipozomal formülasyonların hazırlanmasına ilişkin protokolde kullanılan (A) rotary evaporatör cihazı, (B) sonikatör cihazı ve (C) oluşan ince film lipozom tabakası gösterilmiştir.....                                                                                                                                                      | 23 |
| Şekil 3.3. İlaç yüklenmiş ve yüklenmemiş lipozom hazırlama basamakları şematize edilmiştir.....                                                                                                                                                                                                                                                         | 24 |
| Şekil 3.4. CB65'in MS/MS parçalanma modeli gösterilmiştir.....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 26 |
| Şekil 3.5. Optimum kromatografik koşullarda (A) CB65 (1 µg/ml) ve (B) İç standart (1 µg/ml) temsili kromatogramları gösterilmiştir.....                                                                                                                                                                                                                 | 27 |
| Şekil 3.6. CB65'e ait kalibrasyon eğrisi, CB65 derişimine (ng/ml) karşı CB65/ACPA pik alan oranı grafiğı cinsinden verilmiştir.....                                                                                                                                                                                                                     | 28 |
| Şekil 4.1. Kültür plaklarına tutunmuş (A) oval, iğısi MG63, (B) sık yerleşimli oval Saos-2 ve (C) polimorfik A549 hücre hatlarının mikrogramları gösterilmiştir.....                                                                                                                                                                                    | 30 |
| Şekil 4.2. Saos-2 osteosarkom ve pozitif kontrol A549 hücre hatlarına ait göreceli mRNA kat artışı grafiğinde Saos-2 hücrelerinde yüksek oranda CB2 (CNR2) reseptör ekspresyonu saptanmıştır. Saos-2 hücreleri, A549 hücrelerine göre düşük oranda CB1 (CNR1) reseptör ekspresyonu, yüksek oranda GPR55 ve TRPV1 reseptör ekspresyonu göstermiştir..... | 31 |
| Şekil 4.3. (A) MG63 (B) Saos-2 ve (C) A549 hücre hatlarında akım sitometrisi yöntemi ile tayin edilen hücre içi ve hücre zarı CB1 ve CB2 reseptör immün işaretlenme düzeyleri bar grafikleri ile gösterilmiştir.....                                                                                                                                    | 32 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.4. MG63, Saos-2 ve A549 hücre hatlarında akım sitometrisi yöntemi ile tayin edilen hücre içi ve hücre zarı CB1 ve CB2 reseptör immün işaretlenme düzeyleri temsili histogram ve saçılım grafikleri ile gösterilmiştir.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 33 |
| Şekil 4.5. CB65'in MG63 hücre hattının proliferasyonuna etkisi WST-1 ile saptanmıştır.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 35 |
| Şekil 4.6. CB65'in Saos-2 hücre hattındaki antiproliferatif etkisi WST-1 ile saptanmıştır.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 35 |
| Şekil 4.7 CB65'in MG63 osteosarkom hücre hattındaki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 37 |
| Şekil 4.8. CB65'in Saos-2 osteosarkom hücre hattındaki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 38 |
| Şekil 4.9. (A) MG63 ve (B) Saos-2 osteosarkom hücrelerinin CB2 immün işaretlenme yüzdesi ile CB65'in hücrelerdeki antiproliferatif etkisi arasındaki kuvvetli pozitif korelasyon dağılım grafiği ile gösterilmiştir.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 39 |
| Şekil 4.10. CB65'in MG63 osteosarkom hücre hattındaki CB2 reseptörü aracılı agonistik etkisi spesifik CB2 reseptör antagonisti AM630 ile bloke olmuştur.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 40 |
| Şekil 4.11. CB65'in Saos-2 osteosarkom hücre hattındaki CB2 reseptörü aracılı agonistik etkisi spesifik CB2 reseptör antagonisti AM630 ile bloke olmuştur.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 41 |
| Şekil 4.12. Bar grafiklerde CB65 (A) MG63 hücre hattında $1.11 \times 10^{-11}$ M dozda 48. saatte (B) Saos-2 hücre hattında $4.95 \times 10^{-11}$ M dozda 24. saatte geç apoptozu kontrole göre arttırmaktadır.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 42 |
| Şekil 4.13. CB65 apoptotik etkisine ait akım sitometrisi ile gerçekleştirilen Annexin/PI işaretlemesine ait temsili saçılım grafiğinde (A) $1.11 \times 10^{-11}$ M dozda uygulama sonrası MG63 hücrelerinde 48. saatte Annexin ile işaretli %0.08'inde erken, Annexin-PI ile işaretli %7.31'inde geç apoptoz ve PI ile işaretli %1.54'ünde nekroz görülmektedir. (B) $4.95 \times 10^{-11}$ M dozda Saos-2 hücrelerinde 24. saatte Annexin ile işaretli %0.07'sinde erken, Annexin-PI ile işaretli %19.06'sinde geç apoptoz ve PI ile işaretli %0.56'sında nekroz görülmektedir..... | 43 |
| Şekil 4.14. Zamana bağlı %CB65 kümülatif salım grafiğinde CB65 yüklü lipozom formülasyonu 1. saatte ortalama $49.1 \pm 5.2$ 'ini ortama salmıştır. 2. saatten ( $56.7 \pm 5.8$ ) 24. saate ( $99.5 \pm 2.8$ ) kadar kontrollü salım gözlenmiştir.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 46 |

|                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.15. CB65'in MG63 osteosarkom hücre hattındaki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır.....                                         | 48 |
| Şekil 4.16. CB65'in Saos-2 osteosarkom hücre hattındaki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır.....                                       | 49 |
| Şekil 5.1. Sentetik, spesifik CB2 agonisti CB65'in osteosarkom hücrelerinde CB2 reseptörü aracılı antiproliferatif ve apoptotik etkisi etki mekanizmaları ile gösterilmiştir..... | 63 |



## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2.1. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2020 yılında yayınlanan kemik tümörleri ve osteosarkom sınıflandırması gösterilmiştir.....                                                                                                                              | 5  |
| Çizelge 2.2. Kannabinoidlerin osteosarkom hücrelerindeki anti-kanser etkileri ile ilgili çalışmalar listelenmiştir.....                                                                                                                                             | 10 |
| Çizelge 2.3. Kannabinoidlerin yüklendiği lipit bazlı salım sistemlerine ait deneysel çalışmalar listelenmiştir .....                                                                                                                                                | 13 |
| Çizelge 3.1. Tez çalışması kapsamında belirlenen deney ve kontrol gruplarındaki tekrar (n) sayıları, bağımlı ve bağımsız değişken grupları gösterilmiştir.....                                                                                                      | 16 |
| Çizelge 3.2. qRT-PCR çalışmasında kullanılan GAPDH, CnR1, CnR2, TRPV1 ve GPR55 reseptör seviyesinin değerlendirilmesi için hazırlanan oligonükleotid dizileri gösterilmektedir.....                                                                                 | 19 |
| Çizelge 4.1. Hazırlanan boş ve yüklü lipozomların 0, 7, gün, 1. ve 3. ayda ölçülen partikül büyüklüğü (PB), polidispersite indeksi (PDI) dağılımı, zeta potansiyel analizi ölçümlerine ait tanımsal istatistikler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir..... | 45 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|              |                                        |
|--------------|----------------------------------------|
| ACPA         | Araşidonilsiklopropilamid              |
| AEA          | Anandamid                              |
| Akt          | Protein kinaz B                        |
| ALP          | Alkalin fosfataz                       |
| Ang-2        | Anjiyotensin-2                         |
| Bad          | Bcl-2 ile ilişkili hücre ölüm proteini |
| Bax          | Bcl-2 ile ilişkili X proteini          |
| BD-2         | Beta defensin-2                        |
| BSA          | Sığır serum albümini                   |
| BSP          | Kemik sialoproteini                    |
| BTZ          | Bortezomib                             |
| cAMP         | Siklik adenosin monofosfat             |
| CB           | Kannabinoid                            |
| CBD          | Kannabidiol                            |
| CBG          | Kannabigerol                           |
| CB1/CnR1     | Kannabinoid 1 reseptörü                |
| CB2/CnR2     | Kannabinoid 2 reseptörü                |
| CH           | Kolesterol                             |
| CYP          | Sitokrom P450                          |
| DAGL         | Diaçil gliserol lipaz                  |
| DAGL $\beta$ | Diaçilgliserol lipaz beta              |
| DHEA         | Dokosaheksaenoil etanolamid            |

|          |                                                      |
|----------|------------------------------------------------------|
| DMEM HG  | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose</i> |
| DOPE     | Dioleoilfosfatidiletanolamin                         |
| DPBS     | <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>          |
| DPPC     | Dipalmitoilfosfatidilkolin                           |
| DSPC     | Distearoilfosfatidilkolin                            |
| DMSO     | Dimetil sülfoksit                                    |
| EE (%)   | Enkapsülasyon Etkinliği (%)                          |
| ED50     | Etkili doz 50                                        |
| EMA      | Avrupa İlaç Ajansı                                   |
| ERK 1/2  | Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz ½            |
| EtOH     | Etanol                                               |
| FAAH     | Yağ asidi amid hidrolaz                              |
| FBS      | <i>Fetal Bovine Serum</i>                            |
| FDA      | Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu                         |
| GAPDH    | Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz                  |
| GPR55    | G protein bağlı reseptör 55                          |
| HER-2    | İnsan epidermal büyüme faktörü 2                     |
| HPLC     | Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi                |
| IGF-R    | İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörleri          |
| JNK      | c-Jun N-terminal kinaz                               |
| KHDAK    | Küçük hücreli dışı akciğer kanseri                   |
| L-MTP-PE | Lipozomal muramil tripeptid fosfatidil etanolamin    |
| LC-MS/MS | Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi             |
| MAGL     | Monoaçilgliserol lipaz                               |
| MAP      | Mitojenle eşleşen protein                            |
| MAPK     | Mitojen aktive edici protein kinaz                   |

|            |                                                               |
|------------|---------------------------------------------------------------|
| Mifamurtid | Lipozomal muramil tripeptid fosfatidil etanolamin veya MEPACT |
| MLV        | Büyük çok tabakalı veziküller                                 |
| MMP-2      | Matriks metaloproteinaz-2                                     |
| MMP-9      | Matriks metalloproteinaz 9                                    |
| mTOR       | Rapamisinin memeli hedefi                                     |
| mTORC      | Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi                  |
| MTT        | 3-[4,5-dimethylthiazolyl- 2] 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide |
| NAPE-PLD   | N-açil fosfatidiletanolamin fosfolipaz D                      |
| NLP        | Lipit nanopartikül                                            |
| NMDA       | n-metil-d-aspartat reseptör                                   |
| OC         | Osteokalsin                                                   |
| OPN        | Osteopontin                                                   |
| PAR-4      | Proteaz aktive edici reseptör-4                               |
| PBS        | Fosfat tamponlu tuz çözeltisi                                 |
| PCL        | Polikaprolakton                                               |
| PDGFR      | Platelet öncülü büyüme faktör reseptörleri                    |
| PDI        | Polidispersite indeksi                                        |
| PFA        | Paraformaldehit                                               |
| PI3k       | Fosfoinositid-3 kinaz                                         |
| PLGA       | Poli-laktik-ko-glikolikasit                                   |
| PLC        | Fosfolipaz C                                                  |
| PPAR gamma | Peroksizom aktive edici nükleer reseptör gama                 |
| P38        | p38 Mitojenle aktive olan protein kinazlar                    |
| qRT-PCR    | Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu         |
| RANK       | Reseptör aktivatör nükleer kappa B                            |
| RANKL      | Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand                     |

|                 |                                                          |
|-----------------|----------------------------------------------------------|
| RTK             | Reseptör tirozin kinaz                                   |
| RTX             | Resiniferatoksin                                         |
| RUNX2           | <i>Runt-related transcription factor 2</i>               |
| SLN             | Katı lipit nanopartikül                                  |
| SMA             | Stiren Maleik Asit                                       |
| SPARC           | Sistein bakımından zengin protein                        |
| STAT 3/5        | Transkripsiyon 3/5 sinyal transdüseri ve aktivatörü      |
| SUV             | Küçük tek tabakalı veziküller                            |
| TRAP            | Tartarat dirençli asit fosfataz                          |
| TRPV1           | Transient Reseptör Potansiyeli Vanilloid Tipi Reseptör 1 |
| VEGF-A          | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A                     |
| VEGFR           | Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörleri           |
| WHO             | Dünya Sağlık Örgütü                                      |
| WST-1           | <i>Water Soluble Tetrazolium-1</i>                       |
| ZP              | Zeta Potansiyel                                          |
| 2-AG            | 2-Araşidonilgliserol                                     |
| $\Delta^9$ -THC | $\Delta^9$ -Tetrahidrakannabinol                         |

# 1. GİRİŞ

**Kemik tümörleri** çocuklarda görülme sıklığı [1], yüksek metastaz oranına [2] bağlı olarak artış gösteren önemli bir kanserdir. Çocuklarda ve gençlerde primer osteosarkom en sık izlenen osteojenik tümör olarak bilinmektedir [3]. Klinikte osteosarkom için cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapinin sınırlılıkları ve hedefli ajanların uygulandığı hastalarda görülen sistemik yan etkiler tedavi sürecini güçleştirmektedir [4]. Hâlihazırda kullanılan ajanların sınırlı etkileri, yeni ilaç adaylarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır [4].

**Kannabinoidler**, doğada ekzojen olarak *Cannabis* türü bitkilerde [5, 6], endojen olarak insanlarda [7] ve laboratuvar koşullarında sentetik formları [8] üretilen aktif lipit yapılı ligandlardır. Kannabinoid sistemi bileşenlerinin kemik hücrelerinde yaygın olarak dağılım gösterdiği bilinmektedir [9, 10]. Kemiğe ait osteoblast, osteoklast ve kemiğin öncül hücrelerinde klasik kannabinoid 2 (CB2) reseptörünün klasik kannabinoid 1 (CB1) reseptörüne göre daha yüksek oranda sentezlendiği bildirilmiştir [9, 11, 12]. Kannabinoidlerin osteosarkom hücrelerinde CB2 veya Transient reseptör potansiyeli vanilloid tipi-1 (TRPV1) reseptörleri aracılı proliferasyon [1], invazyonu [1, 13] ve hücre göçünü azalttığı [1, 13] ve apoptozu indüklediği [1, 13] bildirilmiştir. Literatürde çeşitli kannabinoidlerin osteosarkom hücrelerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar bulunsa dahi CB2 reseptörü aracılı proliferasyonu azaltıcı [1] ve apoptozu indükleyici [1, 13] etki mekanizmasına ilişkin bilgiler sınırlı olarak bildirilmiştir. Yarı ömrü kısa olan yağ yapılı kannabinoidlerin uzun süreli ve kontrollü salımı için lipit bazlı ilaç taşıma sistemleri ile osteosarkom hücrelerinin hedeflenmesine ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır [14].

**Varsayımımıza** göre, sentetik spesifik CB2 reseptör agonisti CB65'in osteosarkom hücre hatlarındaki etkili dozu tespit edilebilir, proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu indükleyici etkisi ortaya konabilirse, uygun lipozomal sistem ile stabilite ve biyoyararlanımı artırılarak etkili dozunun uzun süreli salımı sağlanabildiğinde bu ajan, osteosarkom için küratif ilaç adayı olabilir.

Bu tez çalışmasının **amacı**, sentetik, spesifik CB2 reseptör agonisti CB65'in *in vitro* koşullarda ticari osteosarkom hücrelerindeki reseptör dağılımının değerlendirilmesi, doz

ve zaman bağımlı antiproliferatif dozunun saptanması ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi ve uzun süreli etkisinin izlenmesi için kontrollü salımını sağlayacak lipozomal ilaç taşıma sisteminin geliştirilmesi, karakterizasyonu ve hücrelerde test edilmesidir.

Bu amaç doğrultusunda aşağıdaki **hedefler** belirlenmiştir.

- I. MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücre hatlarında kannabinoid reseptör düzeylerinin saptanması
- II. CB2 reseptörünü en yüksek düzeyde bulunduran osteosarkom hücrelerinde sentetik spesifik CB2 agonisti CB65'in hücre çoğalmasına etkisinin değerlendirilmesi
- III. CB2 reseptörünü en yüksek düzeyde bulunduran osteosarkom hücrelerinde sentetik spesifik kannabinoid CB2 agonisti CB65'in proliferasyonu azaltıcı etkili dozunun gerçek zamanlı olarak değerlendirilmesi
- IV. CB2 reseptörünü en yüksek düzeyde bulunduran osteosarkom hücrelerinde sentetik spesifik kannabinoid CB2 agonisti CB65'in apoptotik etki düzeyinin değerlendirilmesi
- V. Etkili dozu belirlenen CB2 agonisti CB65'in uzun süreli kontrollü salımını sağlayabilecek lipozom temelli ilaç salım sisteminin geliştirilmesi
- VI. CB65 yüklü lipozom salım sisteminin *in vitro* koşullarda osteosarkom hücrelerindeki uzun süreli proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu indükleyici etkisinin değerlendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında yukarıdaki hedeflere ulaşılarak sentetik spesifik CB2 reseptör agonisti CB65 yüklü lipozomal ilaç taşıma sisteminin uzun süreli ve kontrollü salımı ile *in vitro* koşullarda osteosarkom hücre hatlarında CB2 reseptörü aracılı doz ve zaman bağımlı hücre çoğalmasını azaltıcı ve hücre ölümünü uyarıcı etki potansiyeli ortaya konmuş; gerçek zamanlı olarak etkili dozu saptanmıştır. Bu çalışma ile ilk kez

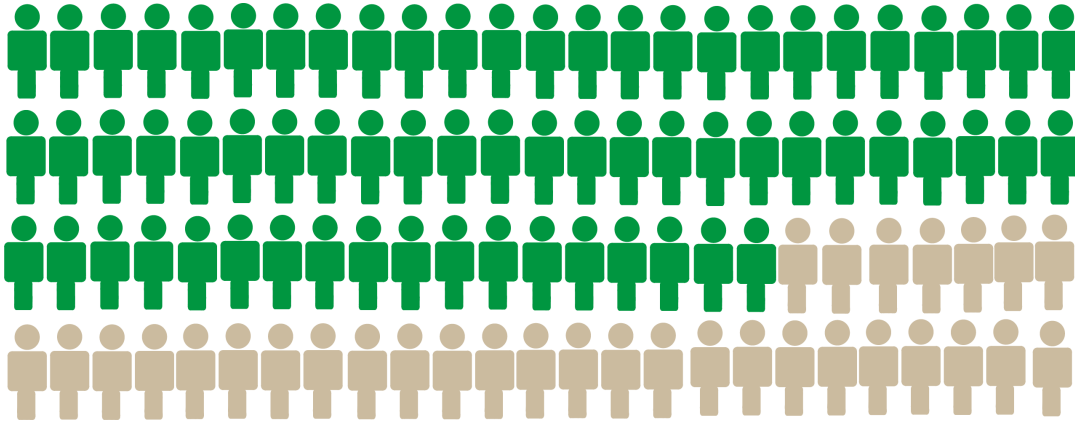
geliştirilen CB2 agonisti CB65 yüklü lipozomal ilaç taşıma sistemi, akıllı ilaç taşıyıcı sistemler ve hedefli tedavi alanlarında yeni projelerin geliştirilmesinin önünü açabilir ve yeni bir tedavi adayı olarak sunulabilir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kemik Tümörleri

Kemik tümörleri çocuklarda ve gençlerde yaygın görülen [1] ve kötü prognozu nedeniyle metastaz oranı yüksek tümörlerdir [2]. Kemik tümörleri, tüm kanserlerin %0,2'sinden daha az oranda görülmektedir [3] ve %67-69 oranında 5 yıllık sağ kalım oranına sahiptir [15]. 2022 yılı verilerine göre 15-19 yaş aralığındaki hastaların sağ kalım oranının %68 olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.1) [3]. Buna karşın, metastaz yapan kemik tümörü olgularının 5 yıllık sağ kalım oranının %27'ye düştüğü raporlanmıştır [16]. Amerika Birleşik Devletleri'nin 2020 yılına ait istatistikleri, 3600 yeni kemik tümörü olgusunun 1720'sinin ölümle sonuçlandığını göstermiştir [15]. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yapılan araştırmalarda 2016 yılına ait kanser istatistiklerine göre 14 ilde 378 kemik tümörü olgusunun %2,4'ünün ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir [17]. Primer kemik tümörü olgularının sıklıkla akciğer [18], meme [19], prostat [20], böbrek [21] ve tiroide [22] metastaz yaptığı bilinmektedir [23]. 2020 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) [24] tarafından kemik tümörleri için [25] ve osteosarkom için yapılan sınıflandırma Çizelge 2.1'de gösterilmektedir. Primer osteosarkomun çocuklarda ve gençlerde %56 oranı ile en sık izlenen osteojenik tümör olduğu bilinmektedir [3].



**Şekil 2.1.** 15-19 yaş grubunda 5 yıllık %68 sağ kalım oranı gösterilmiştir. Yeşil ile gösterilenler hayatta kalan insanları temsil etmektedir.

**Çizelge 2.1.** Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2020 yılında yayınlanan kemik tümörleri ve osteosarkom sınıflandırması gösterilmiştir.

| <b>Kemik Tümörleri</b>                    | <b>Osteosarkom</b>                 |
|-------------------------------------------|------------------------------------|
| Kondrojenik tümörler                      | Osteosarkom                        |
| Kemiğin hematopoietik neoplazmaları       | Düşük dereceli santral osteosarkom |
| Osteojenik tümörler                       | Parosteal osteosarkom              |
| Fibrojenik tümörler                       | Periosteal osteosarkom             |
| Damar tümörleri                           | Yüksek dereceli yüzey osteosarkomu |
| Osteoklastik dev hücreden zengin tümörler | Sekonder osteosarkom               |
| Notokord tümörleri                        | -                                  |
| Kemiğin diğer mezenkimal tümörleri        | -                                  |
| Hematopoetik neoplazmlar                  | -                                  |

### 2.1.1. Osteosarkom Tedavisi

Klinikte osteosarkom tanısı konulan hastalarda cerrahi öncesi olarak neoadjuvan kemoterapi [26] cerrahi rezeksiyonu kolaylaştırmak için tercih edilmektedir [27]. Ardından cerrahi tedavi ve metastaz yapmamış hastalarda adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır [26, 28]. Metastaz yapmış osteosarkom tanısı alan hastalarda sınırlı olarak kemoterapi uygulanmaktadır [29]. Cerrahi tedavi uygulanamayan sınırlı sayıda hastada uzun süreli radyoterapi uygulamasının sağlıklı dokulardaki kök hücrelerde hasara neden olduğu bilinmektedir [30, 31] Klinikte 40 yaş ve üzeri hastalarda ilk tercih olarak uygulanan kemoterapötik ajanlar (metotreksat, doksorubisin, cisplatin ve ifosfamid vb.) [32-34] hastalığın metastazını önleyememekte ve tümör oluşumunu tetikleyen spesifik mutasyonları hedeflemeksizin etki göstermektedir [35]. Tümör damarlarının kıvrımlılığı ve farklılığı, oksijen basıncının düşük olması ve yüksek vasküler geçirgenlik gibi özellikler kemoterapide engeller oluşturur [36, 37]. Ayrıca kemoterapötiklerin hastalarda yorgunluk, bulantı-kusma, ağrı, bağışıklık sistemini baskılama, trombositopeniye bağlı kanama, kıl köklerinde zayıflama, infertilite ve felç gibi yan etkiler gösterdiği bilinmektedir [4, 33, 38, 39]. Kemoterapötiklerden biri olarak osteosarkomda kullanılan metotreksatın metastaza karşı önemli olduğu bildirilmesine [40] karşın metotraksatın sisplatin ile uygulandığı hastalarda sonucu iyileştirmediği bildirilmiştir [41]. Ayrıca osteosarkomun heterojenliği [42] karşısında kemoterapötiklere karşı zayıf yanıt oluşturabilmektedir [43, 44].

Klinikte sonraki tercihi hedefli tedavi ajanları oluşturmaktadır [29]. Osteosarkomun moleküler patogenezinde tanımlanan reseptör tirozin kinaz (RTK), insülin benzeri büyüme faktörü reseptörleri (IGF-R), platelet öncülü büyüme faktör reseptörleri

(PDGFR), vasküler endotelial büyüme faktör reseptörleri (VEGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER-2) mutasyonlarına karşı uygulanan hedefli inhibitörlerin bulantı, kusma, ağrı, interstisiyal akciğer hastalığı ve hepatoksisite gibi sistemik yan etkileri tedavi sürecini zorlaştırmaktadır [45]. Osteosarkom tedavisi için alternatif ajanlar olarak Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand (RANKL) antikorunu denosumab ve bifosfonatların osteoklast aktivitesini ve kemik rezorpsiyonunu azaltıcı ve mineralizasyonu artırıcı etkisi araştırılmaya başlanmıştır [45]. Osteosarkomun tanı ve tedavisindeki ilerlemelere rağmen, hastalarında sağkalım oranlarının artmaması, halihazırda klinikte uygulanan ajanların hastada güçlü yan etki oluşturmaları ve sınırlı etki göstermeleri osteosarkom tedavisi için yeni hedefli tedavi stratejilerinin önemini ve gerekliliğini ortaya koymaktadır [4, 46].

*Clinicaltrial.gov* veri tabanına girildiğinde 95 adet çalışmadan hala devam eden 26 tanesi osteosarkom tedavisi ile ilgili (*Facilitates Chromatin Transcription*) FACT kompleks hedefleme [47], kriyoablasyon tedavisi [48], T hücre hedeflemesi [49-51], sistemik tedavi [52], lipozomal hedefleme [53] ile kannabis [54] apatinib [55], apatinib+IE (ifosfamid ve etoposid) [56], apatinib mesilat [57], siklofosfamid [58-60], fludarabin [60], fludarabin fosfat [58], askorbat [61, 62], ZKAB001 [63], camrelizumab [57, 64], regorafenib [65], gemsitabin [62, 66, 67], lomustin [67], paklitaksel [67], nab-paklitaksel [66, 67], doksorubisin [67], Lizo-ısıya duyarlı lipozomal doksorubisin [53] karboplatin [67], DeltaRex-G [68], nivolumab [48], ipilimumab [48], irinotekan [67], trabektedin [69], 9-ING-41 [67], kabozantinib [70], ensartinib [71], erdafitinib [71], larotrekatinib sülfat [71], olaparib [71], palbociclib [71], samotolisib [71], selpercatinib [71], selumetinib sülfat [71], tazemetostat [71], tipifarnib [71], ulixertinib [71] ve vemurafenib [71] ilaçlarını kapsayarak denenmektedir. Bunların içerisinde kannabinoidler ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Kannabinoidler ise 26 adet çalışmadan hala devam eden 9 tanesinde solid tümör [72], periferik nöropati [73], hematopoetik ve lenfoid hücre tümörü [73], malign solid tümör [73], pankreas kanseri [74], neoplazma [75], glioblastom [76] gibi kanserlerde ağrı [75, 77-79], bulantı-kusma [74, 75] için araştırılan önemli ilaç adayları olarak karşımıza çıkmaktadır.

## **2.2. Kannabinoid Sistemi, Endokannabinoidlerin Kemikte Dağılımı ve Etkileri**

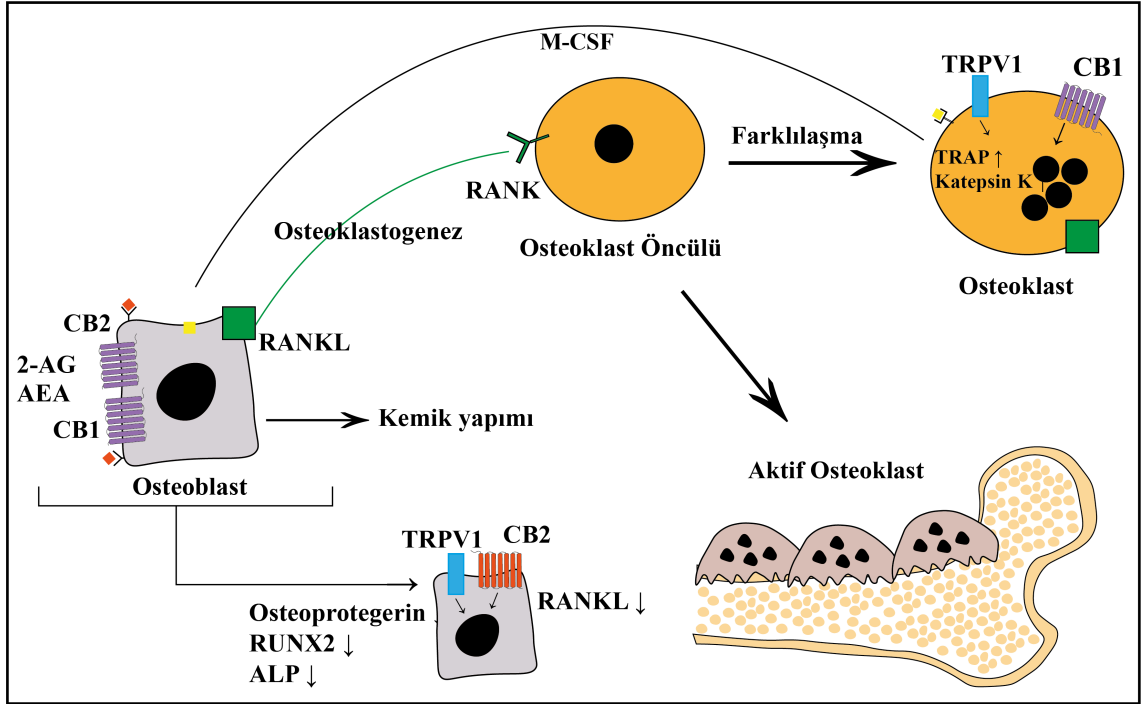
Kannabinoidler, doğada başta *Cannabis sativa* olmak üzere pek çok kannabis türü bitkide bulunan ( $\Delta^9$ -Tetrahidrokannabinol ( $\Delta^9$ - THC), kannabidiol (CBD), kannabigerol (CBG)

vb.) aktif bileşenlerdir [5, 6]. Ayrıca insanlarda endojen olarak [7, 80] ve laboratuvar koşullarında sentetik olarak üretilen (HU-210, WIN 55,212-2, CP55940 vb.) [5, 8] kannabinoidler olduğu bilinmektedir. Kannabinoid sistemi, kannabinoid ligandları, reseptörleri ve yapım-yıkım enzimlerini içermektedir [11, 81]. Anandamid (AEA) ve 2-araşidonoilgliserol (2-AG) deneysel çalışmalarla vücudumuzda varlığı bilinen iki endojen kannabinoid ligandıdır [82, 83]. Bu ligandlar etkilerini genellikle klasik kannabinoid 1 reseptörü (CB1) ve kannabinoid 2 reseptörü (CB2) üzerinden göstermektedir [84]. Bu reseptörler G-proteini yapısında reseptörlerdir [7, 82]. Endokannabinoidler, klasik kannabinoid reseptörlerinden bağımsız olarak G-proteini yapısında reseptörler (GPR55, GPR119, GPR18, GPR19) [85, 86] ve transient reseptör potansiyeli vanilloid tipi reseptörler (TRPV1, TRPV2 vb.) [87] üzerinden etki gösterebilmektedir. CB1/2 agonisti Anandamid, N-araşidonoil fosfatidiletanolamin ile N-açıl fosfatidiletanolamin fosfolipaz D (NAPE-PLD) enziminden sentezlenir ve yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) ile yıkılır. CB1/2 agonisti 2-araşidonoilgliserol, fosfolipaz C (PLC) üzerinden diaçilgliserol lipaz (DAGL) tarafından fosfolipitlerden sentezlenir [88], mono-açılgliserol lipaz (MAGL) ve yağ asidi amid hidrolaz (FAAH) enzimleri ile yıkılır [89].

Kannabinoid 1 reseptörü, vücudumuzda yaygın olarak merkezi sinir sistemi [90], kas-iskelet sistemi [91], genital sistem [92] ve solunum sisteminde [93-95] sentezlenmektedir. Kannabinoid 2 reseptörü sıklıkla bağışıklık sistemi hücrelerinde [96], periferik sinir sisteminde [97] ve kas iskelet sisteminde [91] dağılım göstermektedir. TRPV reseptörleri genellikle kas-iskelet sistemi [11, 98], merkezi ve periferik sinir sistemi [99], genital sistem [100], dolaşım sistemi [101] ve solunum sisteminde [101, 102] bulunmaktadır. Kannabinoidler fizyolojik koşullarda vücut homeostazisinin korunması, enerji dengesinin sağlanması, açlık uyarımı, kan basıncının düzenlenmesi, öğrenme ve hafızada önemli role sahiptir [103].

Kannabinoid sistemi bileşenleri osteoblast, osteoklast ve kemiğin öncül hücrelerinde yaygın olarak dağılım göstermektedir [9, 10]. Bu bileşenlerin kemik kütlesi ve kemik yapımında önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.2) [100]. Anandamid ve 2-AG kemikte osteoblast, osteoklast ve kemiğin örtücü hücreleri tarafından sentezlenmekte [104] ve CB1/2 [11] veya TRPV1/4 reseptörleri [11, 84] aracılı kemik metabolizmasını düzenlemektedir. Kemiğe ait osteoblast, osteoklast ve kemiğin öncül hücrelerinde CB2

reseptörünün CB1 reseptörüne göre daha yüksek oranda sentezlendiği bildirilmiştir [9, 11, 12]. CB2 reseptörünün yüksek seviyede ekspresyonu, *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2), kemik sialoproteini (BSP), osteopontin (OPN), alkalın fosfataz (ALP) ve osteokalsin (OC) faktörlerini indükleyerek osteoblast proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırmakta ve kemik yapımını uyarmaktadır [11], osteoklastogenezi baskılamaktadır [12]. CB2 reseptör ekspresyonu baskılanmış farelerde osteoblast üretiminin azaldığı, osteoklast oluşumunun arttığı gözlenmiştir [11, 105]. Buna karşın, CB1 ekspresyonu baskılanan farelerde kemik gelişimi sırasında osteoblast fonksiyonunun ve sayısının değişmediği bildirilmiştir [11, 106]. Kemik gelişiminin erken dönemlerinde osteoblast farklılaşmasında CB1 reseptörünün etkili olduğunu göstermektedir [11]. CB1 reseptörü baskılanmış sıçan modelinde peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) seviyesindeki artışa bağılı olarak osteoblast oluşumunun azaldığı saptanmıştır [98]. Osteoblastlar tarafından üretilen 2-AG'nin sempatik sinir sistemine ait periferik sinir uçlarında bulunan CB1 aktivasyonu norepinefrin salınımını inhibe ederek kemik oluşumunu uyarır [98, 104]. CB1 reseptörlerinin uyarımı osteoblastlarda  $\beta$ 2-adrenerjik reseptörlerinin inhibisyonu üzerinden osteoblast aktivitesini ve farklılaşmasını uyarmaktadır [107].  $\beta$ 2-adrenerjik reseptör inhibisyonunun osteoklastlarda RANKL ekspresyonunu ve osteoklastogenezi azalttığı bildirilmiştir [107].



**Şekil 2.2.** Kemik metabolizması osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından CB1, CB2 ve TRPV1 reseptörleri aracılı olarak düzenlenir. Osteoblast ve osteoklastlar arasındaki yapım ve yıkım dengesi kemik kütesinin korunmasını sağlar. (RANK: Reseptör aktivatör nükleer kappa B; RANKL: Reseptör aktivatör nükleer kappa B ligand; RUX2: *Runt-related transcription factor 2*; ALP: Alkalın fosfataz; TRAP: Tartarat dirençli asit fosfataz; MCS-F: Makrofaj koloni uyarıcı faktör; AEA: Anandamid; 2-AG: 2-Araşidonilgliserol)

### 2.3. Kannabinoidler ve Kemik Tümörleri

Kannabinoidlerin osteosarkom hücrelerinde CB2 veya TRPV1 reseptörleri aracılı proliferasyonu[1], invazyonu [1, 13] ve hücre göçünü azaltıcı [1, 13] ve apoptozu indükleyici [1, 13] etkileri yoğun olarak araştırılmaktadır. Osteosarkom hücrelerinde hedefli olarak CB2 ve/veya TRPV1 reseptörleri aracılı proliferasyonu azaltıcı [1] ve apoptozu artırıcı [1, 13] etki mekanizmalarına ilişkin bilgiler sınırlıdır. Bu etkiler Çizelge 2.2’de detaylandırılmıştır.

**Çizelge 2.2.** Kannabinoidlerin osteosarkom hücrelerindeki anti-kanser etkileri ile ilgili çalışmalar listelenmiştir.

| Kannabinoid Türü                                                         | Deney Tasarımı                                                                                                                          | Etki mekanizması                                                                                                                                                         | Kaynak     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| CB2 agonisti<br>JWH-133,<br>TRPV1<br>agonisti RTX<br>veya BTZ            | MG63, Saos-2,<br>U-2OS, MNNG/HOS,<br>KHOS/NP, Hs888Lu<br>hücre hatları<br><i>in vitro</i>                                               | <b>Proliferasyon</b> ↓, <b>Apoptoz</b> ↑,<br>İnvazyon↓, Migrasyon↓,<br>Hücre siklusunun durması,<br>Kaspaz 3↑, p-Akt↓, Notch-1↓,<br>MMP-2↓, Bax↑, Bcl-2↓,<br>RANK-L/OPG↓ | [1, 13]    |
| CB1 ve/veya<br>CB2 agonisti<br>WIN-55,212-2                              | OSA-8, Saos-2, MG63<br>hücre hatları<br><i>in vitro</i>                                                                                 | <b>Proliferasyon</b> ↓, <b>Apoptoz</b> ↑,<br>İnvazyon↓, Anjiyogenez↓,<br>Migrasyon↓, Notch-1↓, MMP-<br>2↓, VEGF↓, miR-29b1↑,<br>Sitokrom C↑, PAR-4↑, Kaspaz<br>8↑        | [108-113]  |
| CB1 ve/veya<br>CB2 agonisti<br>AEA                                       | MG63 hücre hattı<br><i>in vitro</i>                                                                                                     | <b>Proliferasyon</b> ↓, <b>Apoptoz</b> ↑,<br>Kaspaz 3↑, p38, MAPK↑,<br>ERK↑, JNK↑                                                                                        | [114]      |
| MAGL<br>inhibitörü<br>JZL-184                                            | MOSJ hücre hattı ile<br>C57BL/6J fare modeli<br>ve MNNG/HOS hücre<br>hattı ile NMRI atimik<br><i>nude</i> fare modeli<br><i>in vivo</i> | Migrasyon↓, Metastaz↓, Tümör<br>büyümesi↓, Kansere bağlı<br>kemik kaybı↓, Osteoblastik<br>kemik oluşumu↓                                                                 | [115, 116] |
| CB1 ve/veya<br>CB2 agonisti<br>THC, AM630<br>ve AM251                    | MD-MB-231 meme<br>kanseri, PC3 prostat<br>kanseri, KHOV ve<br>Saos-2 hücre hatları<br><i>in vitro</i>                                   | CB2 ekspresyonu↑,<br>İnflamasyon↓                                                                                                                                        | [117]      |
| CB1 ve/veya<br>CB2 agonisti<br>DHEA<br>epoksitlerinin<br>regioizomerleri | K7M2 hücre hattı ile<br>dişi BALB fare<br>modeli<br><i>in vivo</i>                                                                      | <b>Apoptoz</b> ↑,<br><b>Proliferasyon</b> ↓,<br>Migrasyon↓                                                                                                               | [118]      |

**Dipnot:** JWH-133: Dimethylbutyl-deoxy-Delta-8-THC; RTX: Resiniferatoksin; DHEA: Dokosaheksaenoil Etanolamid; MMP-2: Matriks metaloproteinaz-2; PAR-4: Proteaz aktive edici reseptör 4; AEA: Anandamid; AM630; CB2 Antagonisti; AM251: CB1 Antagonisti; MAGL: Monoağılglicerol lipaz

## 2.4. Sentetik Spesifik CB2 Reseptör Agonisti CB65

CB65 ( $C_{22}H_{28}ClN_3O_3$ ; MW: 417.93 g/mol) sentetik spesifik CB2 reseptör agonistidir ( $K_i=3.3$  nM). CB65'in DMSO (Çözünürlük: 5 mM) ve etanolde (Çözünürlük: 10 mM) çözündüğü bilinmektedir. Sentetik selektif CB2 reseptör agonisti CB65'in, hepatokarsinom [119] ve endometriyum kanserinde [120] proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu indükleyici etkileri raporlanmıştır. CB65, HepG2 hepatokarsinom hücrelerinde 0.625 nM ( $6.25 \times 10^{-10}$  M) konsantrasyonda MMP-2/9 ekspresyonunu kontrole göre

azaltarak invazyonu inhibe etmiştir [119]. CB65  $1.9 \times 10^{-4}$  M dozda Ishikawa endometriyum kanseri hücrelerine uygulandığında antiproliferatif ve apoptotik etki göstermiştir [120]. Kannabinoid reseptörlerini bulundurduğu literatürde bildirilen osteosarkom hücrelerinde [13, 121] spesifik CB2 agonisti CB65, hedefli olarak CB2 reseptörü aracılı proliferasyonu azaltabilir ve apoptozu indükleyebilir.

## **2.5. Kannabinoidler için İlaç Salım Sistemleri: Lipozomlar**

Günümüzde klinikte kullanılan konvansiyonel kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinin hastalarda ciddi yan etkilere neden olduğu bilinmektedir [122]. Kullanılan antikanser etkili ajanların etkili dozlarının hedef tümör bölgesinde degradasyonu tedavide önemli bir limitasyon olarak değerlendirilmektedir. Bu doğrultuda son yıllarda etkili tedavinin sağlanabilmesi ve antikanser etkili ajanların biyoyararlanımlarının artırılabilmesi amacıyla hedefli ve kontrollü salım sistemleri geliştirilmektedir [123, 124].

Çeşitli nanoteknolojik yaklaşımlar sayesinde hücre dışı veziküller [125-129], mikroküreler [130], konjugatlar [131-133], nanokristaller [134, 135], nanoemülsiyonlar, polimerik nanopartikül sistemleri [136, 137], dendrimerler [138-140], polimerik miseller [141, 142], lipozomlar [143-145] ve nanokapsüller [146] terapötik etkiyi arttırmak için araştırılmaktadır [147]. Pek çok araştırmada lipit bazlı formülasyonların polimerik nanopartiküllere göre yüksek biyoyoumluluk [148] ve biyodegradasyon [144] ve düşük toksisite [149] gösterdiği saptanmıştır [150]. Lipit bazlı formülasyonlar, lipozomları [143-145], eksozomları [125, 127-129] ve katı lipit nanopartikülleri [151, 152] kapsamaktadır [124]. Özellikle lipozomların yüksek biyoyoumluluklarının [153] yanı sıra biyodegradasyon kapasitelerinin yüksek olması [154], düşük toksisite [155] göstermeleri, yarı ömrü uzatmaları [156] ve enkapsülasyon etkinliğinin yüksek olması [147] nedeni ile en sık araştırılan lipit bazlı taşıyıcı olarak değerlendirilmektedir [148, 157-159].

Lipozomlar, hidrofilik polar bir baş ve hidrofobik polar olmayan bir kuyruğa sahip iki tabakalı fosfolipit yapılı zardan oluşur [160] ve bu özellikleri sayesinde hem hidrofilik hem lipofilik moleküllerin lipozomlardaki enkapsülasyon kapasitesi oldukça yüksektir [147]. Lipozomların yapısında bulunan amfifilik fosfolipit tabakasının hayvan hücre membranına benzerlik göstermesi nedeniyle lipozomların membran ile etkileşiminin ve

ilacın hücre içine alımının arttığı gözlenmiştir [157, 161]. Çift tabakalı sentezlenen lipozomlar genellikle 50-1000 nm çapa sahip olmakla birlikte birden fazla lamellar vezikülün bir araya getirilmesiyle sentezlenebilmektedir [124]. Bu yapısal özellik sayesinde hem hidrofobik hem hidrofilik ajanlar lipozomlara yüklenebilmektedir [156, 162]. Çeşitli ilaç (siklosporin A [163] gibi), antijen/antikor [164, 165], peptit [166-168], DNA/aptamer [169, 170], sakkarit [171] ve kuantum noktalar [172] ile lipozomların konjugasyonunun yapıldığı bilinmektedir [147].

Osteosarkom tedavisi için immünmodülatör olarak kullanılan etanolamid türevi mifamurtid (lipozomal muramil tripeptid fosfatidil etanolamin, L-MTP-PE) lipozomal bir formül olan Mepact® (Millennium, Cambridge, MA, ABD), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmıştır [14, 28, 173, 174]. Mifamurtidin, sağlıklı donörlerden izole edilen osteoklastlarda, TRPV1 ve CB2 ekspresyon seviyesinde ve osteoklast belirteci TRAP ekspresyonunda azalma gözlenmiş, buna karşın, osteosarkom hastalarından izole edilen osteoklastlarda TRAP ve CB2 seviyesinin sağlıklı osteoklastlara göre yüksek olduğu ve osteoklast sayısının artış gösterdiği saptanmıştır [14]. *Clinicaltrial.gov* veri tabanına girildiğinde 44 adet çalışmadan hala devam eden 4 tanesi osteosarkom tedavisinde kullanılan lipozomal sistemli ilaçlar MM-398 (*Irinotecan Sucrostate Liposome Injection*) plus *cyclophosphamide* [175], Lizo-ısıya duyarlı lipozomal doksorubisin [53, 176] ve liposomal doksorubisin (Doxil) [177] araştırılmaktadır.

Kannabinoidlerin, suda çözünürlüklerinin düşük olması, sıcaklık, ışık ve otooksidasyon ile bozunmaya yatkın olmaları [158] ve yarı ömürlerinin kısa olması [5, 9] lipit taşıyıcılar ile kontrollü salım sistemi olarak geliştirilmesini elverişli kılmaktadır. Literatürde kannabinoidlerin yüklendiği lipit bazlı taşıyıcı sistemlerine ilişkin çalışmalar Çizelge 2.3'te özetlenmiş olup kannabinoid yüklü lipozomal ilaç taşıma sistemine ilişkin bir çalışma yer almamaktadır.

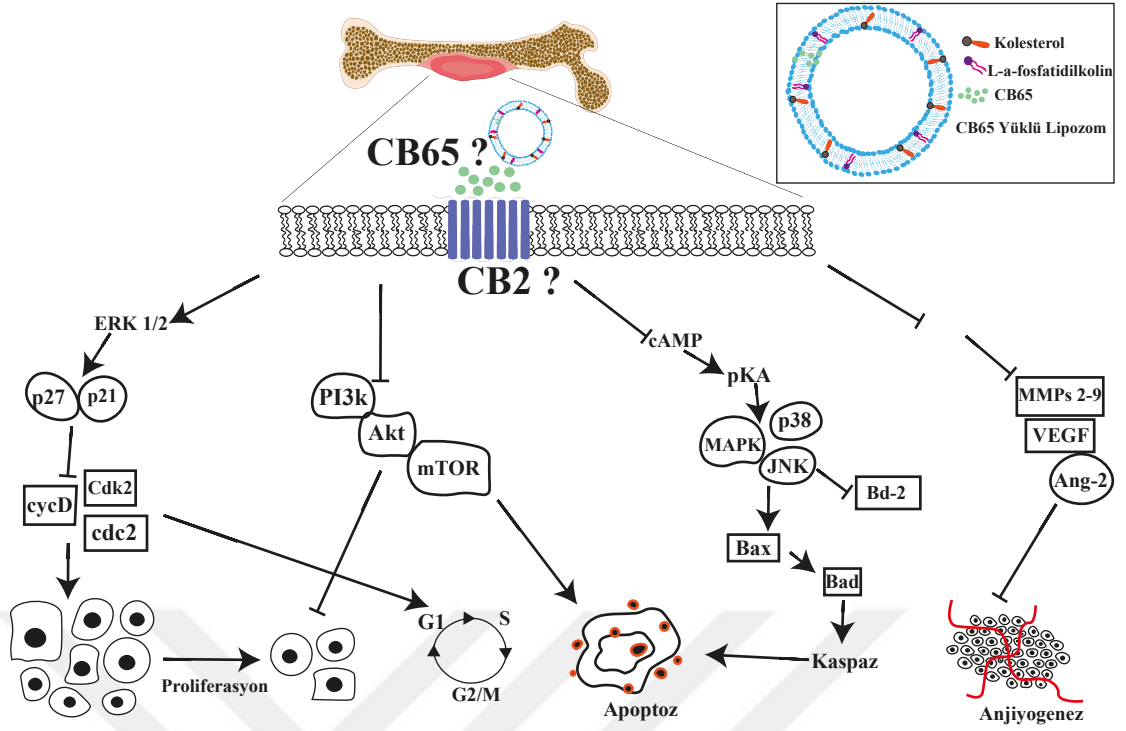
**Çizelge 2.3.** Kannabinoidlerin yüklendiği lipit bazlı salım sistemlerine ait deneysel çalışmalar listelenmiştir.

| Deney Düzenegi                                                                                              | Kannabinoid Türü                                                             | Salım Sistemi ve Karakterizasyonu             | Etki                                                                                                   | Kaynak     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|                                                                                                             | CBD                                                                          | <b>Lipozom</b> sistemi                        | %90 (%EE)                                                                                              | [144]      |
| NIH/3T3, HEK-293T ve Caco-2 hücreleri<br><i>in vitro</i>                                                    | Sentetik CB1/CB2 agonisti CB13                                               | L- $\alpha$ -Fosfatidilkolin bazlı <b>NLP</b> | %89-100 (%EE)<br>Hücre canlılığı ↓<br>Sitotoksistitede etkisiz                                         | [178]      |
| Erkek yetişkin Sprague-Dawley fareleri ile<br><i>in vivo</i>                                                | FAAH inhibitörü URB597 ve CB1 antagonisti AM251 veya Rimonabant              | Poloxamer 188 bazlı <b>NLP</b>                | %67-100 (%EE)<br>20 saate kadar salım                                                                  | [179, 180] |
| Erkek C57BL/6J fare modeli<br><i>in vivo</i>                                                                | DAGL $\beta$ inhibitörü KT109                                                | DOPE, DSPC bazlı <b>Lipozom</b> sistemi       | KT109 ile makrofaj aktivasyonu ↑<br>DAGL $\beta$ , TNF- $\alpha$ ve PGE2 ↓                             | [181]      |
| -                                                                                                           | AEA                                                                          | FAAH içeren lipit vezikül                     | Hücreye AEA alımı ↑                                                                                    | [182]      |
| Erkek Yeni Zelanda Beyaz tavşan modeli<br><i>in vivo</i>                                                    | CB1 ve/veya CB2 agonisti $\Delta$ 9-THC ve $\Delta$ 9-THC-valin-hemisüksinat | <b>SLN</b>                                    | 90-360 dakika içinde göz içi basınç ↓                                                                  | [152]      |
| Erkek İsveç fare modeli<br><i>in vivo</i>                                                                   | CB1 ve/veya CB2 agonisti CBD                                                 | <b>NLP</b>                                    | %99.9 (%EE)<br>Antinosiseptik etki<br>5-90 dakika yavaş ve kontrollü salım                             | [183]      |
| PC12 sıçan feokromositoma hücre hattı<br><i>in vitro</i><br><br>Dişi C57BL/6J fare modeli<br><i>in vivo</i> | Kurkumin ve HU-211                                                           | <b>SLN</b>                                    | Antidepresan etki ↑<br>Hücre salım ↑<br>Kurkumin %18.34 (%EE), HU-211 %0.74 (%EE)<br>%77 Salım (7 gün) | [184]      |

**Dipnot:** %EE: %Enkapsülasyon etkinliği; SMA: stiren maleik asit; DAGL $\beta$ : Diaçilgliserol lipaz beta; DOPE: dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; DSPC:1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; FAAH: Yağ asidi amid hidrolaz; AEA: Anandamid; Dexanabinol: sentetik kannabinoid;  $\Delta$ 9-THC-valin-hemisüksinat:  $\Delta$ 9-Tetrahidrokanabinol; CBD: kannabidiol; NLP: Lipit Nanopartikül; NMDA: n-metil-d-aspartat reseptör; SLN: katı lipit nanopartikül; HU-211: Deksanabinol

### **Tezin gerekçe ve varsayımı;**

Çocuklarda ve gençlerde yaygın rastlanan, hızlı metastaz ile mortalite oranı artan osteosarkom için klinikte uygulanan tedavi ajanlarının sınırlı küratif etkisi ve yüksek yan etki potansiyelleri yeni ilaç adaylarının araştırılmasını önemli kılmaktadır. Literatürde kannabinoid yüklü salım sistemlerine ilişkin çalışmalar bulunmakla birlikte osteosarkomda hedefe yönelik tedavi için geliştirilen lipit bazlı ilaç taşıma sistemlerine ilişkin bilgiler oldukça sınırlıdır. Yarı ömrü kısa olan hidrofobik kannabinoidlerin hedef tümör bölgesinde uzun süreli ve kontrollü salımı için lipit bazlı ilaç sistemlerinin geliştirilmesi önemlidir. Bu doğrultuda literatürde CB2 reseptörünü yüksek ifade ettiği bilinen osteosarkom hücrelerinde sentetik, spesifik CB2 reseptör agonisti CB65'in ve CB65 yüklü lipozomal ilaç taşıma sisteminin uzun süreli ve kontrollü salımı ile *in vitro* koşullarda osteosarkom hücrelerinde CB2 reseptörü aracılı doz ve zaman bağımlı hücre çoğalmasını azaltıcı ve hücre ölümünü uyarıcı etki potansiyeli değerlendirilebilir. Bu çalışma ile ilk kez geliştirilen CB2 agonisti CB65 yüklü lipozomal ilaç taşıma sisteminin osteosarkom hücrelerinde başarılı etki gösterebilirse, osteosarkom hücrelerinin apoptozunu uyarıcı etki gösterebilecek yeni bir tedavi adayı olarak sunulabilir. Şekil 2.3'de çalışmanın gerekçe ve varsayımı özetlenmiştir.



**Şekil 2.3.** Sentetik, spesifik CB2 agonisti CB65'in osteosarkom hücrelerinde CB2 reseptörü aracılı olası antiproliferatif, anti-invaziv ve apoptotik etkisi ve etki mekanizmaları gösterilmiştir. (ERK: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz, Akt: Protein kinaz B, Bad: Bcl-2 ile ilişkili hücre ölüm proteini, Bd-2: Beta defensin-2, Bax: Bcl-2 ile ilişkili X proteini, cAMP: Siklik adenosin monofosfat; ERK 1/2: Ekstrasellüler sinyal regüle edici kinaz ½; JNK: c-Jun N-terminal kinaz, MAPK: Mitojen aktive edici protein kinaz, p38: p38 Mitojenle aktive olan protein kinazlar, VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü, Ang-2: Anjiyotensin-2, MMP2/9: Matriks metaloproteinaz-2/9, mTOR: Rapamisin'in memeli hedefi, PI3k: Fosfatidilinositol 3-kinaz)

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

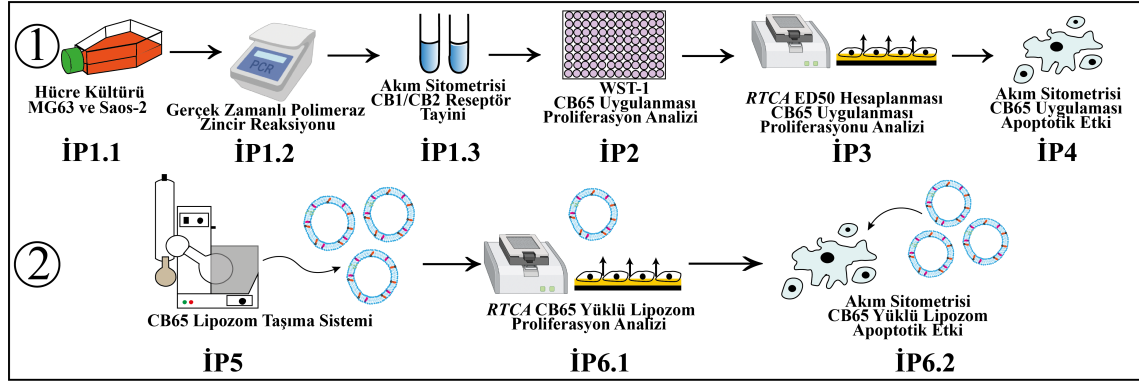
**Deney Tasarımı;** bu tez çalışması kapsamında *in vitro* koşullarda deney ve kontrol gruplarının (belirlenen doz aralığında CB65 ve DMSO içeren besiyeri uygulanmış osteosarkom hücreleri) karşılaştırıldığı gözlemsel bir deney gerçekleştirilmiştir. Çalışma, disiplinler arası, rastgele seçilmiş (randomize), *in vitro* koşullarda, kontrol grubu içeren, ileriye yönelik (prospektif) şekilde planlanmıştır. Hücre sayısı ve uygulanan ilaç dozları bağımsız değişkenleri; proliferasyon ve apoptoz analizleri bağımlı değişkenleri oluşturmaktadır. İstatistiksel çalışma yapılması için güç analizi “Tek Yönlü Varyans Analizi” ile gerçekleştirilmiş olup %95 güven aralığı, %80 test gücü,  $f=0.40$  etki büyüklüğü (yüksek) ve %5 hata payı ile yapılan hesaplama göre her grup için tekrar sayıları hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Tez çalışması kapsamında belirlenen deney ve kontrol gruplarındaki tekrar (n) sayıları, bağımlı ve bağımsız değişken grupları gösterilmiştir.

| Bağımsız Değişkenler                             |             | Bağımlı Değişkenler             |                                          |                     |
|--------------------------------------------------|-------------|---------------------------------|------------------------------------------|---------------------|
| Gruplar                                          | Hücre Hattı | WST-1 Proliferasyon Analizi (n) | Gerçek Zamanlı Proliferasyon Analizi (n) | Apoptoz Analizi (n) |
| <b>10<sup>-6</sup> M CB65</b>                    | Saos-2      | 6                               | -                                        | -                   |
|                                                  | MG63        | 6                               | -                                        | -                   |
| <b>10<sup>-7</sup> M CB65</b>                    | Saos-2      | 6                               | -                                        | -                   |
|                                                  | MG63        | 6                               | -                                        | -                   |
| <b>10<sup>-8</sup> M CB65</b>                    | Saos-2      | 6                               | 5                                        | -                   |
|                                                  | MG63        | 6                               | 5                                        | -                   |
| <b>10<sup>-9</sup> M CB65</b>                    | Saos-2      | 6                               | 5                                        | -                   |
|                                                  | MG63        | 6                               | 5                                        | -                   |
| <b>10<sup>-10</sup> M CB65</b>                   | Saos-2      | 6                               | 5                                        | -                   |
|                                                  | MG63        | 6                               | 5                                        | -                   |
| <b>10<sup>-11</sup> M CB65</b>                   | Saos-2      | 6                               | 5                                        | 3                   |
|                                                  | MG63        | 6                               | 5                                        | 3                   |
| <b>10<sup>-12</sup> M CB65</b>                   | Saos-2      | 6                               | 5                                        | -                   |
|                                                  | MG63        | 6                               | 5                                        | -                   |
| <b>Kontrol</b>                                   | Saos-2      | 6                               | 5                                        | 3                   |
|                                                  | MG63        | 6                               | 5                                        | 3                   |
| <b>CB65 – Lipozom (10<sup>-11</sup> M Salım)</b> | Saos-2      | -                               | 8                                        | -                   |
|                                                  | MG63        | -                               | 8                                        | -                   |

Bu tez çalışması, Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı kapsamında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

laboratuvarlarının alt yapısı ve teknik donanımı kullanılarak tamamlanmıştır. Lipozom temelli ilaç taşıma sisteminin geliştirilmesi ve analizine ilişkin deneysel çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı ve Analitik Kimya Anabilim Dalı destekleri ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında yapılan deneylere ait iş akışı şematize edilmiştir.

### 3.1. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında CB Reseptör Düzeylerinin Saptanması

#### 3.1.1. Hücre Kültürü

Kannabinoid reseptörleri aracılı etkinin değerlendirilmesi amacıyla klasik kannabinoid reseptörlerini bulundurdıkları literatürde bildirilen **Saos-2** (ATCC®, HTB-8™) [1, 185] ve **MG63** (ATCC®, CRL-1427™) [1, 117, 118, 185] insan osteosarkom hücre hatları optimal kültür koşullarında ekspanse edilmiştir. Saos-2 hücreleri McCoy's 5A; MG63 hücreleri *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (DMEM HG) besiyeri ile beslenmiştir. Bazal besiyerleri DMEM HG ve McCoy's 5A için %10 FBS, %2 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin ile hazır hale getirilmiştir. Kannabinoid reseptörlerinin varlığının değerlendirilmesi için literatürde kannabinoid reseptörlerini eksprese ettiği saptanmış A549 KHDAC (ATCC®, CRM-CCL-185™) [186] hücre hattı pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. A549 hücreleri, %10 FBS, %2 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin ile zenginleştirilmiş DMEM HG besiyeri ile beslenmiştir. Tez çalışması sonlanana kadar hücre kültürü çalışmaları devam etmiştir.

#### 3.1.2. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında Reseptör Varlığının Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Yöntemiyle Değerlendirilmesi

### 3.1.2.1. RNA İzolasyonu

Saos-2 osteosarkom hattında reseptör ifadesinin değerlendirilmesi amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle gen ifade analizi gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol hücre hattı olarak literatürde yüksek seviyede kannabinoid reseptör ekspresyonu gösterdiği bilinen A549 KHDAK hattı [186] kullanılmıştır. Bu doğrultuda %70-80 oranda konfluense ulaşan Saos-2 ve A549 hücrelerinin besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile üzerine trizol RNA izolasyon materyali ortama eklenerek kültür kabının yüzeyine yapışmış olan hücreler kaldırılmıştır. Toplanan hücreler 1.5 ml hacimli tüplere alınmıştır. RNA izolasyon işlemi (RNA izolasyon kiti, Hybrid-R RNA Isolation, GeneAll, Güney Kore) [187-189] için örneklerin üzerine 1 ml RiboEx başına 200 µl kloroform eklenip karıştırılmış, +4° C sıcaklıkta 15 dakika boyunca 12000g'de santrifüj edilmiştir. Tüpteki renksiz üst faz steril 1.5 ml hacimli tüplere aktarılmıştır. Aktarılan üst faza 1 birim RBI tamponu eklenip karıştırılmıştır. Karışım mini-F tipi kolona aktarılmış ve oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 10000g'de santrifüjlenmiştir. Kolondan süzülen kısım uzaklaştırılmış ve mini kolon tekrar tüpe yerleştirilmiştir. Aynı işlem tekrar edildikten sonra mini kolona 500 µl SWI tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 10000g'de santrifüj edilmiştir. Örnekler 500 µl RNW tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 10000g'de santrifüjlenmiştir. Mini kolondaki membranın merkezine 50-100 µl nükleaz içermeyen saf su eklenmiş ve 1 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10000g'de santrifüjlenmiştir. İzole edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflığı, NanoDrop spektrometre ile 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülerek değerlendirilmiştir.

### 3.1.2.2. cDNA Sentezi ve qRT-PCR Analizi

cDNA sentez kiti (*cDNA Synthesis Kit, Nucleogene*, Türkiye) ile yapılan cDNA sentezi için 500 ng RNA kullanılmıştır. qRT-PCR aşaması için üretici firma tarafından temin edilen CB1, CB2, GPR55, TRPV1 ve *house-keeping* GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) primer dizileri ile *SYBR Green Master Mix* (Nucleogene, Türkiye) ve RNA içermeyen saf su içeren qPCR karışımı gerçek zamanlı PCR cihazına (LightCycler® 480, Roche, İsviçre) yüklenmiştir [190, 191]. qRT-PCR aşaması için temin edilen primer dizileri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Genlere ait göreceli mRNA ifade analizi için “ $2^{-\Delta\Delta CT}$ ” kantitatif hesaplama yöntemi ve *ViiATM 7 Software v1.2.4* kullanılmıştır.

**Çizelge 3.2.** qRT-PCR çalışmasında kullanılan GAPDH, CnR1, CnR2, TRPV1 ve GPR55 reseptör seviyesinin değerlendirilmesi için hazırlanan oligonükleotid dizileri gösterilmektedir.

| Gen                                               |                | Oligonükleotid Dizisi            |
|---------------------------------------------------|----------------|----------------------------------|
| GAPDH                                             | <i>Forward</i> | 5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3'    |
| GAPDH                                             | <i>Reverse</i> | 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAG-3'      |
| CB1 Reseptörü (CnR1)                              | <i>Forward</i> | 5'-TACCTGATGTTCTGGATCGG-3'       |
| CB1 Reseptörü (CnR1)                              | <i>Reverse</i> | 5'-CCATGCGGGCTTGGTCTG-3'         |
| CB2 Reseptörü (CnR2)                              | <i>Forward</i> | 5'-CTATCCACCTTCCTACAAAGC-3'      |
| CB2 Reseptörü (CnR2)                              | <i>Reverse</i> | 5'-TGAGGCACAGCATGGAGCAG-3'       |
| Transient reseptör potansiyel vanilloid-1 (TRPV1) | <i>Forward</i> | 5'-GGCTGTCTTCATCATCCTGCTGCT-3'   |
| Transient reseptör potansiyel vanilloid-1 (TRPV1) | <i>Reverse</i> | 5'-GTTCTTGCTCTCCTGTGCGATCTTGT-3' |
| G protein ilişkili reseptör 55 (GPR55)            | <i>Forward</i> | 5'-GTCGTCTTCGTGGTCTCCTT-3'       |
| G protein ilişkili reseptör 55 (GPR55)            | <i>Reverse</i> | 5'-GATGTTAGAGAAACACAGAGACAAGT-3' |

### 3.1.3. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında Reseptör Varlığının Akım Sitometrisi Yöntemiyle Değerlendirilmesi

MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücre hatlarında CB1 ve CB2 reseptör varlığı akım sitometrisi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kültürü gerçekleştirilen hücrelerden besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından tripsinizasyon işlemi ile hücreler kaldırılmış ve 15 ml hacimli santrifüj tüplerine alınmıştır. Hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra 100 µl hücre süspansiyonu içerisinde  $7 \times 10^5$  hücre olacak şekilde %3 paraformaldehit (PFA) ile fiks edilmiştir. Hücreler 15 dakika +4 °C'de inkübasyona bırakılmış ardından 2 kez 500 µl PBS ile yıkanarak +4 °C 500g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kannabinoid reseptörleri hücre içi ve hücre zarında bulunduklarından [192-194] akım sitometrisi ile hücre içi ve zarda immün işaretleme yapılmıştır. Bu doğrultuda santrifüjlenen hücreler hücre içi ve hücre zarı için ayrı tüplere bölüştürülerek immün işaretleme için hazır hale getirilmiştir. Hücre içi CB1 ve CB2 kannabinoid düzeyi için hücre içi örnekleri %0.2 Tween-20 içeren 100 µl PBS içinde süspanse edilmiş ve +4 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyonun ardından hücreler 2 kere 500 µl PBS ile yıkanarak +4 °C 500g'de 5 dakika

santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırılarak ve 1:100 oranında anti-insan CB1 (ab3558, Abcam, Birleşik Krallık) ve anti-insan CB2 (ab3561, Abcam, Birleşik Krallık) primer antikorları %1 sığır serum albümin (BSA) ve %0,1 sodyum azit içeren 100 µl PBS içinde hücre içi ve hücre zarı örneklerine eklenerek +4 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından hücreler 2 kere 500 µl PBS ile yıkanarak +4 °C’de 500g’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırılmış ve 1:100 oranında %1 BSA ve %0,1 sodyum azit içeren 100 µl PBS içinde Goat Anti-Rabbit IgG sekonder antikor (ab7086, Abcam, Birleşik Krallık) eklenerek +4 °C’de 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından hücreler 2 kere 500 µl PBS ile yıkanarak +4 °C’de 500g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre peleti 100 µl PBS içinde tekrar süspansiyon edilerek 12x75 ml’lik falkon tüplerine alınmıştır. Aynı protokol pozitif kontrol A549 hücreleri için uygulanmıştır. Her örnek için 50,000 olgu akım sitometrisi cihazında (Novocyte 2000R Flow Cytometer System, Agilent, Amerika Birleşik Devletleri) 495 nm absorpsiyon ve 528 nm ekzitasyon gösteren FITC ile işaretli dalga boylarında analiz edilmiştir.

### **3.2. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında CB65’in Hücre Çoğalmasına Etkisinin Değerlendirilmesi**

CB2 reseptörünü akım sitometrisi yöntemleri ile yüksek oranda bulundurduğu saptanan MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücrelerinin optimum kültür koşulları %70-80 konfluense ulaşması sağlandıktan sonra besiyeri PBS ile uzaklaştırılmış, ardından tripsinizasyon aşaması ile hücreler kültür kabından kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler 15 ml hacimli tüplere alınarak santrifüjlenmiş ve süpernatant kısımları uzaklaştırılmıştır. Saos-2 ve MG63 hücrelerinin her biri için 3 ayrı hücre plakası kullanılarak ve 96 kuyucuklu kültür plakalarının her bir kuyucuğuna 200 µl hücre süspansiyonu içerisinde  $5 \times 10^3$  hücre gelecek şekilde hücreler ekilmiştir. Konfluense ulaşan hücrelerdeki tüm besiyeri uzaklaştırılmış ve 200 µl hacimde farklı dozlarda ( $10^{-12}$  –  $10^{-6}$  M) [119, 195] CB65 besiyeri içinde hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır. DMSO veya etanolde çözölen CB65 kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hücrelere sırası ile 1, 2 ve 3. günlerde *Water Soluble Tetrazolium-1* (WST-1) ajanı (11644807001, Roche Applied System, İsviçre) her bir kuyucuğuna 10µl eklenmiş, ardından plakalar 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından hücrelerin proliferasyon düzeyleri *VersaMax Microplate Reader* (Molecular Device, ABD) mikroparka okuyucu ile belirlenmiştir. Tüm gruplarda

proliferasyon düzeyi en fazla azalan gün/günler saptanmış ve CB2 agonisti CB65'in etkili doz aralığı saptanmıştır.

### **3.3. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında CB65'in Proliferasyonu Azaltıcı ED50'sinin Gerçek Zamanlı Olarak Değerlendirilmesi**

MG63 ve Saos-2 hücre hatlarında sentetik spesifik CB2 agonisti CB65'in proliferasyonu azaltıcı etki düzeyinin WST-1 yöntemiyle değerlendirilmesini takiben CB65'in hücrelerdeki doz ve zaman bağımlı etkisinin gerçek zamanlı ölçülebilmesi amacıyla tabanı impedansı kaydeden altın mikroeletrotlarla kaplı 96 kuyucuklu hücre plakalarına hücre kültüründe optimal kültür koşullarında çoğaltılan ve %70-80 konfluense ulaşan MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücreleri ekilmiştir. Bunun için hücreler tripsinizasyon işlemi ile kültür kabından kaldırıldıktan sonra 15 ml hacimli tüplere alınarak santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler her bir kuyucuğa  $7 \times 10^3$  hücre/200 µl hücre süspansiyonu gelecek şekilde hesaplanarak her bir kuyucuğa ekim yapılmıştır. Hücre plakası xCELLigence (RTCA, Roche Applied System, İsviçre) cihazına yerleştirilmiştir [196-198]. Gerçek zamanlı olarak hücrelerin tabana yaptıkları basının impedansına ait veriler 15 dakikada bir "hücre indeksi" olarak kaydedilmiş ve hücre indeksi 1.0'ı geçtikten sonra WST-1 analizinin sonuçlarına göre belirlenen dilüsyonlarda ( $10^{-12}$  –  $10^{-8}$  M) besiyeri içinde hazırlanan CB65 hücrelere uygulanmıştır. Her doz hücrelere 5 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak DMSO/Etanol içeren besiyeri hücrelere uygulanmıştır. Ayrıca besiyeri kaynaklı olası etkinin değerlendirilmesi amacıyla 3'er kuyuya hücre içermeyen besiyeri (McCoy's 5A ile DMEM HG) tek başına eklenmiştir. Saos-2 hücreleri için 713 saat, MG63 hücreleri için 420 saat süre ile hücre indeksi kaydedilmiştir. Bu yöntemle CB2 agonisti CB65'in proliferasyonu azaltıcı ED50'nin tespit edilmesi sağlanmıştır.

CB2 reseptörü aracılı etkinin izlenmesi amacıyla sentetik, spesifik CB2 antagonisti AM630 (1120, Tocris, Birleşik Krallık), literatürde inhibitör etkinliği bildirilen dozlarda ( $1 \times 10^{-8}$  M,  $2 \times 10^{-8}$  M ve  $5 \times 10^{-8}$  M) besiyeri içinde hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır [195, 199, 200]. Tüm dozlar hücrelere 4 tekrarlı olacak şekilde uygulanmıştır. Saos-2 hücreleri için 760 saat, MG63 hücreleri için 550 saat süre ile hücre indeksi kaydedilmiştir.

### 3.4. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatlarında CB65'in Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi

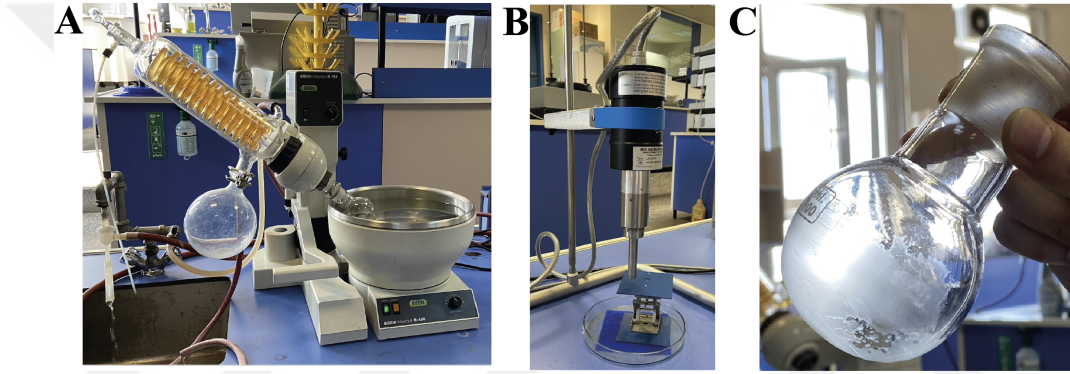
Gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile MG63 ve Saos-2 hücreleri için belirlenen ED50 CB65'in aynı hücrelerdeki apoptotik etki düzeyi *Annexin-V/Propidium Iodide (FITC Annexin Apoptosis Detection Kit I, 556547 – BD Pharmingen, ABD)* işaretlemesi yapılarak akım sitometrisi ile değerlendirilmiştir [201-203]. *Annexin V* apoptotik hücrelerin dış zarı üzerindeki fosfatidilserini (PS) saptamak için kullanılır [1]. Geç apoptotik ve nekrotik hücreler DNA'ya bağlanan floresan bir boya olan PI işaretlemesi ile ayırt edilmiştir. Erken apoptotik hücreler *Annexin V*, geç apoptotik hücreler *Annexin V* ve *PI* ile işaretlenmektedir. Bu doğrultuda hücreler 6 kuyucuklu kültür kabına ekilmiş ve %70-80 konfluense ulaştıklarında ED50'de CB65 ve çözücü içeren besiyeri hücrelere uygulanmıştır. Gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile belirlenen etkili zamana bağlı olarak hücrelere ilaç uygulaması yapılmış ve MG63 hücreleri için 48, Saos-2 hücreleri için 24 saatlik inkübasyonun sonunda hücreler *Accutase* ile kültür plağından kaldırılmıştır. Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant uzaklaştırılmış ve hücreler 2 defa soğuk *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS) ile yıkanmış ve besiyerinden arınması sağlanmıştır. 1X *Binding Buffer* ile konsantrasyon  $1 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde ayarlandıktan sonra 100 µl hücre süspansiyonu 12x75mm'lik falkon tüplerine alınmıştır. Hücrelere 5 µl *Annexin V* ve 5 µl *PI* eklendikten sonra hücreler yavaşça vortekslenmiş ve 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası 400 µl 1X *Binding Buffer* eklenmiş ve 1 saat içerisinde akım sitometri (Novocyte 2000R Flow Cytometer System, Agilent, ABD) cihazında analiz edilmiştir. Gruplar arasında erken ve geç apoptotik hücre düzeyi canlı hücre düzeyiyle karşılaştırılmıştır.

### 3.5. ED50'si Belirlenen CB65'in Kontrollü Salınımını Sağlayabilecek Lipozom Temelli İlaç Taşıma Sisteminin Geliştirilmesi

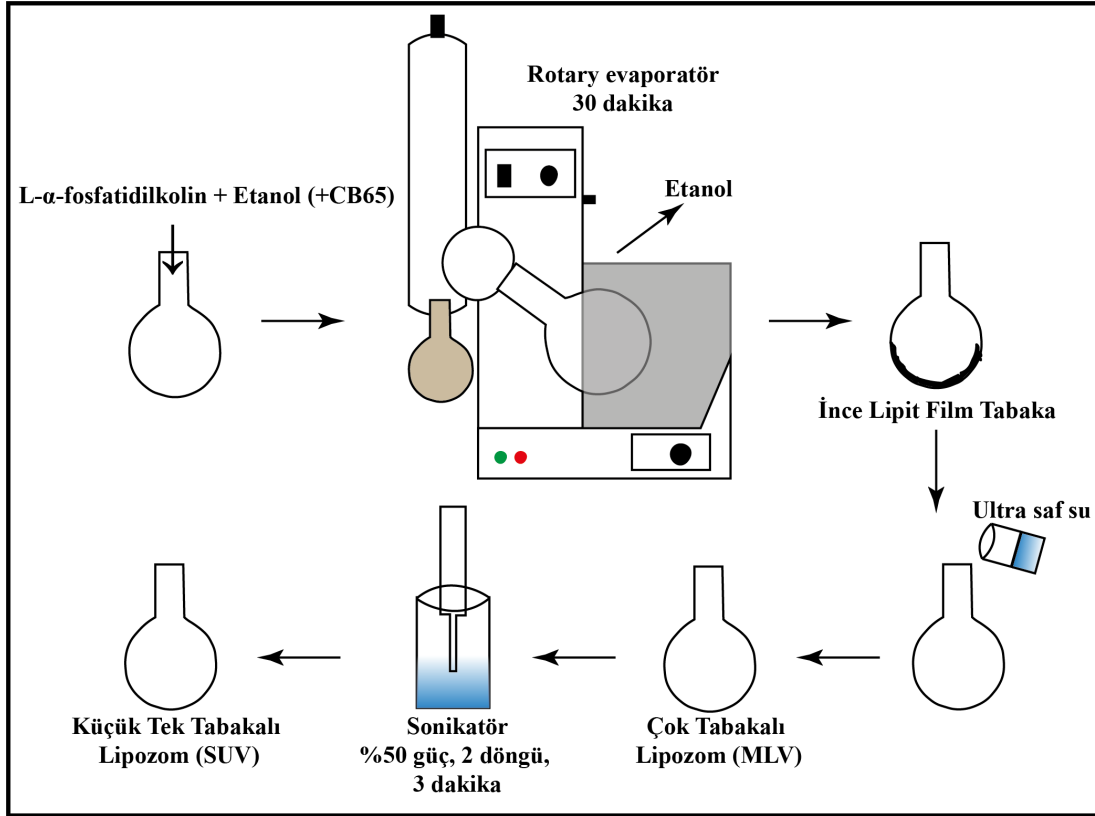
#### 3.5.1. CB2 Agonisti CB65 Yüklü Lipozom Formülasyonunun Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında lipozom formülasyonlarının hazırlanması için ince film tabaka oluşturma yöntemi kullanılmıştır [145, 154]. Lipozomların hazırlanması amacıyla fosfolipit türevlerinden biri olan L- $\alpha$ -Fosfatidilkolin (*Soy bean – %95*) lipit olarak, kolesterol (Sigma Aldrich, ABD) ise stabilite arttırıcı olarak seçilmiştir [154]. İlk aşamada 50 mg lipit, 6.25 mg kolesterol ve stok 400 ppm CB65 etkin maddesi (Tocris, Cat. No. 2663, Batch No: 1A/262758) 3 farklı dozda 0.2, 0.4 ve 0.8 mg olacak şekilde

ayrı ayrı balonlar içerisinde 12.5 ml etanolde 10 dakika çözündürülmüştür. Organik çözücü, *rotavaporda* (Şekil 3.2.A; IKA RV 10 digital, Almanya) alçak basınçta 20-30 dakika süreyle (40°C, 100 rpm) uçurulmuş ve balonun alt kısmında ince bir lipit film tabakası (Şekil 3.2.C) oluşması sağlanmıştır. Ardından lipit film üzerine 10 ml ultrasaf su eklenerek sonikatör (Şekil 3.2.B; Bandelin Sonopuls HD 2070, Almanya) yardımıyla (%50 güç, 2 döngü, 3 dakika) rehidrate edilmiştir. Sonikasyon aşaması büyük çok tabakalı vezikülleri (MLV) küçük tek tabakalı veziküllere (SUV) dönüştürmek amacıyla uygulanır. İlaçsız lipozom için kullanılan protokolde sadece organik faz aşamasında CB65 etkin maddesi eklenmemiştir. Formülasyon hazırlama protokolü Şekil 3.3’de şematize edilmiştir.



**Şekil 3.2.** Lipozomal formülasyonların hazırlanmasına ilişkin protokolde kullanılan (A) *Rotary Evaporatör* cihazı, (B) sonikatör cihazı ve (C) oluşan ince film lipozom tabakası gösterilmiştir.



**Şekil 3.3.** İlaç yüklenmiş ve yüklenmemiş lipozom hazırlama basamakları şematize edilmiştir.

### 3.5.2. Lipozomal Formülasyonunun *in vitro* Koşullarda Karakterizasyonu

ICH kılavuzuna (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use*) göre, hazırlanan ilaç yüklü nanolipozomların stabilitesinin +4 °C'de 2-3 ay, ilaç içermeyen lipozomların stabilitesinin yaklaşık 3 ay olduğu bilinmektedir [178]. +4°C sıcaklıkta formülasyonların bekletilmesi kimyasal reaksiyon hızını düşürmekte ve stabilite süresini uzatmaktadır [204, 205]. Bu bilgilerden hareketle, tez çalışmasının bu aşamasında hazırlanan lipozom formülasyonları için *in vitro* koşullarda +4°C ve 25 °C sıcaklıkta 3 ay boyunca 0. gün, 7. gün, 1. ve 3. ay zaman periyotlarında alınan numunelerde, partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, miktar tayini ve enkapsülasyon etkinliği parametrelerinin değerlendirilmesi göz önüne alınarak stabilite çalışmaları yapılmıştır. Osteosarkom hücreleri için en uygun formülasyon seçilerek hücre kültürü çalışmalarında bu formülasyon kullanılmıştır.

Hazırlanan ilaçsız ve yüklü lipozomların partikül büyüklüğü (PB), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (ZP) analizleri dinamik ışık saçılımı tekniği ile kapiler zeta kuvvetleri kullanılarak *Zetasizer Nano ZS* cihazı ile ölçülmüştür. Hazırlanan lipozomal formülasyonlardan 0.9 ml alınarak zeta kuvvetlerine yerleştirilmiş ve 3 tekrarlı olarak ölçüm alınmıştır.

İlaç yükleme kapasitesi (%EE) ve ilaç salım profilinin belirlenmesinde sıvı kromatografi elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi (LC-ESI-MS/MS) analitik miktar tayin yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem kritik dozlu ilaçları optimize etmek için kullanılır ve gelişmiş özgüllük ile hassaslık sağlar. İlaç yükleme kapasitesi için n=3 tekrarlı olacak şekilde CB65 yüklü ve ilaçsız lipozomal formülasyonlar hazırlanmış, 20.000g'de 4°C sıcaklıkta santrifüj edilmiş ve süpernatantlar ayrıştırılarak ölçüm yapılmıştır. Yükleme kapasitesi, enkapsülasyon etkinliği (% EE) ve ilaç yükleme kapasitesi olarak verilmiş ve aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

**Enkapsülasyon Etkinliği (%)** =  $(\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Çöken etkin madde miktarı}) / (\text{Toplam etkin madde miktarı}) \times 100$

**İlaç Yükleme Kapasitesi** =  $(\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Çöken etkin madde miktarı} - \text{Çözünmüş haldeki madde miktarı}) / (\text{Formülasyon bileşenlerinin toplam miktarı}) \times 100$

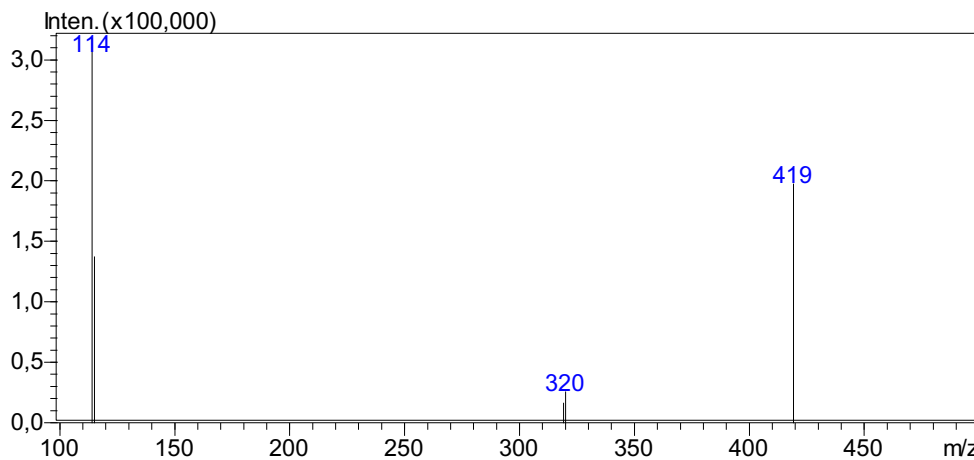
İlaç salım profilinin belirlenmesi için diyaliz membran yöntemi ile salım çalışması yapılmıştır. Bu doğrultuda, *in vitro* salım profili analizi için 14.000 Da molekül ağırlığında selüloz membranlar (Sigma-Aldrich, Cat. No. D9652, ABD) 30 dakika reseptör faz içerisinde ıslatılmıştır. Reseptör faz olarak 25 ml PBS (pH=7.4):etanol (70:30) kullanılmıştır. Hazırlanan membranlar içine taze hazırlanan 1 ml lipozomal formülasyonlar konulmuş, 37°C sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızına sahip su banyosuna yerleştirilmiştir. Salım ortamından 30. dakika, 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 6. saat, 8. saat ve 24.saat olacak şekilde 1 ml örnek alınmış ve aynı hacimde taze reseptör faz ilave edilerek deney gerçekleştirilmiştir. Alınan örneklerin miktar tayini LC-MS/MS yöntemi ile yapılmış ve salım profili grafiği % CB65 kümülatif salımı olarak elde edilmiştir.

LC-ESI-MS/MS analitik tayin yöntemi ile yapılan CB65 miktar tayini çalışmalarında kullanılan kalibrasyon eğrisi için su ve asetonitril (1:1) içeren hareketli faza 10 ppm stok CB65 eklenmiş ve 5.0 (5 ppm) – 0.05 (0.05 ppm) µg/ml değişim aralığında eklenerek

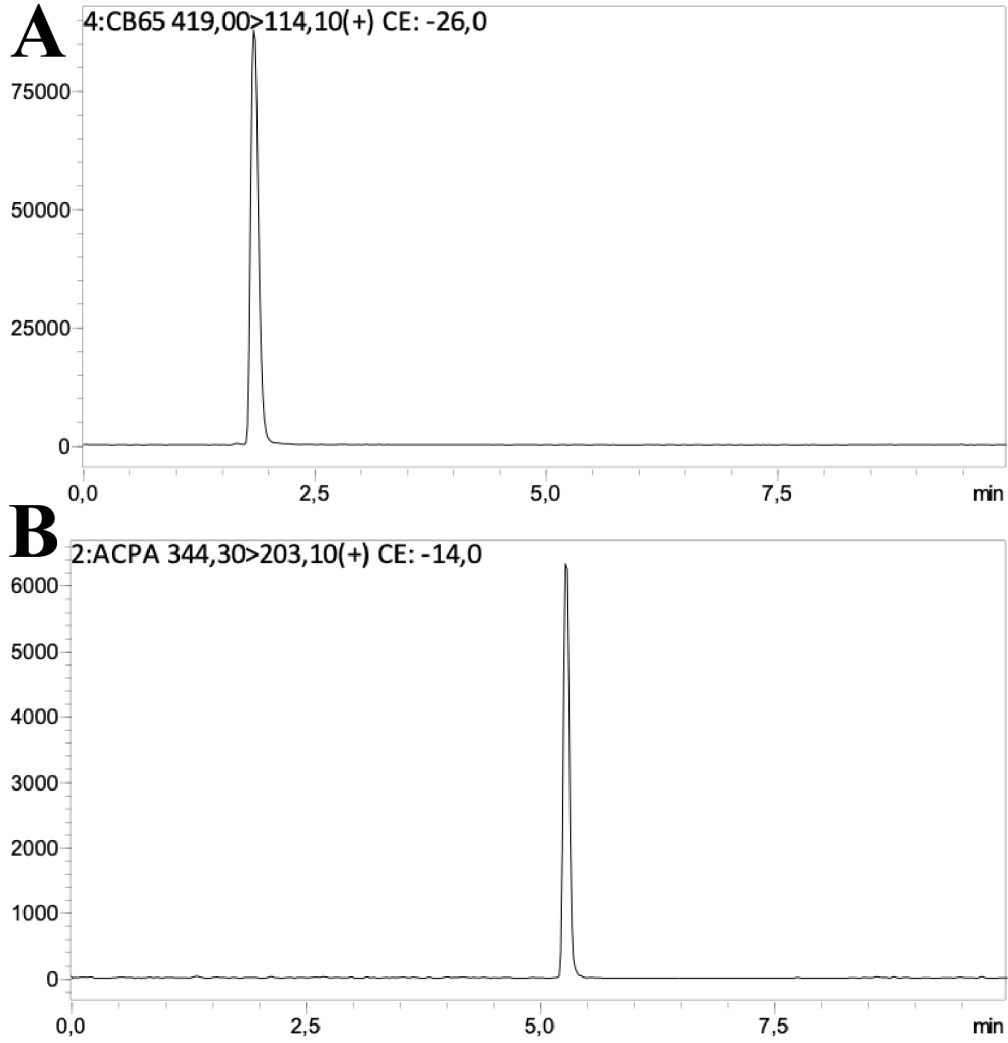
hazırlanmıştır. Her kalibrasyon noktasına iç standart olarak 10 µl ACPA eklendikten sonra analiz yapılmıştır.

**LC-ESI-MS/MS Analiz Koşulları:** LC-ESI-MS/MS sistemi (Shimadzu, Japonya), üçlü bir dört kutuplu tandem kütle spektrometresi (Shimadzu 8030 MS/MS) ile birleştirilmiş bir LC sisteminden (Shimadzu LC-20AXR) oluşmaktadır. Kromatografik ayırmalar, 40°C'de bir C18 kolonu (GL Sciences, 50 x 3.0 mm, 2.1 µm) kullanılarak su içinde %0.1 FA (faz A) ve asetonitril içinde %0.1 FA (faz B) gradyan elüsyonu yoluyla 0.3 ml/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Gradient elüsyon profili, 0.0–0.01 dakika %40 B, 0.01–4.0 dakika %40'dan %80 B'ye, 4.0 – 7.0 dakika %80 B, ardından başlangıç koşullarında 3 dakika dengeleme (toplam analiz süresi 10 dakika) şeklindedir. Enjeksiyon hacmi 10 µl olarak belirlenmiştir.

Pozitif iyonizasyonda çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu ile miktar tayini yapılmıştır (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5). Kaynağa bağlı optimum parametreler 4,5 kV ara yüz voltajı, -14 V çarpışma enerjisi, 250 °C desolvasyon hattı sıcaklığı ve 400 °C ısı bloğu sıcaklığıdır. Nebulizatör ve kurutmanın gaz akış hızı sırasıyla 3 l/dk ve 15 l/dk'dır. MRM tespiti için öncü ve ürün iyonları, dört kutuplu voltajlar ve çarpışma enerjileri, doğrudan enjeksiyon modunda CB65 ve iç standart (ACPA) için optimize edilmiştir. İyon geçişleri, CB65 kantitasyonu için 344→ 203 m/z (26 eV) ve iç standardın kantitasyonu için 344 → 287 m/z (14 eV) olarak belirlenmiştir. Tüm iyon geçişleri için bekleme süresi (*dwel time*) 200 ms'dir.

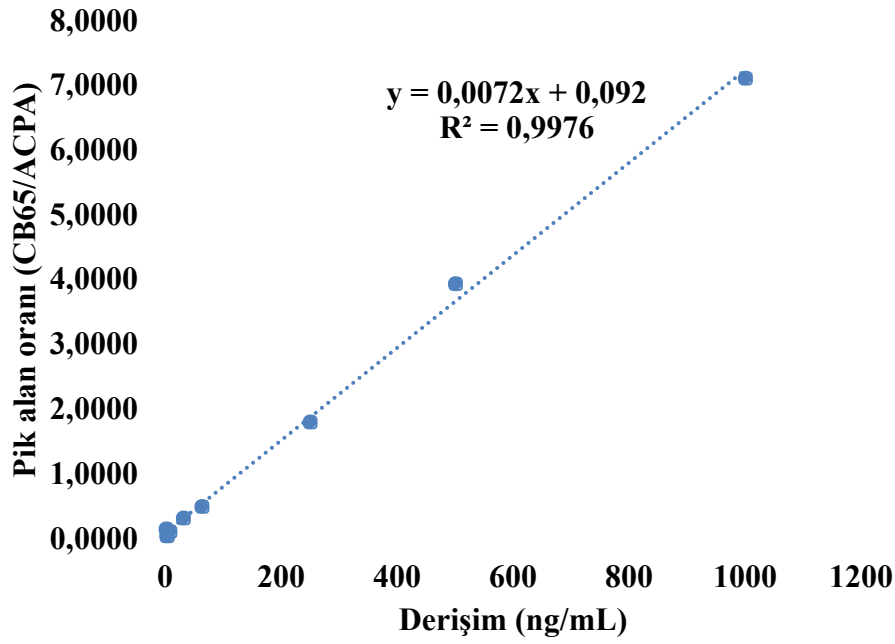


**Şekil 3.4.** CB65'in MS/MS parçalanma modeli gösterilmiştir.



**Şekil 3.5.** Optimum kromatografik koşullarda **(A)** CB65 (1 µg/ml) ve **(B)** İç standart (1 µg/ml) temsili kromatogramları gösterilmiştir.

**Doğrusallık:** Doğrusallık çalışmaları, farklı derişimlerde CB65 (0.9, 1.8, 3.75, 7.50, 15, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 ng/ml) ve sabit derişimde iç standart (1.0 µg/ml) içeren kalibrasyon çözeltilerinin geliştirilen LC-ESI-MS/MS yöntemi kullanılarak analiz edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, en küçük kareler doğrusal regresyon analizi uygulanarak, derişime (x) karşı pik alan oranı (CB65/iç standart) (y) çizilerek oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerinin 0.9-1000 ng/ml konsantrasyon aralığındaki doğru denklemi  $y=0.0072x+0.092$  ( $R^2: 0.9976$ ) olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6). Geliştirilen yöntem, belirtilen derişim aralığında CB65 için kabul edilebilir bir doğrusallık gösterdiğinden karakterizasyon çalışmalarında bu yöntem kullanılmıştır.



Şekil 3.6. CB65'e ait kalibrasyon eğrisi, CB65 derişimine (ng/ml) karşı CB65/ACPA pik alan oranı grafiğı cinsinden verilmiştir.

**Duyarlılık:** Geliştirilen yöntemin duyarlılığı, gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LLOQ) değerleri ile değerlendirilmiştir. LOD ve LOQ sırasıyla sinyal/gürültü oranının 3:1 ve 10:1 olduğu CB65 derişimi olarak belirlenmiştir. LOD, 0.006 ng/ml ve LLOQ, 0.9 ng/ml olarak bulunmuştur. Önerilen yöntemin ilaç sistemlerinde CB65 analizi için oldukça hassas olduğu görülmüştür.

### 3.6. CB65 Yüklü Lipozom Salım Sisteminin *in vitro* Koşullarda MG63 Hücre Hattındaki Proliferasyonu Azaltıcı Etkisinin Değerlendirilmesi

#### 3.6.1. Gerçek Zamanlı Proliferasyon Analizi

İş paketi 3.3'te belirtildiğı şekilde kültür ile çoğaltılan MG63 hücrelerine doz 48 saatte bir lipozomal formülasyonlar uygulanmıştır. Tripsinizasyon ile kaldırılan ve santrifüjlenen hücreler 96 kuyucuklu hücre plakalarının her kuyucuğına 200 µl hücre süspansiyonu gelecek şekilde hesaplanarak ekilmiştir. CB65 yüklü ve boş lipozomal formülasyonların gerçek zamanlı, doz bağımlı ve uzun süreli izlenmesi amacıyla hücrelerin proliferatif indeksleri xCELLigence (RTCA, Roche Applied System, İsviçre) platformunda ölçülmüştür. İş paketi 3.3'te belirtildiğı şekilde gerçek zamanlı olarak kaydedilen "hücre indeksi" 1.0'ı geçtikten sonra hazırlanan formülasyonlar, CB65'in

ED50’de salımını gerçekleştirecek şekilde besiyeri içinde seyreltilerek hücrelere uygulanmış ve salım profili analizi ile CB65’in %100’ünün besiyeri ortamına salındığı zaman dilimi belirlenerek ilaç uygulaması tekrarlanmıştır. İlaç yüklenmemiş boş lipozomal formülasyonlar ilaçlı lipozomal formülasyonlar ile aynı hacimde seyreltilerek hücrelere uygulanmıştır. CB65’in MG63 hücrelerindeki ED50 etkili zamanı esas alındığında CB65 yüklü lipozomal taşıma sistemi uygulamasının ardından hücreler 56 saat boyunca izlenmiştir. Ayrıca CB65’in lipozomal formülasyondan salımına ilişkin veriler esas alınmış ve ilaç formülasyonu MG63 hücrelerine 24 saat aralıkla 2 kez uygulanmıştır. Tüm deney ve kontrol gruplarında Saos-2 hücrelerine 24 saat aralıkla 4 kez uygulama yapılmıştır. MG63 ve Saos-2 hücreleri için 120 saat süreyle hücre indeksleri kaydedilmiştir. Her ilaç grubunun uygulandığı deney grupları ile kontrol grupları 8 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

### **3.7. Sonuçların İstatistiksel Analizi**

Tez kapsamında iş paketlerine göre bağımlı ve bağımsız değişkenler belirlenmiş ve elde edilen ham verilerin normal dağılım sağlama koşulları SPSS 25.0 istatistik programında Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir.

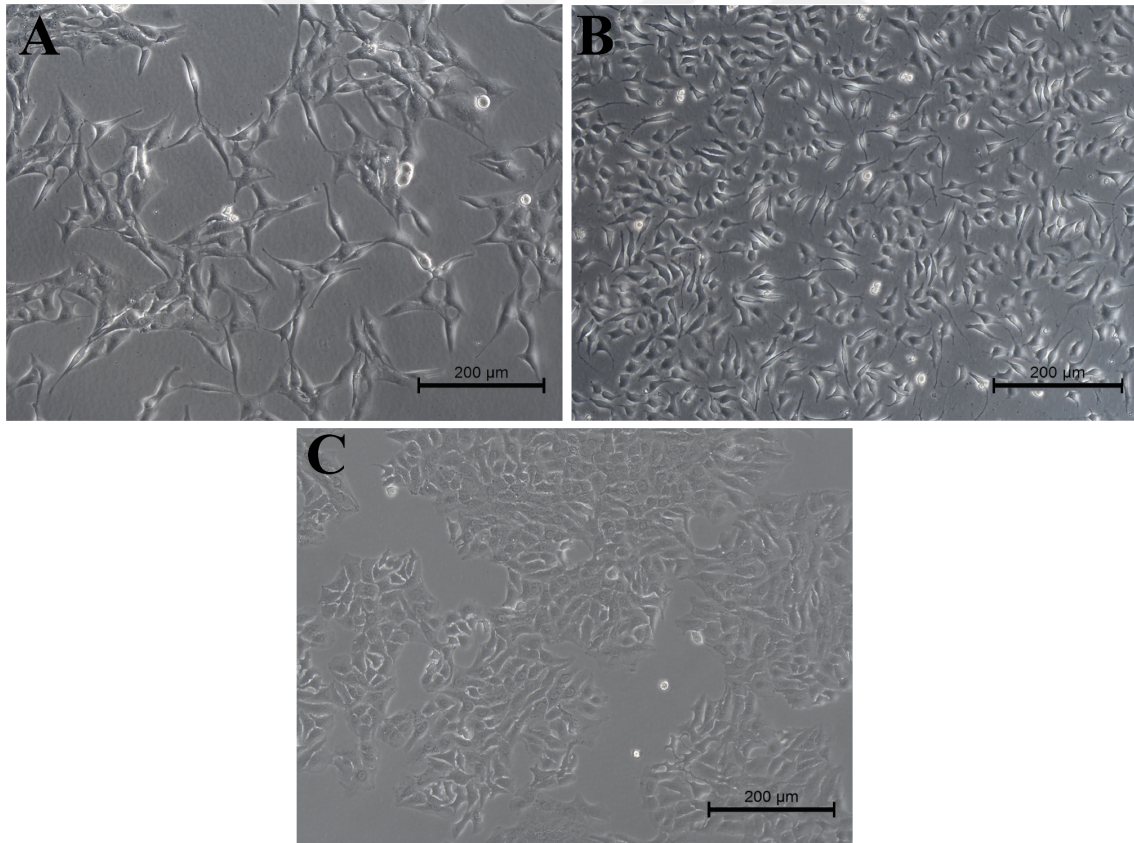
İş paketi 3.1.2, 3.2, 3.3, 3.4, 3.6.1 ile elde edilen veriler parametrik dağılım gösterdiği için verilerin çoklu karşılaştırmaları tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ikili karşılaştırmaları Duncan’s test *post hoc* testi ile değerlendirilmiştir. Veriler %95 güven aralığında değerlendirilmiş ve tanımlayıcı istatistikler parametrik test sonuçları için ortalama ve standart sapma şeklinde sunulmuştur. İş paketi 3.1.2 ve 3.3 ile elde edilen veriler arasında yapılan korelasyon analizi için Pearson korelasyon testi uygulanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. MG63 ve Saos-2 Osteosarkom Hücre Hatları Yüksek Düzeyde CB2, Düşük Düzeyde CB1 Reseptörü Bulundurmaktadır

#### 4.1.1. Hücre Kültürü

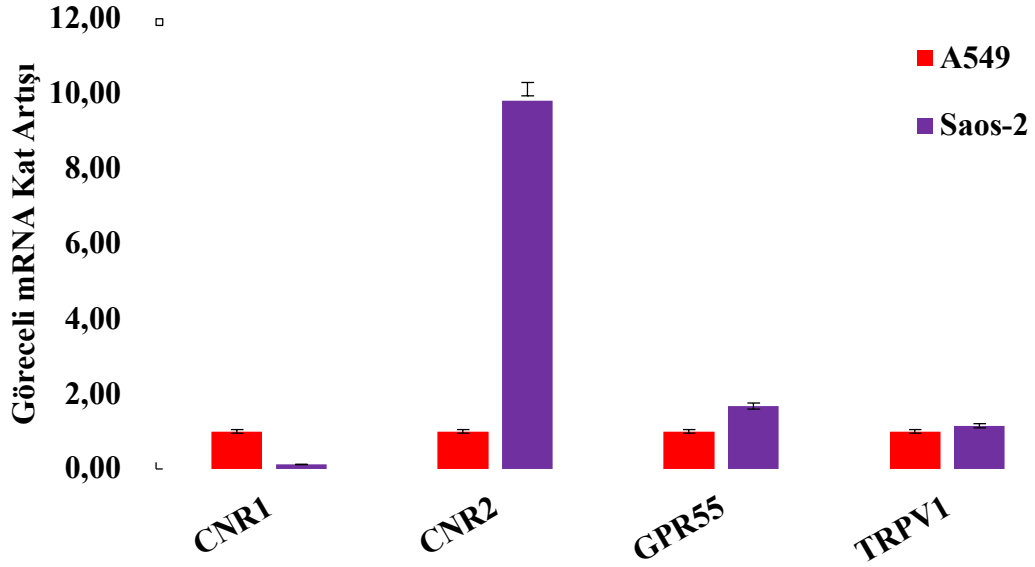
MG63 insan osteosarkom hücreleri kültür plağında oval-iğsi biçimli, çok kutuplu, uzantılı görünüm vermiştir (Şekil 4.1.A). Saos-2 insan osteosarkom hücreleri homojen boyutlu, poligonal biçimli, uzantılı hücreler olarak izlenmiştir (Şekil 4.1.B). İnsan küçük hücreli dışı akciğer kanseri A549 hücreleri heterojen büyüklükte, poligonal biçimli, epitel kökenli adenokarsinom hücreleri olarak saptanmıştır (Şekil 4.1.C). Saos-2 ve MG63 hücreleri için pasaj 20-25 ve A549 için pasaj 15-20 olacak şekilde kültüre edilerek sonraki iş paketlerinde kullanılmak üzere çoğaltılmıştır.



**Şekil 4.1.** Kültür plaklarına tutunmuş (A) oval, iğsi MG63, (B) sık yerleşimli oval Saos-2 ve (C) polimorfik A549 hücre hatlarının mikrogramları gösterilmiştir (x100).

#### 4.1.2. Saos-2 Hücre Hattı Kannabinoid Reseptörlerini qRT-PCR Yöntemiyle Değişen Oranlarda İfade Etmektedir

Saos-2 insan osteosarkom hücreleri, pozitif kontrol A549 hücrelerine göre qRT-PCR yöntemiyle yüksek oranda CB2 (CNR2) reseptör ekspresyonu göstermiştir (Şekil 4.2). Saos-2 hücreleri, A549 hücrelerine göre düşük oranda CB1 (CNR1) reseptör ekspresyonu, yüksek oranda GPR55 ve TRPV1 reseptör ekspresyonu göstermiştir.

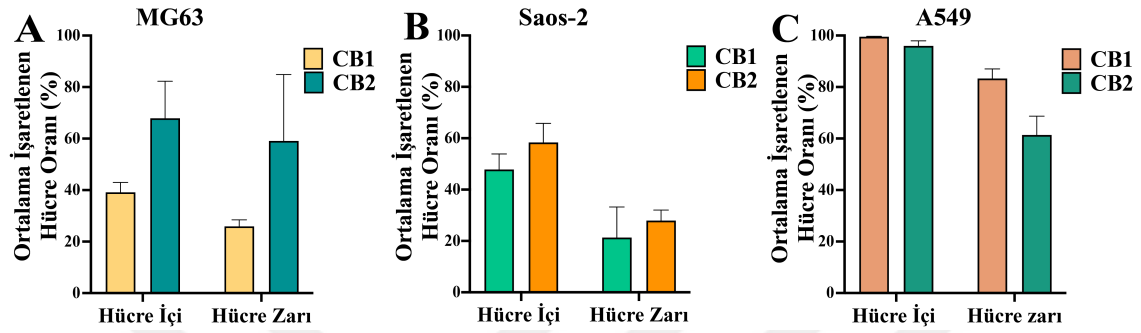


**Şekil 4.2.** Saos-2 osteosarkom ve pozitif kontrol A549 hücre hatlarına ait göreceli mRNA kat artışı grafiğinde Saos-2 hücrelerinde yüksek oranda CB2 (CNR2) reseptör ekspresyonu saptanmıştır. Saos-2 hücreleri, A549 hücrelerine göre düşük oranda CB1 (CNR1) reseptör ekspresyonu, yüksek oranda GPR55 ve TRPV1 reseptör ekspresyonu göstermiştir.

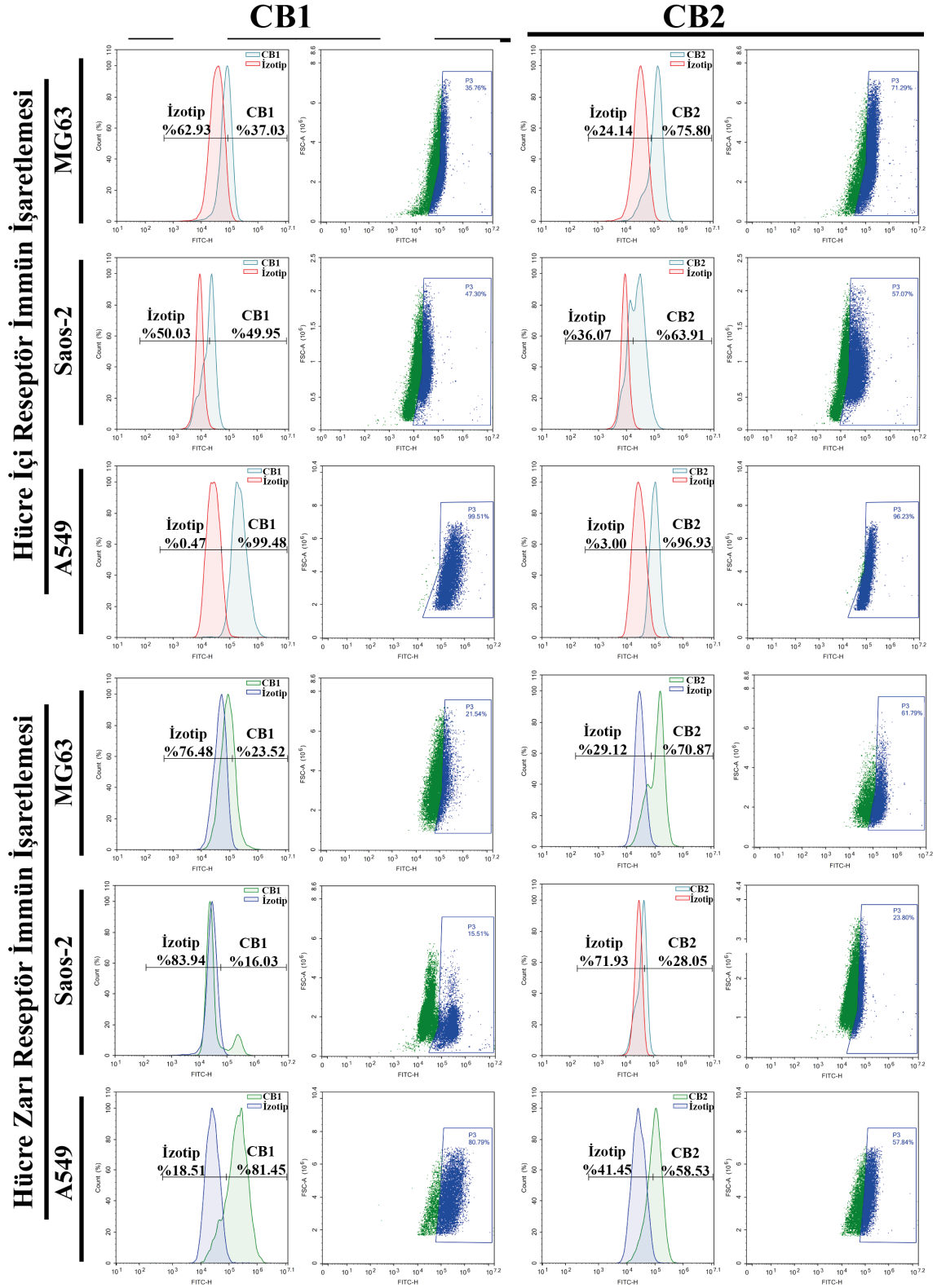
#### 4.1.3. MG63 ve Saos-2 Hücre Hatları Akım Sitometrisi Yöntemiyle CB1 Reseptörlerini Düşük CB2 Reseptörlerini Yüksek Bulundurmaktadır

MG63 hücrelerinde hücre içi ortalama CB1 ve CB2 reseptör işaretlenme oranları sırasıyla  $45.30 \pm 7.42$  ve  $65.31 \pm 12.85$  (Şekil 4.3.A, Şekil 4.4) olarak ölçülmüştür. MG63 hücrelerinde zardaki ortalama CB1 ve CB2 reseptör işaretlenme oranları sırasıyla  $43.33 \pm 29.23$  ve  $42.90 \pm 24.22$  (Şekil 4.3.A, Şekil 4.4) olarak ölçülmüştür. Saos-2 hücrelerinde hücre içi CB1 ve CB2 reseptör işaretlenme oranlarına ait ortalama değerler sırasıyla  $47.82 \pm 6.05$  ve  $50.80 \pm 16.33$  (Şekil 4.3.B, Şekil 4.4) saptanmıştır. Saos-2 hücrelerinde zardaki CB1 ve CB2 reseptörleri ortalama  $21.63 \pm 11.59$  ve  $27.85 \pm 5.82$  (Şekil 4.3.B, Şekil 4.4) olarak ölçülmüştür. A549 hücrelerinde hücre içi ortalama CB1 ve

CB2 reseptör işaretlenme oranları  $99.55 \pm 0.14$  ve  $95.96 \pm 1.97$  (Şekil 4.3.C, Şekil 4.4) saptanmıştır. A549 hücrelerinde zardaki CB1 ve CB2 reseptörleri ortalama  $83.71 \pm 3.72$  ve  $50.11 \pm 24.86$  (Şekil 4.3.C, Şekil 4.4) olarak ölçülmüştür. MG63 ve Saos-2 hatlarında CB1 ve CB2 reseptörlerine ait hücre içi ve hücre zarındaki ölçüm değerleri pozitif kontrol A549 ile karşılaştırıldığında daha düşük saptanmıştır.



**Şekil 4.3.** (A) MG63 (B) Saos-2 ve (C) A549 hücre hatlarında akım sitometrisi yöntemi ile tayin edilen hücre içi ve hücre zarı CB1 ve CB2 reseptör immün işaretlenme düzeyleri bar grafikleri ile gösterilmiştir (n=3).

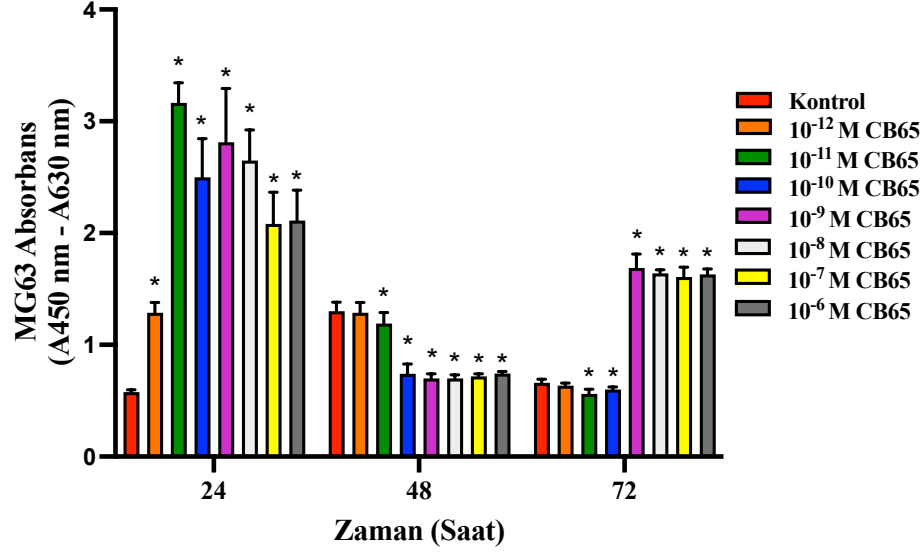


**Şekil 4.4.** MG63, Saos-2 ve A549 hücre hatlarında akım sitometrisi yöntemi ile tayin edilen hücre içi ve hücre zarı CB1 ve CB2 reseptör immün işaretlenme düzeyleri temsili histogram ve saçılım grafikleri ile gösterilmiştir.

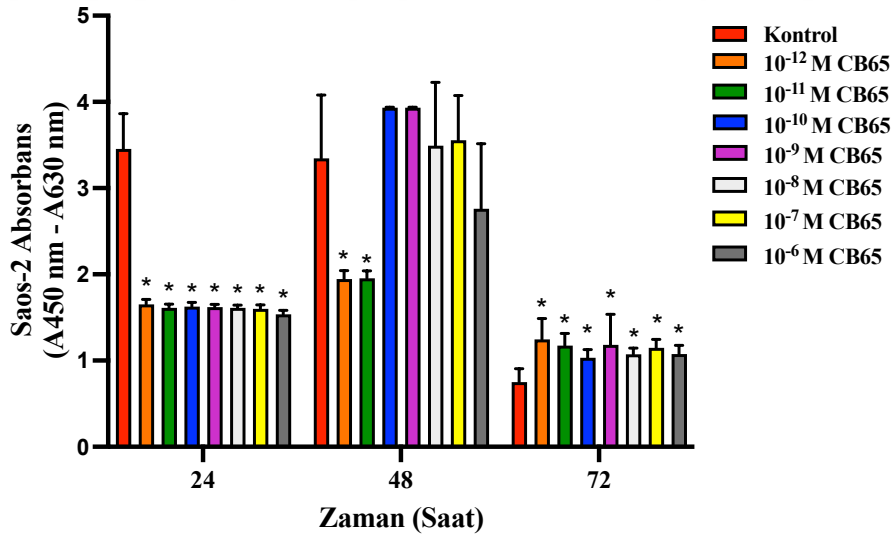
#### **4.2. CB2 Reseptörünü En Yüksek Seviyede Bulunduran MG63 ve Saos-2 Hücrelerinde Sentetik Spesifik CB2 Agonisti CB65 Hücre Çoğalmasını Azaltmaktadır**

Birinci günde CB65, uygulandığı  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M doz aralığında MG63 hücrelerinin proliferasyonunu kontrole göre arttırmıştır ( $p<0.05$ ). Hücrelerin proliferasyon hızı uygulanan dozlar ile farklılık göstermemiştir. İkinci günde CB65  $10^{-11}$ – $10^{-6}$  M doz aralığında uygulandığında MG63 hücrelerinin proliferasyonu kontrole göre azalmıştır ( $p<0.05$ ). CB65'in  $10^{-12}$  M dozda uygulanması 2. günde kontrole göre MG63 hücrelerinin büyüme hızını değiştirmemiştir. CB65 üçüncü günde  $10^{-11}$ – $10^{-10}$  M dozlarda uygulandığında kontrole göre proliferasyon hızını azaltmış ( $p<0.05$ ),  $10^{-9}$ – $10^{-6}$  M doz aralığında uygulandığında hücre çoğalmasını kontrole göre arttırıcı yönde etkilemiştir (Şekil 4.5).

Birinci günde CB65, uygulandığı  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M doz aralığında Saos-2 hücre proliferasyonunu kontrole göre azaltmıştır ( $p<0.05$ ). Hücrelerin proliferasyon hızı uygulanan dozlar ile farklılık göstermemiştir. İkinci günde CB65  $10^{-12}$ – $10^{-11}$  M dozlarda uygulandığında hücre proliferasyonu kontrole göre azalmış ( $p<0.05$ ),  $10^{-10}$ – $10^{-6}$  M dozlarda uygulandığında proliferasyonunu kontrole göre arttırmıştır ( $p<0.05$ ). CB65 üçüncü günde  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M doz aralığında uygulandığında kontrole göre proliferasyon hızını arttırmıştır (Şekil 4.6).



**Şekil 4.5.** CB65'in MG63 hücre hattının proliferasyonuna etkisi WST-1 yöntemi ile saptanmıştır. 10<sup>-12</sup>–10<sup>-6</sup> M dozda CB65 uygulanan MG63 hücrelerinin 24, 48 ve 72. saatlerdeki verileri kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak bar grafiğinde gösterilmiştir. 10<sup>-11</sup> ve 10<sup>-10</sup> M CB65 uygulamasının 24. saatte proliferatif, 48 ve 72. saatte antiproliferatif etkisi gözlenmiştir (n=6). (\*): Kontrole göre p<0.05.

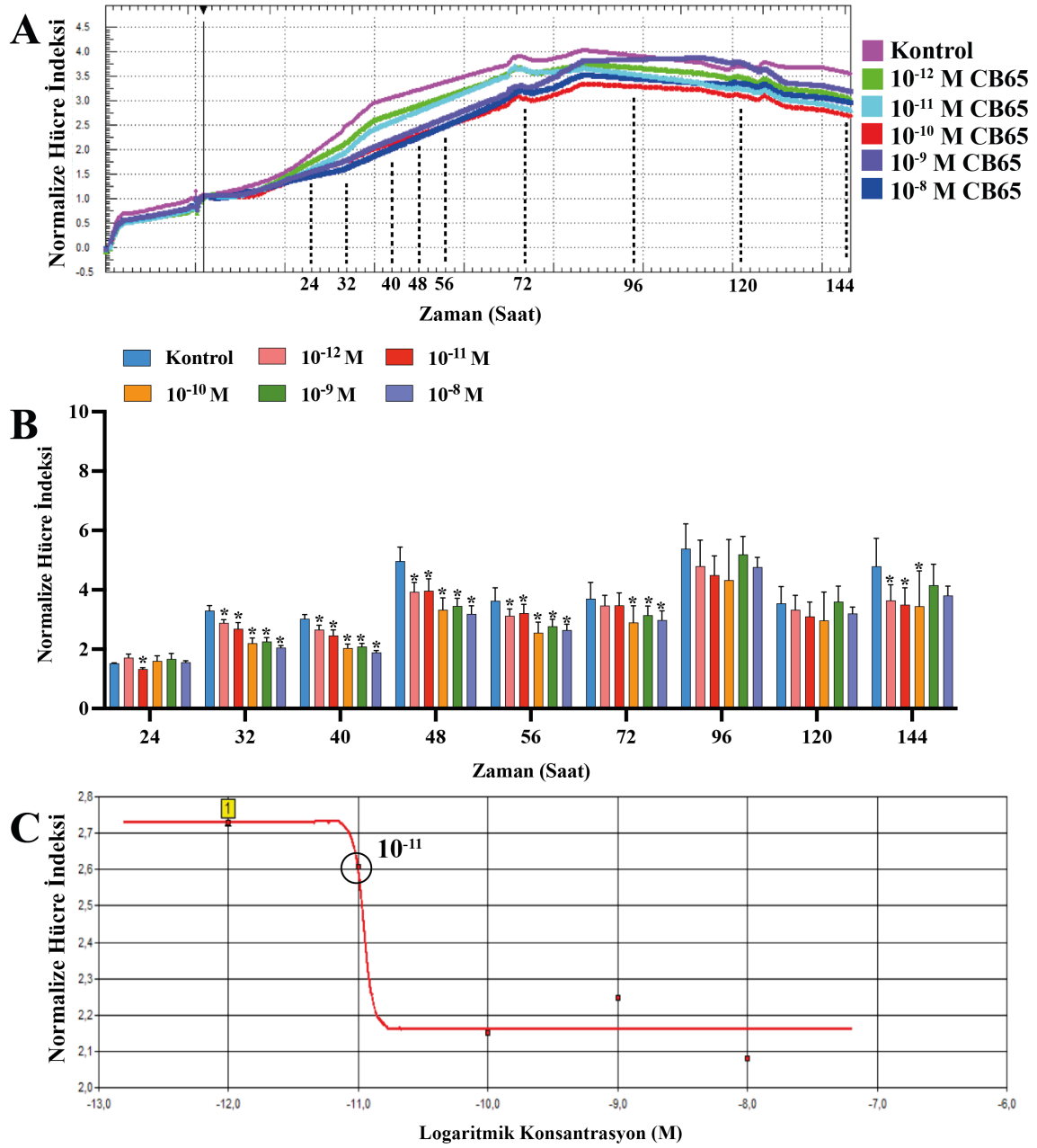


**Şekil 4.6.** CB65'in Saos-2 hücre hattındaki antiproliferatif etkisi WST-1 yöntemi ile saptanmıştır. 10<sup>-12</sup>–10<sup>-6</sup> M dozda CB65 uygulanan Saos-2 hücrelerinin 24, 48 ve 72. saatlerdeki verileri kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak bar grafiğinde gösterilmiştir. 10<sup>-11</sup> ve 10<sup>-10</sup> M CB65 uygulamasının 24 ve 48. Saatte antiproliferatif, 72. saatte proliferatif etkisi gözlenmiştir (n=6). (\*): Kontrole göre p<0.05.

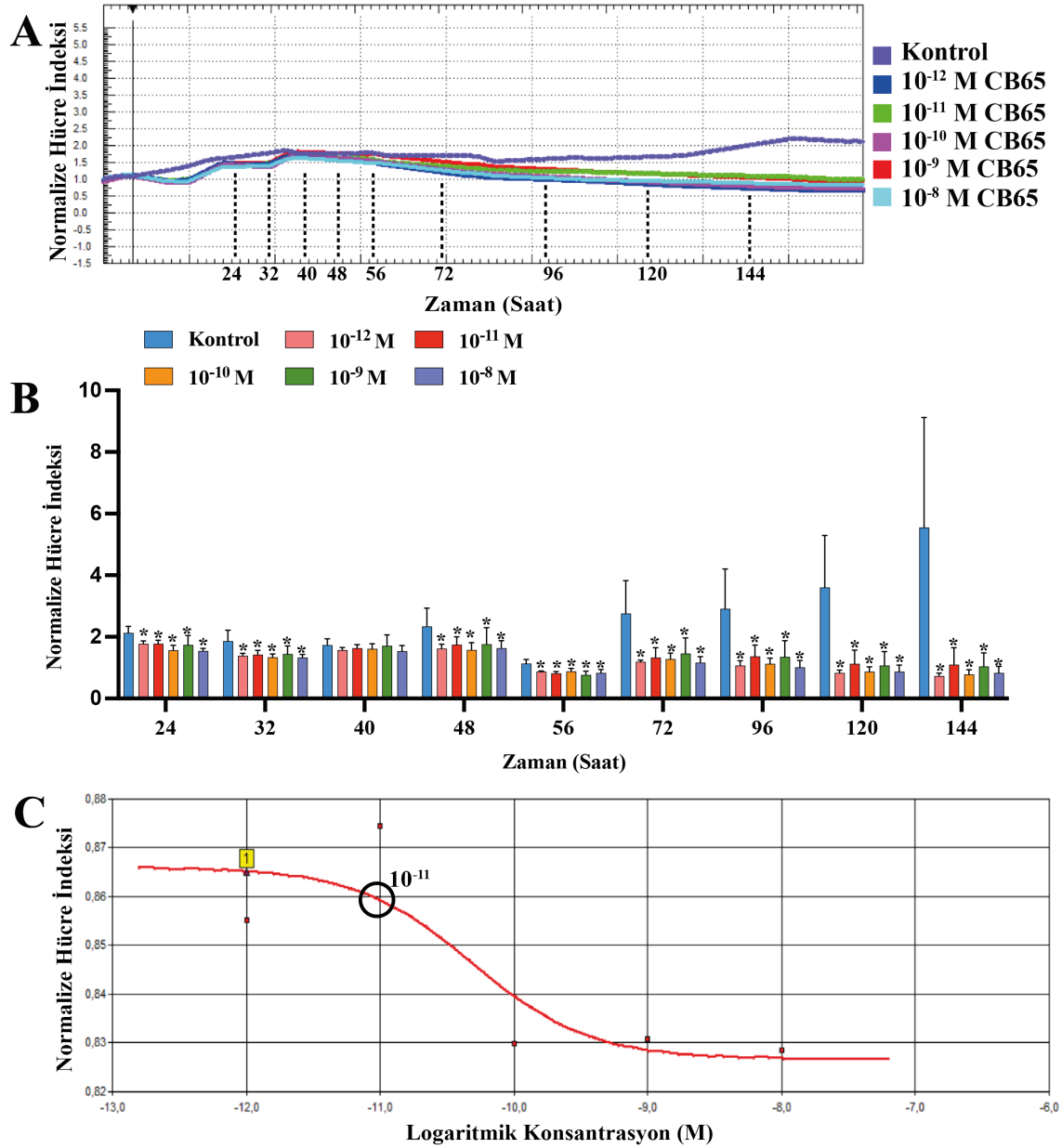
#### **4.3. Osteosarkom Hücrelerinde CB65'in Gerçek Zamanlı Spesifik Yarı Maksimum Antiproliferatif Etki Penceresi MG63 Hattı için 48. Saatte $1.11 \times 10^{-11}$ M ve Saos-2 Hattı için 24. Saatte $4.95 \times 10^{-11}$ M Olarak Saptanmıştır. Spesifik Etki CB2 Reseptör Antagonisti ile Bloke Olmuştur**

Sentetik spesifik CB2 agonisti CB65 WST analizi ile belirlenen etkili doz aralığında uygulandığında MG63 hücrelerinin proliferasyonunda 24. saatten itibaren azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.7.A).  $10^{-12}$ – $10^{-8}$  M CB65 uygulanan MG63 hücrelerinin proliferasyonu 32. saatten itibaren 144. saate kadar kontrole göre istatistiksel anlamlı azalmıştır (Şekil 4.7.B,  $p < 0.05$ ). CB65'in MG63 hücrelerindeki antiproliferatif ED50 değeri 46. saatte  $1.11 \times 10^{-11}$  M ( $R^2 = 0.958$ ) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7.C). Belirlenen doz aralığında CB65 uygulandıktan sonra Saos-2 hücrelerinin proliferasyonunda 24. saatten itibaren azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.8.A).  $10^{-11}$  M CB65 uygulanan Saos-2 hücrelerinin proliferasyonu 24. saatten itibaren 144. saate kadar kontrole göre istatistiksel anlamlı azalmıştır (Şekil 4.8.B,  $p < 0.05$ ).  $10^{-11}$  M CB65, Saos-2 hücreleri için en etkili antiproliferatif doz olarak değerlendirilmiştir. CB65'in Saos-2 hücrelerindeki 20. saatte ED50 değeri  $4.95 \times 10^{-11}$  M ( $R^2 = 0.577$ ) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.8.C). Akım sitometrisi yöntemiyle ortalama CB2 immün işaretlenme oranı Saos-2 hücrelerine göre yüksek saptanan MG63 hücrelerinde, CB65'in antiproliferatif etkisinin Saos-2 hücrelerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9). MG63 hücre hattında saptanan CB2 reseptör immün işaretlenme oranı ile ilacın gerçek zamanlı tedavi penceresi arasında kuvvetli pozitif korelasyon saptanmıştır (Şekil 4.8.A,  $R^2 = 0.912$ ,  $p = 0.002$ ). Saos-2 hücre hattında saptanan CB2 immün işaretlenme oranı ile ilacın gerçek zamanlı tedavi penceresi arasında kuvvetli pozitif korelasyon saptanmıştır (Şekil 4.8.B,  $R^2 = 0.851$ ,  $p = 0.007$ ). Ancak Saos-2 hücrelerindeki korelasyon katsayısı MG63 hücrelerindeki göre düşük olarak bulunmuştur.

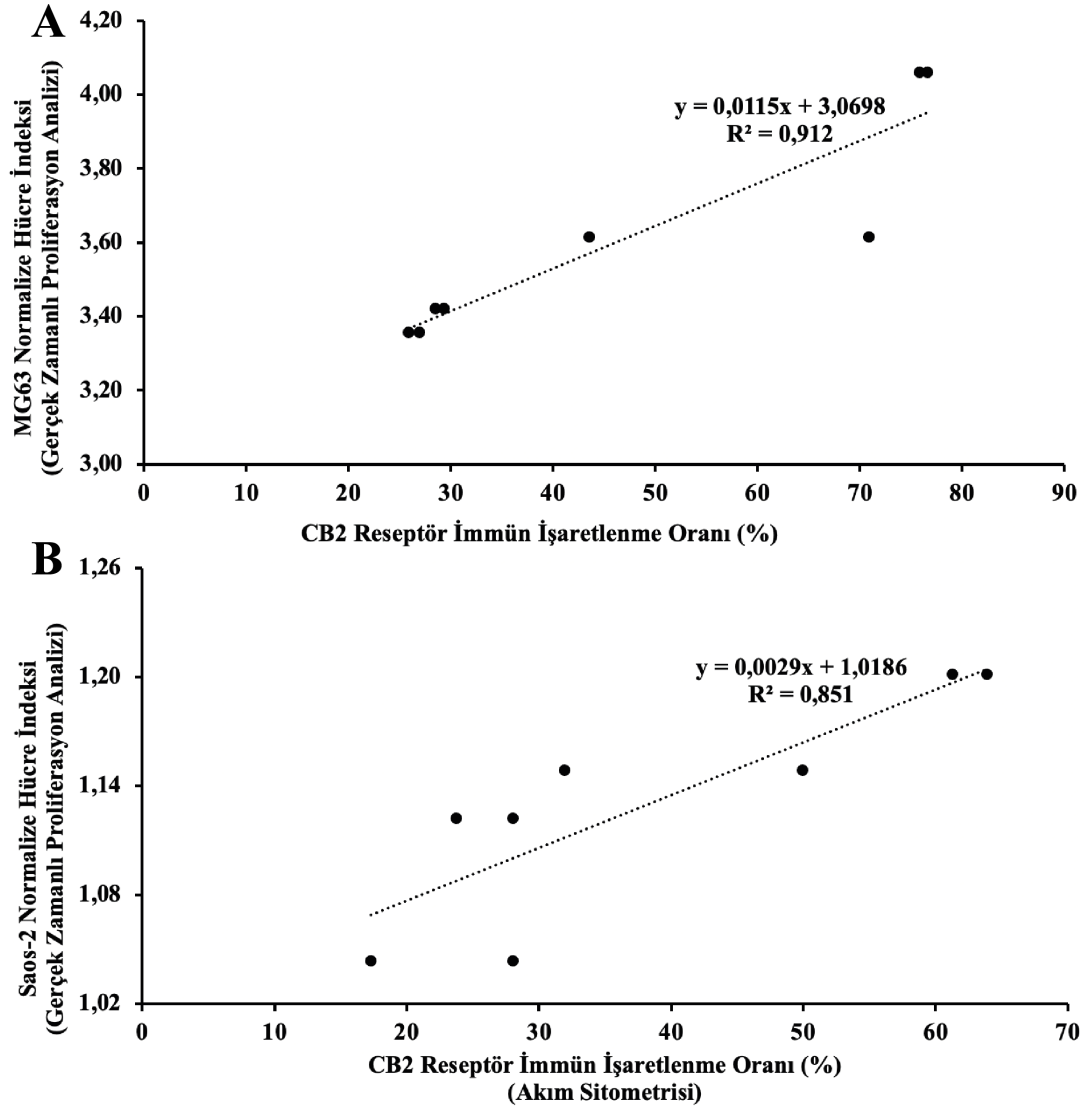
Spesifik CB2 reseptör antagonisti AM630, CB65 ile beraber uygulandığında  $5 \times 10^{-8}$  M dozda, CB65'in MG63 hücrelerindeki antiproliferatif etkisini terapötik pencereyi kapsayan 24. saatten 144. saate kadar inhibe etmiştir (Şekil 4.10.A ve Şekil 4.10.B). AM630, CB65 ile beraber uygulandığında  $1 \times 10^{-8}$  M ve  $2 \times 10^{-8}$  M dozlarda CB65'in MG63 hücrelerindeki antiproliferatif etkisini terapötik pencerenin içindeki 24. saatten 40. saate kadar inhibe etmiş, etki 40. saatten itibaren sonlanmıştır. Spesifik CB2 reseptör antagonisti AM630, CB65 ile beraber uygulandığı tüm dozlarda ( $1 \times 10^{-8}$ ,  $2 \times 10^{-8}$  ve  $5 \times 10^{-8}$  M) CB65'in Saos-2 hücrelerindeki antiproliferatif etkisini terapötik pencereyi kapsayan 32. saatten 144. saate kadar inhibe etmiştir (Şekil 4.11.A ve Şekil 4.11.B).



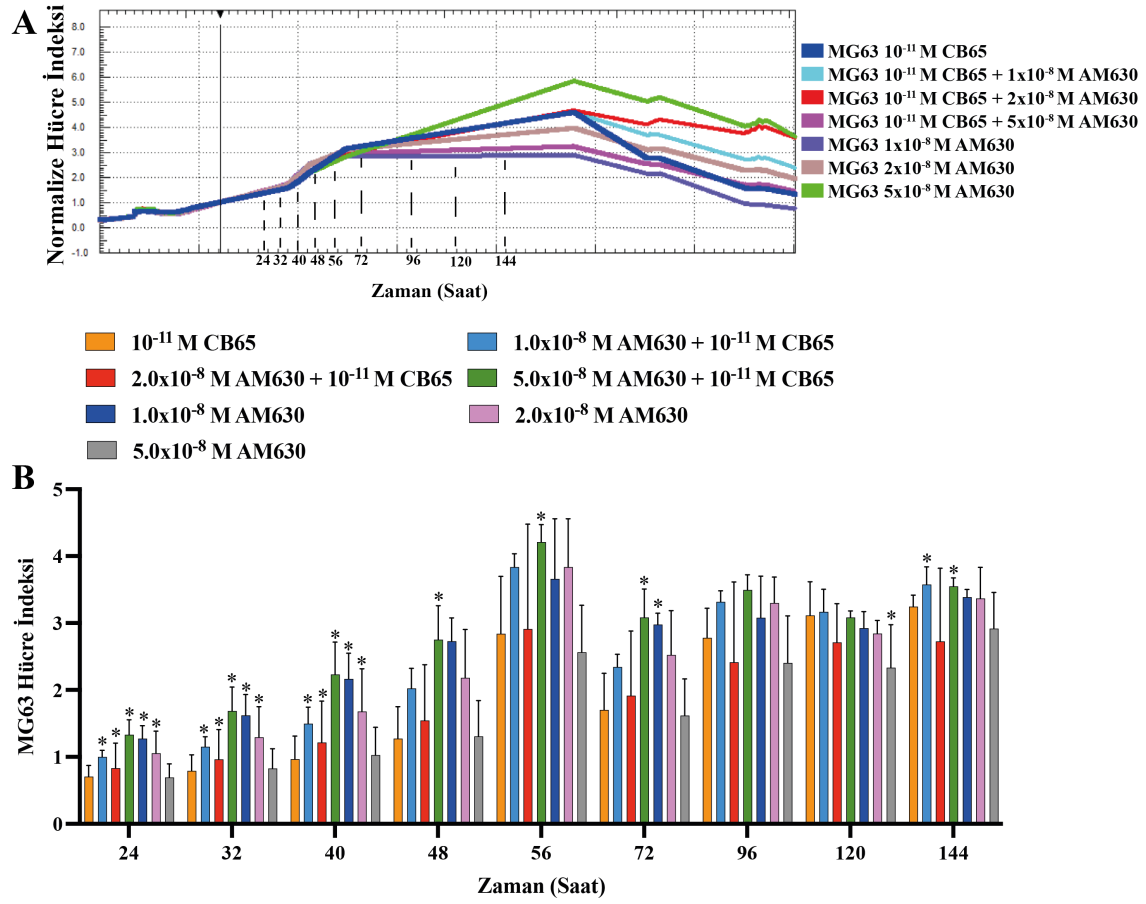
**Şekil 4.7.** CB65'in MG63 osteosarkom hücre hattındaki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır (n=5). **(A)** Zamana bağlı normalize hücre indeks grafiğinde antiproliferatif etki penceresi 24-144. saatlerde gözlenmektedir. **(B)** Zamana karşı normalize hücre indeksini her doz için gösteren bar grafiğinde, CB65  $10^{-11}$  M dozda hücre çoğalmasını 24-144. saatlerde kontrole göre azaltmıştır. (\*): Kontrole göre  $p < 0.05$ . **(C)** CB65'in logaritmik konsantrasyonlarına karşı normalize hücre indeksi grafiğinde ED50  $1.11 \times 10^{-11}$  M ( $R^2 = 0.958$ ) olarak hesaplanmıştır.



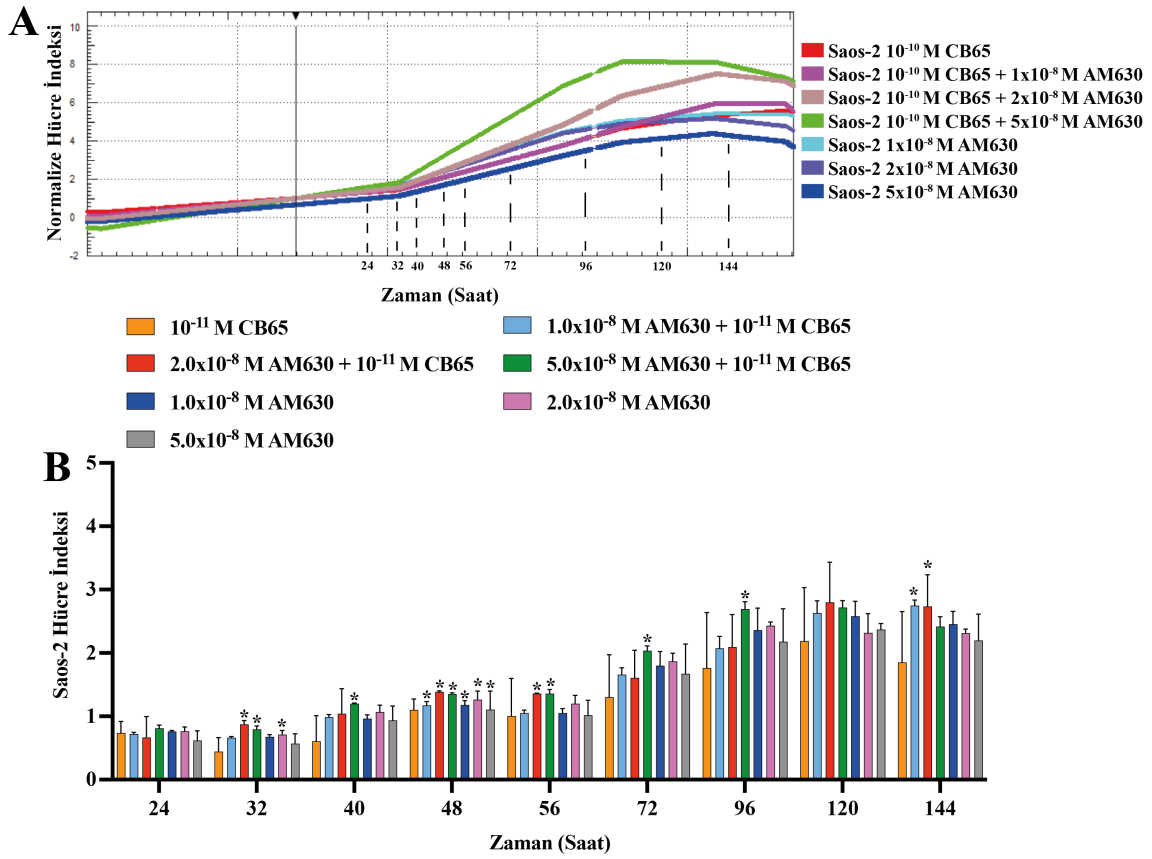
**Şekil 4.8.** CB65'in Saos-2 osteosarkom hücre hattındaki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır (n=5). **(A)** Zamana bağlı normalize hücre indeksi grafiğinde antiproliferatif etki penceresi 24-144. saatlerde gözlenmektedir. **(B)** Zamana karşı normalize hücre indeksini her doz için gösteren bar grafiğinde, CB65  $10^{-11}$  M dozda hücre çoğalmasını 24-144. saatlerde kontrole göre azaltmıştır. (\*): Kontrole göre  $p<0.05$ . **(C)** CB65'in logaritmik konsantrasyonlarına karşı normalize hücre indeksi grafiğinde ED50  $4.95 \times 10^{-11}$  M ( $R^2=0.740$ ) olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.9. (A) MG63 ve (B) Saos-2 osteosarkom hücrelerinin CB2 reseptörü ile immün işaretlenme yüzdesi ile CB65'in hücrelerdeki antiproliferatif etkisi arasındaki kuvvetli pozitif korelasyon dağılım grafiği ile gösterilmiştir.**



**Şekil 4.10.** CB65'in MG63 osteosarkom hücre hattındaki CB2 reseptörü aracılı agonistik etkisi spesifik CB2 reseptör antagonisti AM630 ile bloke olmuştur (n=4). **(A)** Zamana bağlı normalize hücre indeks grafiğinde etkinin bloke olduğu zaman aralığı 24-144. saatler olarak gözlenmektedir. **(B)** Zamana karşı normalize hücre indeksini gösteren bar grafiğinde AM630 CB65 ile birlikte uygulandığında  $5 \times 10^{-8}$  M dozda 24-144. saatlerde,  $1 \times 10^{-8}$  ve  $2 \times 10^{-8}$  M dozlarda 32-40. saatlerde agonistik etkiyi bloke etmiştir. (\*): Kontrole göre  $p < 0.05$ .

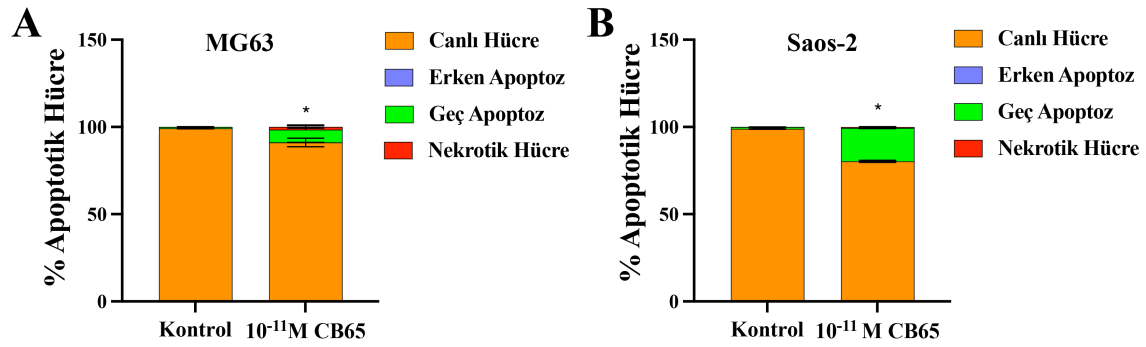


**Şekil 4.11.** CB65'in Saos-2 osteosarkom hücre hattındaki CB2 reseptörü aracılı agonistik etkisi spesifik CB2 reseptör antagonisti AM630 ile bloke olmuştur (n=4). **(A)** Zamana bağlı normalize hücre indeks grafiğinde etkinin bloke olduğu zaman aralığı 24-144. saatler olarak gözlenmektedir. **(B)** Zamana karşı normalize hücre indeksini gösteren bar grafiğinde AM630 CB65 ile birlikte uygulandığı tüm dozlarda ( $1 \times 10^{-8}$ ,  $2 \times 10^{-8}$  ve  $5 \times 10^{-8}$  M) 24-144. saatlerde agonistik etkiyi bloke etmiştir. (\*): Kontrole göre  $p < 0.05$ .

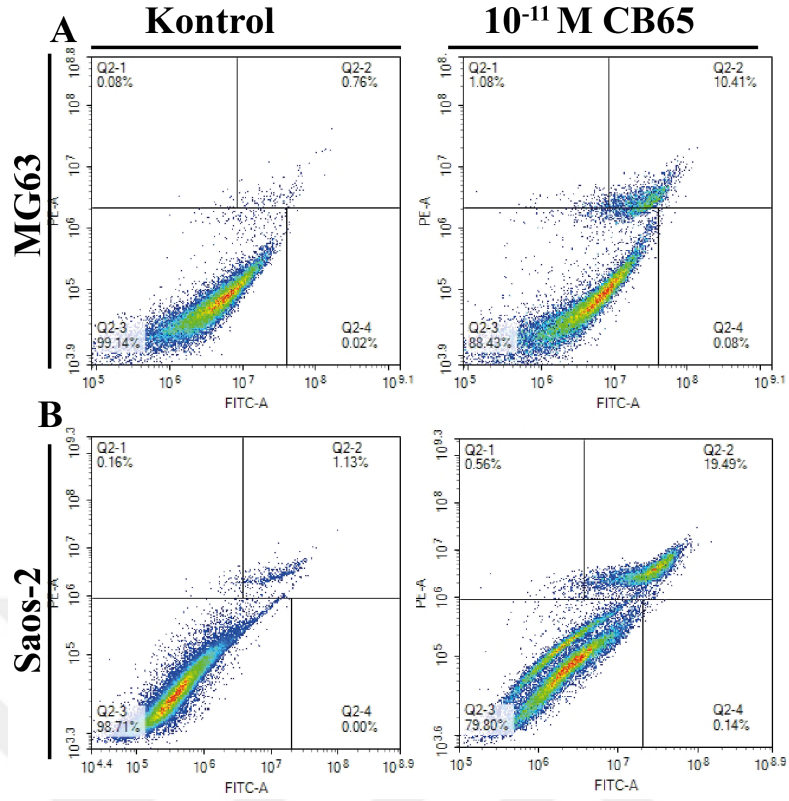
#### 4.4. Sentetik Spesifik Kannabinoid CB2 Agonisti CB65 Akım Sitometrisi ile MG63 ve Saos-2 Osteosarkom Hücre Hatlarında Geç Apoptozu %7.31 ve %19.06 Oranında Arttırmaktadır

CB65'in  $1.11 \times 10^{-11}$  M dozda 48. saatte MG63 hattında (Şekil 4.12.A ve Şekil 4.13.A) *Annexin-PI* ile işaretli geç apoptotik hücre sayısını düşük oranda ancak kontrole göre anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). CB65  $4.95 \times 10^{-11}$  M dozda 24. saatte Saos-2 hattında (Şekil 4.12.B ve Şekil 4.13.B) benzer şekilde *Annexin-PI* işaretli geç apoptotik hücre sayısını düşük oranda ancak kontrole göre anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). CB65 uygulaması MG63 ve Saos-2 hatlarında uygulamanın yapıldığı zaman aralığında *Annexin* ile işaretli erken apoptotik ve *PI* ile işaretli nekrotik hücre oranlarını etkilememiştir. Örneklem sayısı sınırlı olmakla beraber CB65'in geç apoptotik etki

profiline ait veriler MG63 ve Saos-2 hatlarında kuvvetli, pozitif korelasyon göstermiştir ( $R^2=0.902$ ,  $p<0.01$ ).



**Şekil 4.12.** Bar grafiklerde CB65 (A) MG63 hücre hattında  $1.11 \times 10^{-11}$  M dozda 48. saatte (B) Saos-2 hücre hattında  $4.95 \times 10^{-11}$  M dozda 24. saatte geç apoptozu kontrole göre arttırmaktadır. CB65 uygulandığı saat aralığında hücrelerde erken apoptoza neden olmamakta, nekrotik hücre sayısını değiştirmemektedir ( $n=3$ ). (\*): Kontrole göre  $p<0.05$ .



**Şekil 4.13.** CB65 apoptotik etkisine ait akım sitometrisi ile gerçekleştirilen *Annexin-PI* işaretlemesine ait temsili saçılım grafiğinde (A)  $1.11 \times 10^{-11}$  M dozda uygulama sonrası MG63 hücrelerinde 48. saatte *Annexin* ile işaretli %0.08’inde erken, *Annexin-PI* ile işaretli %7.31’inde geç apoptoz ve *PI* ile işaretli %1.54’ünde nekroz görülmektedir. (B)  $4.95 \times 10^{-11}$  M dozda Saos-2 hücrelerinde 24. saatte *Annexin* ile işaretli %0.07’sinde erken, *Annexin-PI* ile işaretli %19.06’sinde geç apoptoz ve *PI* ile işaretli %0.56’sında nekroz görülmektedir.

#### 4.5. CB2 Agonisti CB65’i ED50’de Salan Kontrollü Lipozomal Salım Sistemi Geliştirildi. Lipozomal Formülasyon *in vitro* Koşullarda % 51,12 EE ile Karakterize Edildi, 24 Saatlik Salım Özelliği Belirlendi

İlaç yüklenmemiş boş lipozom formülasyonunun 0. saatteki partikül büyüklüğü  $137.0 \pm 2.8$  nm, polidispersite indeksi  $0.433 \pm 0.014$  ve zeta potansiyeli  $-20.3 \pm 0.5$  mV olarak saptanmıştır. 0.2 mg CB65 yüklü lipozomun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli sırasıyla  $141.7 \pm 0.6$  nm,  $0.451 \pm 0.026$  ve  $-10.9 \pm 0.3$  mV; 0.4 mg CB65 yüklü lipozomun  $158.9 \pm 1.1$  nm,  $0.473 \pm 0.009$  ve  $-15.3 \pm 0.4$  mV ve 0.8 mg CB65 yüklü lipozomun  $161.4 \pm 3.7$  nm,  $0.460 \pm 0.015$  ve  $-16.0 \pm 0.3$  mV olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.1). İlaç yüklenmemiş boş lipozom formülasyonuna ait partikül büyüklüğü,

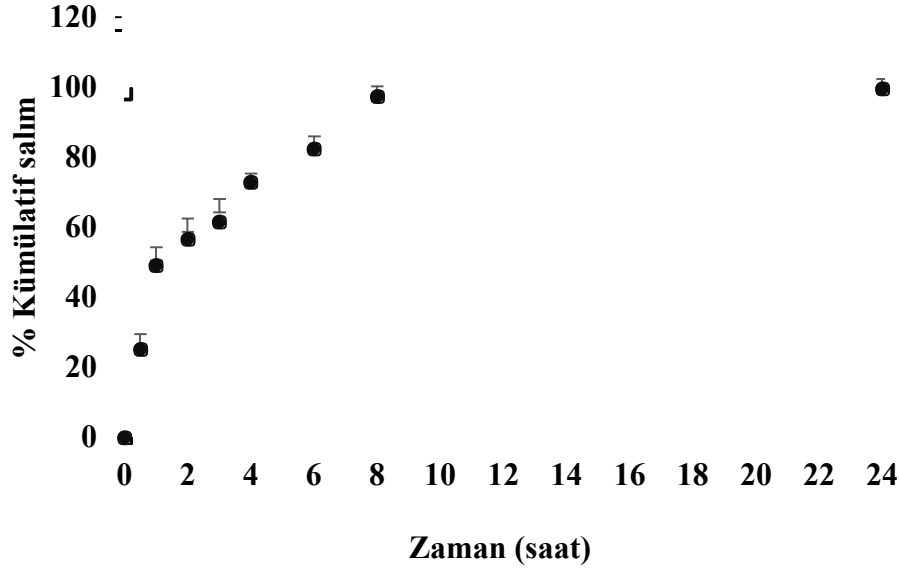
polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri 7. gün, 1 ve 3 ayda değişiklik göstermemiştir. 0.2 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonuna ait partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri 1. ayda 0. saat ve 7. güne göre artış göstermiştir. 0.4 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonu 7. gün, 1 ve 3. ayda benzer partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri göstermiştir. 0.8 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonunun 1 ve 3. aya ait partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri 0. saat ve 7. güne göre artış göstermiştir. 0.8 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonunun 3. aydaki zeta potansiyeli 0. saat, 7. gün ve 1. aydaki zeta potansiyeline göre azalma göstermiştir. Üç aylık stabilite ölçümleri sonucunda zeta potansiyelleri göz önüne alındığında en stabil olduğu belirlenen 0.2 ve 0.4 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %51.12 ve %41.96 olarak belirlenmiştir.

Diyaliz membran yöntemi ile yapılan *in vitro* salım çalışması sonucunda kümülatif olarak değerlendirilen CB65, lipozom formülasyonları ile kontrollü bir salım profili gözlenmiştir. Buna göre CB65, 30. dakikada %25.3±4.2, 60. dakikada %49.1±5.2, 120. dakikada %56.7±5.8, 180. dakikada %61.6±6.4, 240. dakikada %72.9±2.5, 360. dakikada %82.5±3.5, 480. dakikada %97.5±2.8 ve 1440. dakikada %99.5±2.8 oranında kümülatif salım göstermiştir (şekil 4.14). Birinci saatin sonunda CB65'in ani salım etkisi gözlenmiştir (%49.1 ± 5.2).

**Çizelge 4.1.** Hazırlanan boş ve yüklü lipozomların 0, 7, gün, 1. ve 3. ayda ölçülen partikül büyüklüğü (PB), polidispersite indeksi (PDI) dağılımı, zeta potansiyel analizi ölçümlerine ait tanımsal istatistikler ortalama±standart sapma şeklinde verilmiştir.

| <b>Formülasyon<br/>(Lipit:EtOH – 9:1)</b>                             | <b>Zaman</b> | <b>PB (nm)</b> | <b>PDI</b>  | <b>ZP (mV)</b> | <b>EE(%)</b> |
|-----------------------------------------------------------------------|--------------|----------------|-------------|----------------|--------------|
| <b><math>\alpha</math>-Fosfatidilkolin:EtOH<br/>Boş Lipozom</b>       | 0. Gün       | 137.0±2.8      | 0.433±0.014 | -20.3±0.5      | —            |
|                                                                       | 7. Gün       | 140.6±3.1      | 0.442±0.010 | -18.5±0.5      |              |
|                                                                       | 1. Ay        | 146.5±3.7      | 0.469±0.018 | -18.1±0.5      |              |
|                                                                       | 3. Ay        | 144.1±5.3      | 0.447±0.002 | -16.2±0.3      |              |
| <b><math>\alpha</math>-Fosfatidilkolin:EtOH<br/>0.2 mg/10 ml CB65</b> | 0. Gün       | 141.7±0.6      | 0.451±0.026 | -10.9±0.3      | 51.12        |
|                                                                       | 7. Gün       | 140.2±2.4      | 0.456±0.009 | -10.4±0.04     |              |
|                                                                       | 1. Ay        | 148.6±5.6      | 0.761±0.034 | -13.3±0.4      |              |
|                                                                       | 3. Ay        | 146.2±3.3      | 0.618±0.020 | -13.5±0.1      |              |
| <b><math>\alpha</math>-Fosfatidilkolin:EtOH<br/>0.4 mg/10 ml CB65</b> | 0. Gün       | 158.9±1.1      | 0.473±0.009 | -15.3±0.4      | 41.96        |
|                                                                       | 7. Gün       | 142.1±2.5      | 0.440±0.022 | -13.8±0.7      |              |
|                                                                       | 1. Ay        | 143.0±1.4      | 0.462±0.005 | -17.8±0.4      |              |
|                                                                       | 3. Ay        | 148.2±3.3      | 0.459±0.014 | -14.5±0.5      |              |
| <b><math>\alpha</math>-Fosfatidilkolin:EtOH<br/>0.8 mg/10 ml CB65</b> | 0. Gün       | 161.41±3.7     | 0.460±0.015 | -16.0±0.3      | —            |
|                                                                       | 7. Gün       | 178.5±0.8      | 0.527±0.011 | -10.1±0.7      |              |
|                                                                       | 1. Ay        | 195.3±9.0      | 0.624±0.141 | -12.2±0.2      |              |
|                                                                       | 3. Ay        | 247.8±16.5     | 0.747±0.013 | -2.9±0.3       |              |

**Dipnot:** EtOH: Etanol; %EE: % Enkapsülasyon etkinliği; PB: partikül büyüklüğü; PDI: polidispersite indeksi; ZP: zeta potansiyeli



**Şekil 4.14.** Zamana bağlı %CB65 kümülatif salım grafiğinde CB65 yüklü lipozom formülasyonu 1. saatte ortalama  $49.1 \pm 5.2$ 'ini ortama salmıştır. 2. saatten ( $56.7 \pm 5.8$ ) 24. saate ( $99.5 \pm 2.8$ ) kadar kontrollü salım gözlenmiştir (n=3).

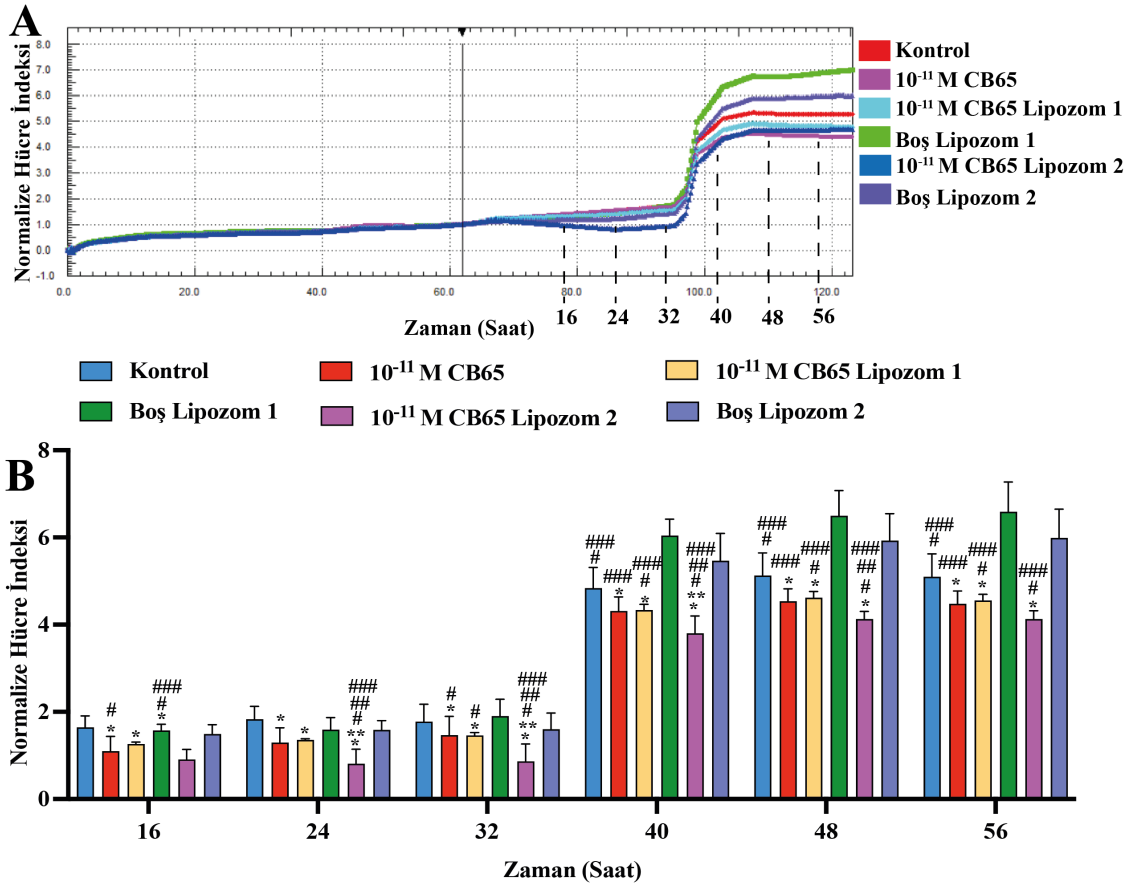
#### 4.6. CB65 Yüklü Lipozom Salım Sistemi *in vitro* Koşullarda MG63 Osteosarkom Hattında Proliferasyonu Gerçek Zamanlı Olarak Azaltmıştır

##### 4.6.1. CB65 Yüklü Lipozom Salım Sistemi *in vitro* Koşullarda MG63 ve Saos-2 Osteosarkom Hatlarında Proliferasyonunu 16. Saatten İtibaren Gerçek Zamanlı Olarak Azaltmıştır

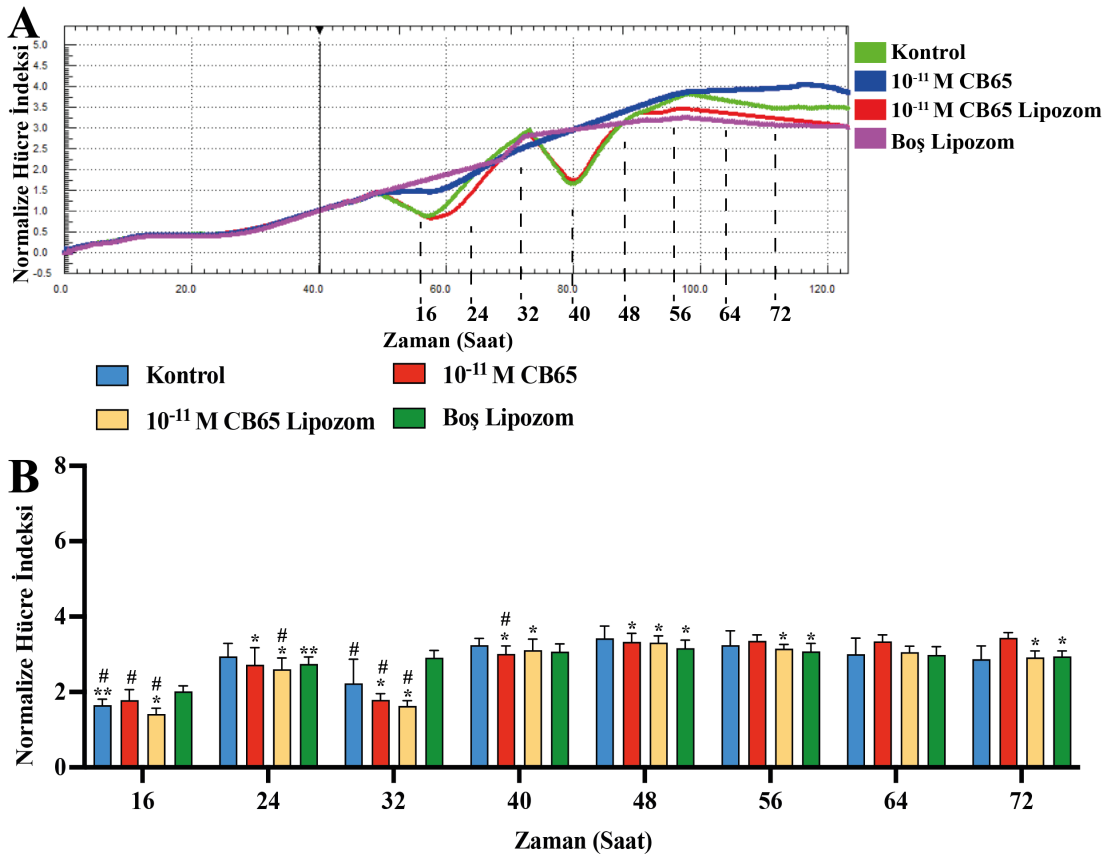
En yüksek enkapsülasyon etkinliği gösteren 0.2 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonu esas alınarak  $10^{-11}$  M dozda salımı sağlanan CB65, MG63 hücrelerinin proliferasyonunda 16. saatten 56. saate kadar kontrole göre anlamlı azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.15.A ve Şekil 4.15.B). Lipozomal formülasyondan  $10^{-11}$  M dozda salımı sağlanan CB65, 24 saat süreyle uygulandığında MG63 hücrelerinin proliferasyonunda 16. saatten 56. saate kadar kontrole göre anlamlı azalmaya neden olmuştur. Yirmi dört saat süreyle uygulanan CB65 lipozomal formülasyon MG63 hücrelerinde tek sefer uygulanan CB65 lipozomal formülasyona göre anlamlı yüksek antiproliferatif etki göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Yirmi dört saat süreyle uygulanan CB65 lipozomal formülasyon, MG63 hücrelerinde 16. saatten 56. saate kadar tek başına uygulanan  $10^{-11}$  M dozda CB65'e göre hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azaltmıştır ( $p < 0.05$ ). İlaç yüklenmemiş boş lipozomal formülasyonlar tek sefer ve 24 saat süreyle uygulandığında MG63 hücre indeksi, 24 saat süreyle uygulanan CB65 lipozomal formülasyona göre 56. saate kadar anlamlı yüksek saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Tek seferde ve 24 saat süreyle uygulanan ilaç yüklenmemiş boş lipozomal formülasyonlar

MG63 hücre indeksini 40. saatten 56. saate kadar kontrol grubuna göre anlamlı arttırmıştır ( $p<0.05$ ). CB65 tek başına uygulandığında MG63 hücrelerinde 16. saatten 56. saate kadar kontrole göre anlamlı antiproliferatif etki göstermiştir ( $p<0.05$ ). Tek başına uygulanan CB65'in MG63 hücrelerindeki antiproliferatif etkisi 16. saatten 56. saate kadar tek seferde uygulanan CB65 yüklü lipozomal formülasyona göre farklı bulunmamıştır. Tüm deney ve kontrol gruplarında hücre proliferasyonu 32. saatten 56. saate kadar anlamlı artış göstermiştir ( $p<0.05$ ).

Saos-2 hücre hattında CB65'in  $10^{-11}$  M dozda salımı sağlandığında ilaç hücrelerin proliferasyonunda 16. saatten 72. saate kadar kontrole göre anlamlı azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.16.A ve Şekil 4.16.B). Tek başına  $10^{-11}$  M dozda uygulanan CB65 hücrelerin proliferasyonunda 24. saatten 48. saate kadar kontrole göre anlamlı azalmaya neden olmuştur ( $p<0.05$ ). CB65 yüklü ilaç formülasyonu, tek başına CB65 uygulanan gruptan farklı olarak kontrole göre daha uzun süreyle antiproliferatif etki göstermiştir. Tek başına uygulanan CB65'in Saos-2 hücrelerindeki antiproliferatif etkisi 24. saatten 48. saate kadar CB65 yüklü lipozomal formülasyona göre farklı bulunmamıştır. İlaç yüklenmemiş boş lipozom formülasyonu 16. saatten itibaren 40. saate kadar kontrole göre proliferasyonu azaltıcı etki göstermemiştir. İlaç yüklenmemiş boş lipozom formülasyonu 48. saatten itibaren 72. saate kadar kontrole göre proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir ( $p<0.05$ ). İlaç yüklenmemiş boş lipozom formülasyonu uygulanan Saos-2 hücre proliferasyonu 16. saatten 32. saate kadar CB65 ve CB65 yüklü lipozom formülasyonu ile karşılaştırıldığında yüksek saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Tüm deney ve kontrol gruplarında hücre proliferasyonu 24. saatten 32. saate kadar hücre proliferasyonunda azalma saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Tüm deney ve kontrol gruplarında hücre proliferasyonu 40. saatten 72. saate kadar anlamlı artış göstermiştir ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.15.** CB65'in MG63 osteosarkom hücre hattındaki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır (n=8). **(A)** Zamana bağlı normalize hücre indeks grafiğinde antiproliferatif etki penceresi 16-56. saatlerde gözlenmektedir. **(B)** Zamana karşı normalize hücre indeksini her doz için gösteren bar grafiğinde, 24 saat süreyle uygulanan 10<sup>-11</sup> M dozda CB65 yüklü lipozom 16-56. saatlerde hücre çoğalmasını kontrole göre azaltmıştır. (\*): kontrol, (\*\*) 10<sup>-11</sup> M CB65, (##) 10<sup>-11</sup> M CB65 lipozom 1 (tek sefer uygulama), (#) boş lipozom, (\*\*\*) 10<sup>-11</sup> M CB65 lipozom 2 (24 saat süreyle 2 kez uygulama), (###) 10<sup>-11</sup> M boş lipozom 24 saate göre p<0.05.



**Şekil 4.16.** CB65'in Saos-2 osteosarkom hücre hattındaki antiproliferatif etkisi gerçek zamanlı ve impedans temelli olarak saptanmıştır (n=8). **(A)** Zamana bağlı normalize hücre indeks grafiğinde antiproliferatif etki penceresi 16-72. saatlerde gözlenmektedir. **(B)** Zamana karşı normalize hücre indeksini her doz için gösteren bar grafiğinde, CB65 yüklü lipozom uygulandığında 10<sup>-11</sup> M dozda 16-72. saatlerde hücre çoğalmasını kontrole göre azaltmıştır. (\*): kontrol, (\*\*) 10<sup>-11</sup> M CB65, (#) boş lipozom ve (##) 10<sup>-11</sup> M CB65 yüklü lipozoma göre p<0.05.

## 5. TARTIŞMA

Tez çalışmasından elde edilen bulgular sırasıyla 27 ve 20. pasajlarına getirilen osteosarkom MG63 hücre hattında akım sitometrisi yöntemi hücre içi ortalama CB1 ve CB2 reseptör işaretlenme oranları %45.30 ve %65.31, zardakilerde %43.33 ve %42.90; Saos-2 hücrelerinde hücre içi CB1 ve CB2 %47.82 ve %50.80, zardakilerde %21.63 ve %27.85 saptandı, ortak yüksek CB2 reseptörü varlığı nedeniyle sentetik CB2 agonisti CB65'in hedefi olabileceğini gösterdi. MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücre hatlarında CB65'in antiproliferatif doz aralığı WST ile  $10^{-12}$ – $10^{-8}$  M ve gerçek zamanlı yarı maksimum terapötik etki penceresi MG63 için  $ED_{50}=1.1 \times 10^{-11}$  M  $ED_{50}$ 'nin etkili saati 46, Saos-2 için  $ED_{50}=4.95 \times 10^{-11}$  M  $ED_{50}$ 'nin etkili saati 20 olarak belirlendi. Biyomühendislik temelli yeni lipozomal ilaç formülasyonu  $ED_{50}$ 'de başarıyla lipozomal taşıma sistemlerine aktarıldığında %51.12 yükleme etkinliği ve MG63 ve Saos-2 hücre hattında 8-24. saatler arasında  $1.1 \times 10^{-11}$  M dozda kontrollü salımı sağlandı. CB65 yüklü lipozom MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücrelerinde 16. saatten itibaren kontrole göre antiproliferatif etki göstermiştir. CB65 yüklü lipozom formülasyonu MG63 ve Saos-2 hücrelerinde tek başına CB65 uygulamasına göre sırasıyla 16 ve 24. saatten itibaren CB65 antiproliferatif etki göstererek CB65'in etki süresini kısaltmış ve daha uzun sürede etki antiproliferatif etki göstermiştir. Geliştirilen CB65 yüklü lipozom sistemi başarılı bir formülasyon olarak değerlendirilmiştir.

### **MG63 ve Saos-2 Hücre Hatları qRT-PCR ve Akım Sitometrisi Yöntemi ile Yüksek Düzeyde CB2, Düşük Düzeyde CB1 Reseptörü Bulundurmaktadır**

Bu tez çalışmasında MG63 hücrelerindeki hücre içi ortalama CB1 ve CB2 reseptör işaretlenme oranları sırasıyla  $45.30 \pm 7.42$  ve  $65.31 \pm 12.85$  olarak saptanmış ve pozitif kontrol A549 hattına ait hücre içi CB1 ve CB2 reseptörleri ile karşılaştırıldığında düşük saptanmıştır. MG63 hücrelerinde zardaki CB1 ve CB2 reseptör işaretlenme oranları sırasıyla  $43.33 \pm 29.23$  ve  $42.90 \pm 24.22$  olarak ölçülmüştür. Hücre zarındaki CB1 ve CB2 reseptör immün işaretlenmesi pozitif kontrol A549 hücreleri ile karşılaştırıldığında düşük saptanmıştır. Çalışma kapsamında hücre içi CB reseptör işaretleme protokolünde uygulanan permeabilizasyon aşaması hücrelerin sayısında hücre zarındaki uygulamaya göre azalmaya neden olmuştur. Bu nedenle tez kapsamında elde edilen CB1 ve CB2 reseptör işaretlenme oranları beraber verilmiş ancak hücre içi ve hücre membranı

açısından karşılaştırma yapılması doğru bulunmamıştır. Literatürdeki çalışmalar hücre içi CB reseptörü değerlendirilmesi için uygulanan permeabilizasyon protokolünün hücre sayısında hücre zarındaki uygulamaya göre belirgin azalma saptandığını ifade etmiştir [206, 207]. Endokannabinoidler lipofilik moleküller olduğundan hem hücre içi hem de hücre zarında sinyal iletimi ve biyolojik yanıt oluşturmada aktif rol oynar [206, 208, 209]. Endokannabinoidlerin fizyolojik koşullarda CB1 ve CB2 reseptörlerini içeren G protein yapılı reseptörlere uzun süreli veya yüksek oranda bağlanması reseptörlerde duyarsızlığa veya internalizasyona neden olmaktadır [206, 207, 210-212]. Kannabinoid 1 ve 2 reseptörlerinin hücreye endositozu ile hücre zarındaki reseptör oranı azalmaktadır [213, 214]. Dolayısıyla güncel çalışmalarda akım sitometrisi yöntemi ile CB reseptörlerinin hücre içi ve hücre zarındaki oranları değerlendirildiğinde hücre içindeki işaretlenme oranları esas alınmaktadır [206, 207, 215]. Bu bağlamda MG63 hücrelerinin toplam CB2 reseptör seviyesi  $65.31 \pm 12.85$  olarak ele alınmıştır. Bu iş paketinde MG63 hattına ait toplam CB2 immün işaretlenme oranı izotip kontrol ile karşılaştırıldığında 2 kat, Saos-2 hattı ile karşılaştırıldığında 1.3 kat yüksek saptanmıştır. Bununla birlikte MG63 hücrelerinin CB2 immün işaretlenme oranı pozitif kontrol A549 hücrelerine göre 1.5 kat düşük olarak saptanmıştır. MG63 hücrelerindeki CB2 reseptör immün fluoresan işaretleme yöntemi ile kalitatif olarak çekirdek çevresinde yoğunluk göstermekle birlikte sitoplazmada yaygın ve Western Blot tekniği ile incelendiğinde  $\beta$ -aktin kontrol genine göre 0.2 kat yüksek olarak saptanmıştır [117]. Tez çalışması kapsamında MG63 hücrelerinde sitoplazmadaki CB2 reseptörü varlığı immünositokimya tekniği uygulanan önceki çalışma ile uyumludur. Diğer yandan önceki çalışmada kantitatif Western Blot tekniği ile gerçekleştirildiğinde tez kapsamında akım sitometrisi yöntemi ile elde edilen işaretli hücre yüzdeleri birebir karşılaştırılabilir nitelik taşımamaktadır. MG63 hücre hattı qRT-PCR ile  $\beta$ -aktin kontrol genine göre yaklaşık 13 kat yüksek CB2 ve yaklaşık 10 kat yüksek TRPV1 reseptör ekspresyonu göstermiştir [1]. Tez çalışması kapsamında izotipik ve pozitif kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak saptanan CB2 reseptör ürün miktarı/işaretlenme oranı literatürde bildirilen CB2 reseptör ekspresyon seviyesine mRNA miktarlarına göre düşük bulunmuştur. MG63 hücre hattında qRT-PCR ile CB1 ve CB2 reseptör ekspresyon seviyelerine ilişkin  $\beta$ -aktinle karşılaştırmalı  $\Delta C_t$  değerleri yaklaşık 15 olarak saptanmış ve metastatik 143B osteosarkom hücre hattına göre 8 kat daha düşük, HOS osteosarkom hattına göre 2 kat yüksek CB2 reseptör ekspresyonu göstermiştir [118]. Kannabinoid reseptörlerinin ekspresyonu ve işaretlenme düzeyleri, kanserin derecesi ve hücre hatlarının iki katına çıkma süresi ile ilişkilendirilmektedir

[216, 217]. Literatüre ait bulgularla birlikte değerlendirildiğinde tez kapsamında MG63 hücrelerinin CB2 işaretlenme düzeyi ile A549 küçük hücreli dışı akciğer kanserine ait CB2 düzeyi arasındaki fark, iki katına çıkma süresi oldukça kısa olan metastatik 143B osteosarkom hattı ile arasındaki farkla uyumlu olarak değerlendirilebilir. Yağ yapılı ve kısa yarı ömürlü kannabinoid reseptörlerinin saptanması için altın standart olarak bilinen qRT-PCR yöntemi ile CB2 reseptörüne ait rölatif mRNA kat artışının saptanması güvenilir sonuçlar verebileceğinden ileri çalışmalarla CB2 reseptör ekspresyonunun qRT-PCR ile validasyonu hedeflenmiştir.

Saos-2 osteosarkom hücrelerinde, pozitif kontrol A549 hücrelerine göre qRT-PCR yöntemiyle yüksek oranda CB2 reseptör ekspresyonu saptanmıştır. Saos-2 hücreleri, A549 hücrelerine göre düşük oranda CB1 reseptör ekspresyonu, yüksek oranda GPR55 ve TRPV1 reseptör ekspresyonu göstermiştir. qRT-PCR ile Saos-2 hücre hattında CB2 reseptör ekspresyonu değerlendirilmiş ve  $\beta$ -aktin kontrol genine göre yaklaşık 11 kat yüksek CB2 ve 10 kat yüksek TRPV1 reseptör ekspresyonu gösterdiği saptanmıştır [1]. Literatüre ait çalışmada CB2 reseptör ekspresyonu sadece  $\beta$ -aktin kontrol genine ait ekspresyon düzeyi ile karşılaştırılmış olup pozitif kontrol hücre hattı ile karşılaştırılmamıştır. Tez çalışması kapsamında pozitif kontrol A549 [186] hücrelerine göre 10 kat yüksek CB2 ekspresyonu gösteren Saos-2 hücreleri GAPDH kontrol genine göre 3 kat yüksek saptanmıştır. GAPDH kontrol genine göre karşılaştırılan CB2 reseptör ekspresyon düzeyi literatürde  $\beta$ -aktin kontrol genine göre karşılaştırılan CB2 ekspresyon seviyesine göre düşük bulunmuştur. GAPDH ve  $\beta$ -aktin genleri qRT-PCR çalışmalarında yaygın olarak kullanılan kontrol genleri [218] olmakla beraber MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücrelerinde *house-keeping* genlerinin tanımlanması ve validasyonuna ilişkin yapılan transkriptom analizinde GAPDH geninin  $\beta$ -aktin genine göre daha stabil olduğu saptandığından [219] tez çalışması kapsamında GAPDH kontrol geni kullanılması uygun bulunmuştur. Tez kapsamında Saos-2 hücrelerinde hücre içi CB1 ve CB2 reseptör işaretlenme oranları sırasıyla  $47.82 \pm 6.05$  ve  $50.80 \pm 16.33$  saptanmıştır. Saos-2 hücrelerinde zardaki CB1 ve CB2 reseptörleride  $21.63 \pm 11.59$  ve  $27.85 \pm 5.82$  olarak ölçülmüştür. CB2 reseptör oranı pozitif kontrolü oluşturan A549 hücreleri ile karşılaştırıldığında düşük saptanmıştır. Sonuçta hücre içi CB2 reseptör işaretlenme oranı esas alınarak değerlendirme yapılmıştır. Saos-2 hattına ait toplam CB2 immün işaretlenme oranı izotip kontrol ile karşılaştırıldığında 1.03 kat yüksek saptanmıştır. Bununla birlikte Saos-2 hücrelerinin CB2 immün işaretlenme oranı pozitif kontrol A549

hücrelerine göre 1.8 kat düşük saptanmıştır. Pozitif kontrol hattının deney düzeneklerine eklenmesi duyarlılık ve özgüllük için gereklidir [206]. Saos-2 hücrelerine ait CB2 reseptör ekspresyon seviyesi ile CB2 immün işaretleme oranı, A549 hücrelerine ait bulgularla kıyaslandığında uyum göstermemiştir. Kannabinoid molekülleri hücre içinde düzenli olarak sentezlenip yıkıldığından Saos-2 hücrelerinde CB2 reseptör işaretleme düzeyi akım sitometrisi yöntemi ile yüksek verimle saptanamamış olabilir. Bu nedenle gen düzeyinde hassas, güvenilir, geçerli ve tekrarlanabilir sonuçlar veren qRT-PCR yöntemi CB reseptör seviyelerinin değerlendirilmesi için altın standart olarak tercih edilmektedir.

**MG63 ve Saos-2 Hücrelerinde CB65'in Etkili Doz Aralığı 24 ve 48 Saat Zaman Aralığında  $10^{-12}$ – $10^{-8}$  M Olarak Saptanmıştır. Gerçek Zamanlı Spesifik Yarı Maksimum Antiproliferatif Etki Penceresi ise MG63 Hattı için 48. Saatte  $1.11 \times 10^{-11}$  M ve Saos-2 Hattı için 24. Saatte  $4.95 \times 10^{-11}$  M Olarak Saptanmıştır. Spesifik Etki CB2 Reseptör Antagonisti ile Bloke Olmuştur. ED50 MG63 ve Saos-2 Hücrelerinde Sırasıyla %7.31'inde ve %19.06'sinde Geç Apoptozu İndüklemiştir**

Sentetik spesifik CB2 reseptör agonisti CB65, hücre içi ve hücre zarındaki CB1 ile karşılaştırıldığında yüksek seviyede CB2 reseptörü bulunduran MG63 hücre hattında, *in vitro* koşullarda, WST-1 yöntemi ile  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M doz aralığında ve zaman bağımlı olarak hücre çoğalmasını kontrole göre azaltmıştır. CB65, antiproliferatif etkisini MG63 hücre hattında 48. Saatte göstermiştir. CB65'in gerçek zamanlı yarı maksimum etkili doz penceresi MG63 hücrelerinde 48. Saatte  $1.11 \times 10^{-11}$  M olarak ortaya konmuştur. CB65'in reseptör aracılı spesifik etkisi CB2 reseptör antagonisti AM630 ile gerçek zamanlı olarak ortadan kalkmıştır. Bu sonuç ilacın spesifik agonistik etkisini doğrulamıştır. CB1 ve CB2 pan agonisti WIN  $2.0 \times 10^{-5}$  M dozda MG63 hücre hattına uygulandığında WST-8 yöntemi ile 24. saatte proliferasyonu istatistiksel anlamlı olarak kontrole göre %30 azaltmış [108], aynı dozda WIN MTT (3-[4,5-dimethylthiazolyl- 2] 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) yöntemiyle MG63 hücrelerinde 8. saatten itibaren hücre proliferasyonunu kontrol, Anandamid (AEA) ( $5.0 \times 10^{-6}$ ,  $1.0 \times 10^{-5}$  ve  $2.0 \times 10^{-5}$  M) ve stabil analogu MET-Anandamid ( $5.0 \times 10^{-6}$ ,  $1.0 \times 10^{-5}$  ve  $2.0 \times 10^{-5}$  M) uygulanan gruplara göre anlamlı olarak azaltmıştır [109]. Tez çalışmasında CB65 uygulaması WIN uygulamasına göre MG63 hücre hattında daha düşük dozda, daha yüksek oranda antiproliferatif etki sağlamıştır. Etanolamid türevi dokosaheksaenoil etanolamid (DHEA) epoksitlerinin regioizomerleri (pozitif izomer)  $1.25 \times 10^{-5}$  ve  $2.5 \times 10^{-5}$  M dozlarda MG63 hücre hattında *cell titer blue* testi ile 24 saatte proliferasyonu azalmıştır [118]. Tez çalışması bulgularına göre DHEA epoksit

regioizomerlerine göre CB65 MG63 hücrelerinde daha düşük dozda ve daha uzun sürede etki göstermiştir. AEA  $5.0 \times 10^{-5}$  M dozda 24 saatte WST-1 yöntemi ile MG63 hücrelerinin proliferasyonu kontrole göre %50 oranında anlamlı olarak azaltmıştır [114]. CB65 MG63 hücrelerinde AEA'ye göre daha düşük dozda daha güçlü antiproliferatif etki göstermiştir. Bu bağlamda CB65'in MG63 hücre hattındaki CB2 agonistik antiproliferatif etki gücü WIN, AEA, MET-Anandamid ve DHEA epoksit agonistlerine göre daha yüksek ve kanserdeki terapötik potansiyeli daha üstün olarak değerlendirilmiştir.

Sentetik spesifik CB2 reseptör agonisti CB65, hücre içi ve hücre zarındaki CB1 ile karşılaştırıldığında yüksek seviyede CB2 reseptörü bulunduran Saos-2 hücre hattında, *in vitro* koşullarda, WST-1 yöntemi ile  $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M doz aralığında ve zaman bağımlı olarak hücre çoğalmasını kontrole göre azaltmıştır. CB65, antiproliferatif etkisini Saos-2 hücrelerinde 24. saatte göstermiştir. CB65'in gerçek zamanlı yarı maksimum etkili doz penceresi Saos-2 için 24. saatte  $4.95 \times 10^{-11}$  M olarak ortaya konmuştur. CB65'in reseptör aracılı spesifik etkisi CB2 reseptör antagonisti AM630 ile gerçek zamanlı olarak ortadan kalkmıştır. Bu sonuç ilacın spesifik agonistik etkisini doğrulamıştır. MAGL inhibitörü JZL-184  $1.0 \times 10^{-6}$  M –  $1.0 \times 10^{-4}$  M doz aralığında Saos-2 hücrelerinde *Alamar Blue* yöntemiyle 72 saatte doz bağımlı olarak kontrole göre hücre proliferasyonunu azaltmıştır [115]. Tez kapsamında sentetik spesifik CB2 agonisti CB65'in Saos-2 hücrelerindeki antiproliferatif etkisi endojen kannabinoid 2-AG'nin yıkım enzimi olan MAGL inhibitörü JZL-184'ye göre daha güçlü olarak saptanmış ve bu etki düşük dozda gerçekleşmiştir. Kannabinoid pan agonisti WIN  $2.0 \times 10^{-5}$  M dozda MTT testi ile 48. saatte kadar Saos-2 hücrelerinin proliferasyonunu %40 oranında,  $1.0 \times 10^{-5}$  M,  $2.0 \times 10^{-5}$  M ve  $3.0 \times 10^{-5}$  M dozlarda 24. saatte %50 oranında doz ve zaman bağımlı olarak azaltmıştır [112]. Tez çalışması kapsamında uygulanan sentetik spesifik CB2 reseptör agonisti CB65 Saos-2 hücre hatlarında WIN'a göre daha düşük dozda etki göstermekle beraber, etki güçleri karşılaştırıldığında pan agonistin daha potent antiproliferatif etki gösterdiği ve etkisinin CB65'e göre daha erken başladığı saptanmıştır. Tez çalışması kapsamında Saos-2 hücrelerinin hücre içinde CB1 ve CB2 reseptör işaretlenmeleri  $47.82 \pm 6.05$  ve  $50.80 \pm 16.33$ , hücre zarında  $21.63 \pm 11.59$  ve  $27.85 \pm 5.82$  oranında bulundurdıkları saptanmıştır. Buradan hareketle CB reseptör pan agonistin etkilerinin CB2 agonistine göre daha güçlü olması olağan olarak değerlendirilmiştir.

CB65 apoptotik etkisine ait akım sitometrisi ile gerçekleştirilen *Annexin/PI* işaretlemesinde MG63 hücrelerinde  $1.11 \times 10^{-11}$  M dozda CB65 uygulandığında 48. saatte *Annexin* ile işaretli %0.08'inde erken, *Annexin-PI* ile işaretli %7.31'inde geç apoptoz ve *PI* ile işaretli %1.54'ünde nekroz ile ölüme gittiği saptanmıştır. MG63 hattında CB65  $1.11 \times 10^{-11}$  M dozda ve 48. saatte *Annexin-PI* ile işaretli geç apoptotik hücre sayısını düşük oranda ancak kontrole göre anlamlı arttırmıştır. TRPV1 agonisti RTX  $5.0 \times 10^{-6}$  M dozda tek başına uygulandığında 24 saatte MG63 hücre hattında *Annexin* işaretli erken apoptotik ve *Annexin V-PI* işaretli geç apoptotik toplam hücre oranı %21.7 olarak saptanmış, ilaç p-Akt inhibisyonu aracılı olarak apoptozu indüklemiştir [1]. Tez çalışmasında CB65, MG63 hücrelerine literatürde belirtilen çalışmadan daha düşük dozda uygulanmış, daha uzun sürede ve daha düşük *Annexin* işaretli erken apoptotik ve *Annexin V-PI* işaretli geç apoptotik toplam hücre oranı sağlamıştır. MG63 hücre hattında DHEA epoksitlerinin regioizomerlerinin *Annexin* ve *Annexin V-PI* işaretleme yöntemi ile  $1.25 \times 10^{-5}$  M dozda %4.17 oranda apoptozu indüklediği saptanmıştır [118]. Bu çalışmaya göre tez çalışması değerlendirildiğinde daha düşük dozda CB65, MG63 hücreleri üzerinde daha yüksek oranda apoptozu artırıcı etki göstermiştir.  $5.0 \times 10^{-5}$ ,  $1.0 \times 10^{-4}$  ve  $2.0 \times 10^{-4}$  M dozlarda 24 saat AEA uygulanan MG63 hücrelerinde *Annexin V/PI* yöntemi ile JNK, ERK, p38, MAPK ve kaspaz 3 aktivasyonu aracılı apoptozu dozlara göre sırasıyla %50, %75 ve %80 oranında kontrole göre arttırdığı saptanmıştır [114]. Tez çalışması kapsamında CB65 daha düşük dozda MG63 hücrelerinde literatürde belirtilen dozdan daha düşük ve daha uzun süre uygulanmış ve apoptozu daha az indüklemiştir. Buna karşın, apoptotik yolağa ait JNK, ERK, p38, MAPK ve kaspaz 3 belirteçleri incelenmemiştir. CB1 ve CB2 pan agonisti WIN  $5.0 \times 10^{-6}$  M dozda tek başına veya 5 ng/ml TRAIL PAR-4 proteini ile 36 saat süreyle uygulandığında MG63 hücrelerinde kaspaz 8 aracılı apoptozu uyarmış [109], zaman bağımlı olarak endoplazmik retikulumu stresi (ERS) aracılı sistein bakımından zengin proteinin (SPARC) seviyesini arttırarak *cleaved* kaspaz 8, pro-kaspaz 3 ve PARP aktivasyonu ile apoptozu indüklemiştir [110]. Bu tez çalışması kapsamında apoptotik yolağa ait *cleaved* kaspaz 8, pro-kaspaz 3 ve PARP belirteçleri incelenmemiştir. Ubikitin bağımlı proteazom sisteminin seçici geri dönüşümlü inhibitörü olan Bortezomib (BTZ)  $1.0 \times 10^{-8}$  M dozda,  $1.0 \times 10^{-7}$  M CB2 agonisti JWH-133 ile birlikte uygulandığında 24. saatte HOS osteosarkom hücre hattında *Annexin* işaretli erken ve *Annexin V-PI* işaretli geç apoptotik toplam hücre oranı %32.05 olarak ölçülmüş, aynı dozda BTZ  $5.0 \times 10^{-6}$  M RTX ile kullanıldığında *Annexin V-PI* işaretli geç apoptotik ve *Annexin* işaretli erken apoptotik toplam hücre oranı %36.06 olarak saptanmıştır. Uygulanan tüm kombine

tedaviler HOS hücre hattında kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 indüksiyonu ile apoptozu arttırmıştır [13]. Bu tez çalışması kapsamında apoptotik yolağa ait kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 belirteçleri incelenmemiştir.

Tez çalışması kapsamında  $1.11 \times 10^{-11}$  M dozda 48 saat uygulanan CB2 reseptör agonisti CB65 *Annexin* işaretli erken ve *Annexin V-PI* işaretli geç apoptotik etkinliği bildirilen ajanlara göre daha MG63 hücrelerine göre düşük oranda apoptozu indüklemiştir. CB65'in MG63 hücrelerinde erken apoptoza etkisinin izlenmesi gerektiğinden 24 saatlik CB65 uygulamasında apoptozun değerlendirilmesi planlanmıştır. İleri çalışmalarda ilacın diğer reseptör antagonistleri ve hedefli kemoterapi ajanları ile beraber uygulanması gerekmektedir.

Saos-2 hücrelerinde  $4.95 \times 10^{-11}$  M dozda CB65 uygulandığında 24. saatte *Annexin* ile işaretli %0.07'sinde erken, *Annexin-PI* ile işaretli %19.06'sinde geç apoptoz ve *PI* ile işaretli %0.56'sında nekroz saptanmıştır. Saos-2 hattında CB65  $4.95 \times 10^{-11}$  M dozda ve 24. saatte *Annexin-PI* ile işaretli geç apoptotik hücre sayısını düşük oranda ancak kontrole göre anlamlı arttırmıştır. CB2 agonisti JWH-133  $1.0 \times 10^{-7}$  M ve TRPV1 agonisti RTX  $5.0 \times 10^{-6}$  M dozlarda Saos-2 hücre hattına 24 saat tek başına uygulandığında *Annexin* ve *Annexin V-PI* işaretlenen toplam hücre oranı sırasıyla %36.5 ve %29.3 olarak saptanmış ancak kontrole göre istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır [1]. Tez çalışması bulgularına göre CB65, Saos-2 hücre hattında literatürde verilen saat ile aynı şekilde ve daha düşük dozda uygulanmış, apoptozu indükleyici etkisi gösterilmiştir.  $3.0 \times 10^{-5}$  M dozda WIN, 24 saatte Saos-2 hücrelerinde sitoplazmada sitokrom c, *cleaved* kaspaz 3 ve *cleaved* PARP aktivasyonu ile apoptozu kontrol ve diğer ilaç gruplarına göre anlamlı olarak indüklemiştir [112]. Tezin çıktılarına göre CB65 daha düşük dozda literatürdeki çalışma ile aynı saatte Saos-2 hücrelerine uygulanmış, apoptozu azaltıcı etki göstermiştir. WIN  $5.0 \times 10^{-6}$  M dozda tek başına veya 5 ng/ml TRAIL PAR-4 proteini ile 36 saat uygulandığında Saos-2 hücrelerinin apoptozunu uyarmış [109], zaman bağımlı olarak endoplazmik retikulumu stresi (ERS) aracılı sistein bakımından zengin proteinin (SPARC) seviyesini arttırarak *cleaved* kaspaz 8, pro-kaspaz 3 ve PARP aktivasyonu ile apoptozu indüklemiştir [110]. Tez çalışmasına göre Saos-2 hücrelerine daha düşük dozda uygulanana CB65 daha kısa sürede apoptozu arttırıcı etki göstermiştir.

Bu tez kapsamında CB2 reseptör agonisti CB65, MG63 ve Saos-2 hücre hatlarında antiproliferatif etkileri için ilk kez değerlendirilmiştir. Ancak CB65 daha önce başka kanser hatlarında doz bağımlı antiproliferatif etkileri açısından denenmiştir [119, 120, 195]. CB65,  $6.25 \times 10^{-10}$  M,  $2.5 \times 10^{-9}$  M ve  $2 \times 10^{-8}$  M dozlarda uygulandığında, 48 saatte HepG2 hepatosellüler karsinomu hattında MTT tekniği ile hücre proliferasyonunu azaltmış, antiproliferatif etkili dozu  $6.25 \times 10^{-10}$  M olarak belirlenmiştir [119]. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlara göre CB65 literatürde verilen zaman ile aynı fakat daha düşük dozda, MG63 osteosarkom hattında hücre çoğalmasını azaltıcı etki göstermiş, Saos-2 hücre hattında daha kısa sürede bu etkiye ulaşmıştır. Bu durum CB65'in osteosarkom hücre hatlarındaki etkisinin HepG2 hücre hattına göre daha kısa sürede ve daha düşük dozda olduğunu göstermektedir. CB65,  $1.0 \times 10^{-7}$  M,  $2.0 \times 10^{-7}$  M ve  $5.0 \times 10^{-8}$  M dozlarda MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat uygulanmış, MTT testi ile uygulanan tüm dozlarda CB65 kontrole göre hücrelerinin proliferasyonunu etkilememiştir [195]. CB2 agonisti CB65  $2.0 \times 10^{-5}$  M'a kadar artan dozlarda uygulandığında MDA-MB-231 hücreleri üzerinde proliferasyonu inhibe edici etki göstermiştir [195]. CB65 ve CB2 antagonisti AM630 birlikte uygulandıklarında MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattındaki antiproliferatif etkisini bloke etmiştir [195]. Tez çalışması bulgularına göre çok daha düşük dozda uygulanan CB65, osteosarkom hücre hatlarında hücre çoğalmasını azaltmaktadır. CB65'in AM630 ile birlikte uygulandığı osteosarkom hücre hatlarında da benzer şekilde antiproliferatif etkinin bloke olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre etkili dozda CB65'in meme kanseri hücre hattındaki etkinliğinin osteosarkomdaki etkinliğine göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında Ishikawa endometriyal adenokarsinom ve CRL-7566 yumurtalık endometriozis kist duvarı stromal hücre hatlarında impedans tabanlı gerçek zamanlı proliferasyon analizinde 46 saatte CB1 agonisti ACPA  $9.3 \times 10^{-6}$  M ve CB65  $1.9 \times 10^{-4}$  M dozda kontrole göre proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir. Aynı çalışmada  $1.9 \times 10^{-4}$  M dozda CB65 Ishikawa hücrelerine uygulandığında *Annexin V-PI* işaretli %42.4 geç apoptotik ve *Annexin* işaretli %38.1 erken apoptotik, ve CRL-7566 hücre hattına uygulandığında *Annexin V-PI* işaretli %4.7 geç apoptotik ve *Annexin* işaretli %73.6 erken apoptotik oranı saptanmıştır [120]. Tez çalışması kapsamında MG63 ve Saos-2 hatlarına sırasıyla 48 ve 24 saat uygulanan CB65'in literatürde verilen doza göre daha düşük dozda etki ettiği görülmüştür. MG63 hattı için görece aynı sürede daha yüksek apoptotik etki görülürken, Saos-2 için daha uzun sürede bu etki görülmüştür. Osteosarkom hücre hatlarına göre Ishikawa

endometriyal adenokarsinom ve CRL-7566 yumurtalık endometriozis kist duvarı stromal hücre hatlarında CB65'in apoptotik etkinliği daha yüksek fakat tez çalışması bulgularında daha düşük dozda CB65'in proliferasyonu azaltıcı etkileri olduğu görülmüştür. Tez çalışmasında elde edilen sonuçların CB65'in etkili doz penceresinin literatüre göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Düşük dozda etkinin sağlanması yan etkilerin azaltılması için fayda sağlayabilmektedir. Literatürde CB65'in osteosarkom hücrelerindeki proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu indükleyici etkilerine dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır ve bu kapsamda elde edilen deney çıktıları orijinal nitelik taşımaktadır.

### **CB65 Yüklü Lipozom Salım Sistemi in vitro Koşullarda MG63 ve Saos-2 Osteosarkom Hatlarında Hücre Proliferasyonunu $10^{-11}$ M Doz Salımı ile 16. Saatten İtibaren Gerçek Zamanlı Olarak Azaltmıştır**

CB65'in kontrollü salımının sağlanması için geliştirilen lipozomal formülasyonlar için yapılan stabilite analizine göre 0.2 mg CB65 yüklü lipozomun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli sırasıyla  $141.7 \pm 0.6$  nm,  $0.451 \pm 0.026$  ve  $-10.9 \pm 0.3$  mV; 0.4 mg CB65 yüklü lipozomun  $158.9 \pm 1.1$  nm,  $0.473 \pm 0.009$  ve  $-15.3 \pm 0.4$  mV ve 0.8 mg CB65 yüklü lipozomun  $161.4 \pm 3.7$  nm,  $0.460 \pm 0.015$  ve  $-16.0 \pm 0.3$  mV olarak ölçülmüştür. Tüm formülasyonlar için elde edilen zeta potansiyelleri +30 mV ve -30 mV aralığında saptanmış ve formülasyonların stabil olduğu görülmüştür [220]. Hazırlanan 3 formülasyonun polidispersite indeksi 0.5'in altında saptanmış ve formülasyonların homojen olduğu belirlenmiştir [220]. 0.2 ve 0.4 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonları 3 ay boyunca stabilitesini büyük oranda korurken 0.8 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonunun 1 ve 3. aya ait partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri 0. saat ve 7. güne göre artış göstermiştir. 3 aylık stabilite ölçümleri sonucunda en stabil olduğu belirlenen 0.2 ve 0.4 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %51.12 ve %41.96 olarak belirlenmiş ve görece yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilen 0.2 mg CB65 yüklü lipozom formülasyonu değerlendirmeye alınmıştır.

Literatürde CB65'in lipozoma veya başka salım sistemlerine yüklendiği herhangi bir çalışma yer almamaktadır. Yağ yapılı kannabinoidler kontrollü salım ile uzun süreli etki için lipozomlar [144, 181] başta olmak üzere katı lipit nanopartiküller [152, 184], nanoyapılı taşıyıcılar [179, 180, 183] gibi salım sistemlerine yüklenmektedir. Kannabidiol (CBD) lipozomlara yüklenmiş ve formülasyonun partikül büyüklüğü

1910.3±90.7 nm, polidispersite indeksi 0.8±0.1, zeta potansiyeli 5.0±1.6 mV ve yükleme etkinliği %90 olarak belirlenmiştir [144]. İlaç yüklenmemiş lipozom formülasyonunun partikül büyüklüğü 1559.7±142.0 nm, polidispersite indeksi 0.7±0.1 ve zeta potansiyeli 6.4±0.4 mV olarak ölçülmüştür [144]. Bu tez çalışması kapsamında CB65 yüklenen ve ilaç yüklenmeyen boş lipozom formülasyonu CBD yüklü lipozomal formülasyonuna göre daha yüksek homojenite ve daha düşük partikül büyüklüğü ile karakterize edildiği saptanmıştır. CB65 yüklü lipozomal formülasyona ait yükleme etkinliği CBD yüklü lipozomal formülasyona göre düşük saptanmıştır. İnce film oluşturma yöntemi ile diaçilgliserol lipaz-beta (DAGLβ) inhibitörü KT109 yüklenmiş lipozomal formülasyon için partikül büyüklüğü 91.0±2.0 nm ve yükleme etkinliği %0.4 olarak hesaplanmıştır [181]. Tez çalışması kapsamında elde edilen yükleme etkinliği KT109 yüklü lipozomal sisteme göre oldukça yüksek bulunmuştur. Kurkumin (Cur) ve HU-211 yüklü katı lipit nanopartikülleri (Cur-SNLs-HU-211) için -21.7±0.4 mV zeta potansiyeli ve 58.77±1.7 nm partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Cur/SNLs ve Cur/SNLs-HU-211'in yükleme etkinlikleri sırasıyla %21.61±1.65 ve %18.34±1.06 olarak ölçülmüştür [184]. Bu tez çalışmasının bulguları ile karşılaştırıldığında CB65'e ait yükleme etkinliğinin ve partikül büyüklüğünün daha yüksek, zeta potansiyel değerlerinin benzer seviyelerde olduğu görülmüştür. Ultrasonikasyon tekniği ile hazırlanan katı lipit nanopartiküllere Δ9-THC ve Δ9-THC-valin-hemisüksinat yüklenmiş ve sırasıyla partikül büyüklükleri 269.2 ± 5.66 nm, 287.80 ± 7.35 nm, polidispersite indeksleri 0.32±0.15, 0.29±0.01 ve yükleme etkinliği %96.84±0.02 ve %93.57±4.68 olarak verilmiştir [152]. Çalışma bulgularının CB65 yüklü lipozom sistemine göre yüksek homojenite gösterdiği ve yüksek yükleme etkinliği ve partikül büyüklüğü ile karakterize edildiği izlenmiştir. Sıcak mikroemülsiyon tekniği ile hazırlanmış CBD yüklenmiş ve ilaç yüklenmemiş nanoyapılı lipit taşıma (NLC) sisteminde ölçülen partikül boyutları sırasıyla 177.0 ± 3.1 nm ve 285.0 ± 5.2 nm olarak verilmiştir [183]. CBD yüklü ve yüklenmemiş NLC için polidispersite indeksleri sırasıyla 0.30±0.02 ve 0.34±0.05 ve zeta potansiyelleri sırasıyla 40±0.5 mV ve 41±0.6 mV olarak ölçülmüştür. CBD NLC sistemine %99 etkinlikle yüklenmiştir [183]. Çalışmaya ait bulgular tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular ile karşılaştırıldığında yüksek partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği, düşük polidispersite indeksi ve yüksek zeta potansiyeli göstermiştir. Bu bulgular halihazırda geliştirilen CB65 yüklü lipozom formülasyonunun yüksek stabilite ve görece düşük homojeniteye sahip olduğunu göstermektedir. Ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan NLC'lere rimonabant (RMN), AM251 ve URB597 yüklenmiş ve RMN için partikül büyüklüğü 92.5±1.5 nm,

polidispersite indeksi  $0.20 \pm 0.03$  ve yükleme etkinlikleri  $\%98.0 \pm 1.4$ ; AM251 için partikül büyüklüğü  $110.3 \pm 2.2$  nm, polidispersite indeksi  $0.24 \pm 0.01$  ve yükleme etkinlikleri  $\%99.9 \pm 0.1$ ; URB597 için partikül büyüklüğü  $104.0 \pm 1.8$  nm, polidispersite indeksi  $0.25 \pm 0.02$  ve yükleme etkinliği  $\%92.8 \pm 0.8$  olarak ölçülmüştür [179, 180]. Çalışmada elde edilen yükleme etkinliğine ilişkin bulgular CB65 yüklü lipozomal sisteme göre yüksek, partikül büyüklükleri düşük saptanmış ve formülasyonların yüksek homojenite gösterdiği görülmüştür.

Diyaliz membran yöntemi ile *in vitro* kümülatif CB65 salım çalışmasında, lipozom formülasyonları ile kontrollü bir salım profili gözlenmiştir. Buna göre CB65'in 30. dakikada  $\%25.32 \pm 4.2$ 'si, 60. dakikada  $\%49.12 \pm 5.2$ 'si, 120. dakikada  $\%56.72 \pm 5.8$ 'i, 180. dakikada  $\%61.69 \pm 6.4$ 'ü, 240. dakikada  $\%72.86 \pm 2.5$ 'i, 360. dakikada  $\%82.48 \pm 3.5$ 'i, 480. dakikada  $\%97.46 \pm 2.8$ 'i ve 1440. dakikada  $\%99.55 \pm 2.8$ 'i salınmıştır. Birinci saatin sonunda gözlenen ani salım etkisi lipozom çeperinde ve yüzeyde tutunan etken maddenin çözünme ortamına hızlı geçişine dayandırılmıştır [221, 222]. Ani salım ardından gözlenen kontrollü salım profili, çekirdek kısmındaki etken maddenin lipit tabakalardan difüzyonu ile ortama salınması sonucu daha yavaş salım göstermesine neden olmuştur [221, 222]. Suda kolaylıkla çözünmeyen matriksten etken maddenin salımı zamanla daha yavaş gerçekleşmiştir [221, 222]. Literatürde katı lipit nanopartiküllere yüklenmiş kurkumin 7 gün boyunca  $\%77$  salım profili göstermiştir [184]. Sıcak mikroemülsiyon tekniği ile hazırlanmış CBD yüklenmiş nanoyapılı lipit taşıma (NLC) sisteminde ilk 5 dakikada ani salımla ilacın  $\%50$ 'sinden fazlası salınmış ve sonraki 90 dakika boyunca yavaş ve sürekli salım gözlenmiştir [183]. Kannabidiolün yavaş ve sürekli salım gösterdiği 90 dakikalık periyodun çalışmamız kapsamında elde edilen CB65 salım süresine göre kısa olduğu görülmüştür.

MG63 hücrelerine  $10^{-11}$  M dozda salımı sağlanan CB65 yüklü lipozom formülasyonu tek ve 24 saat süreyle uygulandığında proliferasyonu 16. saatten 56. saate kadar kontrole göre azaltıcı etki gözlenmiştir. Yirmi dört saat süreyle uygulanan CB65 lipozomal formülasyon, MG63 hücrelerinde 16. saatten 56. saate kadar tek başına uygulanan  $10^{-11}$  M dozda CB65'e göre hücre proliferasyonunu azaltmıştır. İlaç yüklenmemiş boş lipozomal formülasyonlar tek sefer ve 24 saat süreyle uygulandığında MG63 hücrelerinde, 24 saat süreyle uygulanan CB65 lipozomal formülasyona göre 56. saate kadar antiproliferatif etki göstermemiştir. Tek seferde ve 24 saat süreyle ilaç

yüklenmemiş boş lipozomal formülasyonların uygulandığı MG63 hücrelerinin indeksi 40. saatten 56. saate kadar kontrol grubuna göre yüksek saptanmıştır. CB65 tek başına uygulandığında MG63 hücrelerinde 16. saatten 56. saate kadar kontrole göre antiproliferatif etki göstermiştir. Tüm deney ve kontrol gruplarında hücre proliferasyonu 32. saatten 56. saate kadar anlamlı artış göstermiştir. Saos-2 hücre hattında CB65'in  $10^{-11}$  M dozda salımı sağlandığında ilaç hücrelerin proliferasyonunda 16. saatten 72. saate kadar kontrole göre anlamlı azalmaya neden olmuştur. Tek başına  $10^{-11}$  M dozda uygulanan CB65 hücrelerin proliferasyonunda 24. saatten 48. saate kadar kontrole göre azalmaya neden olmuştur. CB65 yüklü ilaç formülasyonu, tek başına CB65 uygulanan gruptan farklı olarak kontrole göre daha uzun süreyle antiproliferatif etki göstermiştir. İlaç yüklenmemiş boş lipozom formülasyonu 16. saatten itibaren 40. saate kadar kontrole göre proliferasyonu azaltıcı etki göstermemiş, 48. saatten 72. saate kadar kontrole göre proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir. İlaç yüklenmemiş boş lipozom formülasyonu uygulanan Saos-2 hücre proliferasyonu 16. saatten 32. saate kadar CB65 ve CB65 yüklü lipozom formülasyonu ile karşılaştırıldığında yüksek saptanmıştır. Tüm deney ve kontrol gruplarında hücre proliferasyonu 24. saatten 32. saate kadar hücre proliferasyonunda azalma saptanmıştır. Tüm deney ve kontrol gruplarında hücre proliferasyonu 40. saatten 72. saate kadar artış göstermiştir.

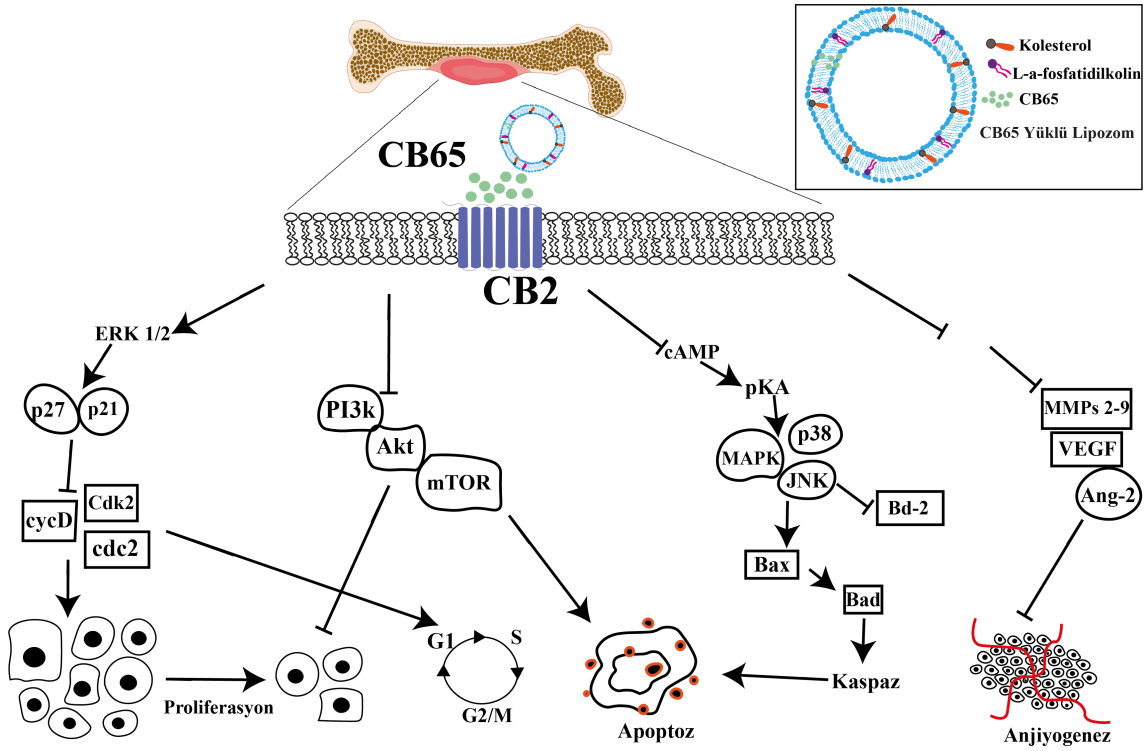
Tez çalışmasında CB65'in osteosarkom hücrelerine uygulanmasında kullanılan gerçek zamanlı proliferasyon analizi literatürdeki diğer çalışmalarda kullanılmamış olmakla birlikte bir çalışmada kemoterapötik ve kannabinoidler gibi hidrofobik yapılı bir ilaç olan doksorubisin (DOX) pH gradyan hidrasyon yöntemi ile lipozomlara yüklenmiş ve insan primer osteoblast ve MG-63, U2-OS, SaOS-2, SaOS-LM7 osteosarkom hücre hatlarında 72. saatte hücre proliferasyonu MTT ile değerlendirilmiştir. İlaç yüklenmemiş lipozom (F-DOX) ve 1 ppm DOX yüklü lipozom (L-DOX) osteoblast hücrelerinde sırasıyla %64.3 ve %48.46, MG63 hücrelerinde %60.1 ve %33.7, U2-OS hattında %58.2 ve %22.32, Saos-2 hücrelerinde %51.5 ve %14.88, Saos-LM7 hattında %56.5 ve %17.8 oranlarında canlılık göstermiştir [223]. Tez çalışmasına göre karşılaştırıldığında CB65 yüklenmiş lipozom formülasyonu MG63 ve Saos-2 hücre hatlarında 16. saatten itibaren etki göstermiştir. Yetmiş ikinci saatte hücrelerde görülen hücre canlılık oranları literatürde bildirilen hücre canlılık oranlarından daha yüksek saptanmıştır. Tez kapsamında ilaç yüklenmemiş boş lipozomların literatürde belirtilen boş lipozomlara göre hücre canlılığı daha yüksek saptanmıştır. Buna göre hazırlanan boş lipozomların hücrelerin canlılığına

etkisinin toksik olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda lipozom formülasyonlarının *in vitro* koşullarda etkili olduğu ve *in vivo* koşullarda daha başarılı sonuçlar alınabileceği öngörülmektedir. Hücre membranına benzer yapısı, toksik olmaması, enkapsüle edilebilmesi ve kontrollü salınabilmesi nedeniyle lipozomal formülasyonlar önerilen taşıma sistemleri arasında yer alabilecektir.

Klinikte osteosarkom tedavisi için immünmodülatör olarak kullanılan etanolamid türevi mifamurtid (lipozomal muramil tripeptid fosfatidil etanolamin, L-MTP-PE) lipozomal bir formül olan Mepact® (Millennium, Cambridge, MA, ABD), Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmıştır [14, 28, 173, 174]. Tez çalışması kapsamında ilk kez osteosarkom tedavisi için sentetik spesifik CB2 reseptörü agonisti CB65'in MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücre hatlarında antiproliferatif ve apoptotik etkisi *in vitro* çalışmalarla gösterilmiş ve ileri çalışmalarda CB reseptörlerinin osteosarkom hücrelerde varlığının qRT-PCR yöntemi validasyonu, hücresel mekanizmaların ve CB65 yüklenmiş lipozomal formülasyonun *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi hedeflenmiştir. CB65 yüklenmiş lipozomal formülasyonun osteosarkom tedavisi için klinikte küratif bir ilaç adayı olması beklenmektedir. Çalışmanın literatüre yenilikçi katkısı bulunmakta ve tedaviye yönelik bir ürün geliştirilmesine destek sağlamaktadır.

Tez çalışması kapsamında karşılaşılan bazı sınırlamalar mevcuttur. Çalışmada bulguların geçerliliği *in vitro* koşullarda incelenen iki adet osteosarkom hücre hattı ile sınırlı olup elde edilen çıktılar aynı koşullarda daha fazla hücre hattında ve sonrasında *in vivo* kanser modellerinde test edilmelidir. Literatürde MG63 ve Saos-2 hücre hatlarında CB1 ve CB2 reseptör tayini çalışmalarının akım sitometrisi yöntemi ile tayininin yapılamaması limitasyonlardan biri olmuştur. Ek olarak akım sitometrisi yöntemi dışında kantitatif yöntemler ile reseptör tayini yapılmalıdır. Diğer yandan elde edilen veriler gerçek zamanlı çok sayıda ilaç analizinin gerçekleştirildiği platformların çıktısıdır. Antagonistik çalışmamız kapsamında CB2 reseptör agonistinin spesifik etkileri antagonistik çalışma ile belirlenmiş olup etkinin geçerli ve güvenilir doz penceresi bu yolla saptanmıştır. Ayrıca etkinin reseptör sonrası moleküler mekanizması sinyal yolları üzerinden analiz edilmelidir. Lipozom formülasyonu geliştirme aşamasında TEM/SEM görüntüleme çalışmaları yapılmalıdır. Ayrıca geliştirilen lipozomal formülasyon *in vivo* çalışmalarla desteklenmelidir. Bütün bu limitasyonlar ileri çalışmaların konusu olacaktır.

**Sonuç olarak bu tez kapsamında** MG63 ve Saos-2 hücre hatlarında CB2 reseptörünün CB1 reseptörüne göre daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. Sentetik spesifik CB2 agonisti CB65'in MG63 ve Saos-2 osteosarkom hücre hatlarında yarı maksimum etkili dozu  $1.11 \times 10^{-11}$  M ve  $4.95 \times 10^{-11}$  M olarak belirlenmiş, MG63 hücrelerinde 48. saatte, Saos-2 hücrelerinde 24. saatte proliferasyonu azaltıcı ve apoptozu indükleyici etkisi ortaya konmuştur. CB65 *in vitro* koşullarda lipozomal sisteme yüklenmiş, bu formülasyon daha yüksek ve erken antiproliferatif etki göstermiştir. Elde edilen çıktılar *in vivo* hayvan modellerinde valide edilebilirse klinikte yüksek mortalite, morbidite gösteren, çocuklarda ve gençlerde yaygın görülen osteosarkom tedavisi için hedefli ajanı olma potansiyeli taşıyabilir.



**Şekil 5.1.** Sentetik, spesifik CB2 agonisti CB65'in osteosarkom hücrelerinde CB2 reseptörü aracılı antiproliferatif ve apoptotik etkisi etki mekanizmaları ile gösterilmiştir.

## SONUÇLAR

1. MG63 ve Saos-2 hücre hatlarında farklı oranlarda CB1 ve CB2 reseptörleri saptanmış ve CB2 reseptör oranı CB1 reseptör oranına göre daha yüksek seviyede bulunmuştur.
2. Kannabinoid 2 reseptörünü yüksek seviyede bulunduran MG63 ve Saos-2 hücre hatlarında WST-1 yöntemi ile, sentetik spesifik CB2 agonisti CB65 proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir.
3. Gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile sentetik spesifik CB2 agonisti CB65, MG63 hücrelerinde  $1.11 \times 10^{-11}$  M dozda 48. saatte, Saos-2 hücrelerinde  $4.95 \times 10^{-11}$  M dozda 24. saatte proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir.
4. Akım sitometrisi yöntemi ile sentetik spesifik CB2 agonisti CB65, MG63 hücrelerinde  $1.11 \times 10^{-11}$  M dozda 48. saatte, Saos-2 hücrelerinde  $4.95 \times 10^{-11}$  M dozda 24. saatte apoptozu indükleyici etki göstermiştir.
5. CB65 *in vitro* koşullarda lipozomal sisteme başarıyla yüklenmiştir.
6. CB65 lipozomal taşıma sisteminden 24 saatte salınmış ve gerçek zamanlı proliferasyon analizi ile MG63 ve Saos-2 hücrelerinde 16. saatten 56. saate kadar proliferasyonu azaltıcı etki göstermiştir.
7. Sentetik spesifik CB2 reseptör agonisti CB65,  $1.11 \times 10^{-11}$  M salacak şekilde lipozomal formülasyona yüklenip proliferasyonu azaltıcı etki göstermiş olup, *in vivo* hayvan deneyleri ile valide edilirse osteosarkom tedavisi için klinikte küratif bir ilaç adayı olabilir.

## KAYNAKLAR

- [1] F. Punzo, C. Tortora, D. Di Pinto, I. Manzo, G. Bellini, F. Casale and F. Rossi, Anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-invasive effect of EC/EV system in human osteosarcoma, *Oncotarget*, 8 (2017) 54459-54471.
- [2] B. A. Lindsey, J. E. Markel and E. S. Kleinerman, Osteosarcoma Overview, *Rheumatol Ther*, 4 (2017) 25-43.
- [3] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs and A. Jemal, Cancer statistics, 2022, *CA Cancer J Clin*, 72 (2022) 7-33.
- [4] F. Niu, S. Zhao, C.-Y. Xu, H. Sha, G.-B. Bi, L. Chen, L. Ye, P. Gong and T.-H. Nie, Potentiation of the antitumor activity of adriamycin against osteosarcoma by cannabinoid WIN-55,212-2, *Oncol Lett*, 10 (2015) 2415-2421.
- [5] D. I. Abrams and M. Guzman, Cannabis in cancer care, *Clin Pharmacol Ther*, 97 (2015) 575-586.
- [6] V. Bogdanović, J. Mrdjanović and I. Borišev, A review of the therapeutic antitumor potential of cannabinoids, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 23 (2017) 831-836.
- [7] T. Dzierżanowski, Prospects for the use of cannabinoids in oncology and palliative care practice: a review of the evidence, *Cancers*, 11 (2019) 129.
- [8] B. Hinz and R. Ramer, Anti-tumour actions of cannabinoids, *British journal of pharmacology*, 176 (2019) 1384-1394.
- [9] M.-A. Fitzcharles and W. Häuser, Cannabinoids in the management of musculoskeletal or rheumatic diseases, *Current rheumatology reports*, 18 (2016) 1-9.
- [10] E. Moreno, M. Cavic, A. Krivokuca, V. Casadó and E. Canela, The endocannabinoid system as a target in cancer diseases: are we there yet?, *Frontiers in pharmacology*, 10 (2019) 339.
- [11] D. Apostu, O. Lucaciu, A. Mester, H. Benea, D. Oltean-Dan, F. Onisor, M. Baciut and S. Bran, Cannabinoids and bone regeneration, *Drug Metab Rev*, 51 (2019) 65-75.
- [12] A. Zimmer, A collaboration investigating endocannabinoid signalling in brain and bone, *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 27 (2016) 229-235.
- [13] F. Punzo, C. Tortora, D. Di Pinto, E. Pota, M. Argenziano, A. Di Paola, F. Casale and F. Rossi, Bortezomib and endocannabinoid/endovanilloid system: a synergism in osteosarcoma, *Pharmacol Res*, 137 (2018) 25-33.
- [14] G. Bellini, D. Di Pinto, C. Tortora, I. Manzo, F. Punzo, F. Casale and F. Rossi, The Role of Mifamurtide in Chemotherapy-induced Osteoporosis of Children with Osteosarcoma, *Curr Cancer Drug Targets*, 17 (2017) 650-656.
- [15] R. L. Siegel, K. D. Miller and A. Jemal, Cancer statistics, 2020, *CA Cancer J Clin*, 70 (2020) 7-30.

- [16] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs and A. Jemal, Cancer Statistics, 2021, CA Cancer J Clin, 71 (2021) 7-33.
- [17] T.C. Sağlık Bakanlığı, <https://www.saglik.gov.tr/>, Erişim Tarihi: 27.11.2021
- [18] S. J. Taran, R. Taran and N. B. Malipatil, Pediatric osteosarcoma: an updated review, Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology, 38 (2017) 33.
- [19] R. E. Coleman, P. I. Croucher, A. R. Padhani, P. Clézardin, E. Chow, M. Fallon, T. Guise, S. Colangeli, R. Capanna and L. Costa, Bone metastases, Nat Rev Dis Primers, 6 (2020) 83.
- [20] J. J. Yin, C. B. Pollock and K. Kelly, Mechanisms of cancer metastasis to the bone, Cell Res, 15 (2005) 57-62.
- [21] G. Gandaglia, F. Abdollah, J. Schiffmann, V. Trudeau, S. F. Shariat, S. P. Kim, P. Perrotte, F. Montorsi, A. Briganti, Q. D. Trinh, P. I. Karakiewicz and M. Sun, Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis, Prostate, 74 (2014) 210-216.
- [22] J. Fornetti, A. L. Welm and S. A. Stewart, Understanding the Bone in Cancer Metastasis, J Bone Miner Res, 33 (2018) 2099-2113.
- [23] A. L. Thompson, S. Grenald, H. Ciccone, N. BassiriRad, M. Niphakis, B. Cravatt, T. M. Largent-Milnes and T. W. Vanderah, The endocannabinoid system Alleviates pain in a murine model of cancer-induced bone pain, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 373 (2020) 230-238.
- [24] Dünya Sağlık Örgütü (WHO), <https://www.who.int/>, Erişim Tarihi: 27.11.2021
- [25] J. H. Choi and J. Y. Ro, The 2020 WHO Classification of Tumors of Bone: An Updated Review, Adv Anat Pathol, 28 (2021) 119-138.
- [26] D. J. Harrison, D. S. Geller, J. D. Gill, V. O. Lewis and R. Gorlick, Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma, Expert Rev Anticancer Ther, 18 (2018) 39-50.
- [27] A. Luetke, P. A. Meyers, I. Lewis and H. Juergens, Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review, Cancer Treat Rev, 40 (2014) 523-532.
- [28] G. Chindamo, S. Sapino, E. Peira, D. Chirio, M. C. Gonzalez and M. Gallarate, Bone Diseases: Current Approach and Future Perspectives in Drug Delivery Systems for Bone Targeted Therapeutics, Nanomaterials (Basel), 10 (2020) 875.
- [29] C. F. Jehn, I. J. Diel, F. Overkamp, A. Kurth, R. Schaefer, K. Miller and D. Lüttner, Management of Metastatic Bone Disease Algorithms for Diagnostics and Treatment, Anticancer Res, 36 (2016) 2631-2637.
- [30] H. Majeed and V. Gupta, Adverse Effects Of Radiation Therapy, StatPearls, StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2022.
- [31] P. G. Casali, S. Bielack, N. Abecassis, H. T. Aro, S. Bauer, R. Biagini, S. Bonvalot, I. Boukovinas, J. Bovee, B. Brennan, T. Brodowicz, J. M. Broto, L. Brugières, A. Buonadonna, E. De Álava, A. P. Dei Tos, X. G. Del Muro, P. Dileo, C. Dhooge, M. Eriksson, F. Fagioli, A. Fedenko, V. Ferraresi, A. Ferrari, S. Ferrari, A. M. Frezza, N. Gaspar, S. Gasperoni, H. Gelderblom, T. Gil, G. Grignani, A. Gronchi, R. L. Haas, B.

Hassan, S. Hecker-Nolting, P. Hohenberger, R. Issels, H. Joensuu, R. L. Jones, I. Judson, P. Jutte, S. Kaal, L. Kager, B. Kasper, K. Kopeckova, D. A. Krákorová, R. Ladenstein, A. Le Cesne, I. Lugowska, O. Merimsky, M. Montemurro, B. Morland, M. A. Pantaleo, R. Piana, P. Picci, S. Piperno-Neumann, A. L. Pousa, P. Reichardt, M. H. Robinson, P. Rutkowski, A. A. Safwat, P. Schöffski, S. Sleijfer, S. Stacchiotti, S. J. Strauss, K. Sundby Hall, M. Unk, F. Van Coevorden, W. T. A. van der Graaf, J. Whelan, E. Wardelmann, O. Zaikova and J. Y. Blay, Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *Ann Oncol*, 29 (2018) iv79-iv95.

[32] S. Ferrari, S. S. Bielack, S. Smeland, A. Longhi, G. Egerer, K. Sundby Hall, D. Donati, M. Kevric, O. Brosjö, A. Comandone, M. Werner, O. Monge, E. Palmerini, W. E. Berdel, B. Bjerkhagen, A. Paioli, S. Lorenzen, M. Eriksson, M. Gambarotti, P. U. Tunn, N. L. Jebsen, M. Cesari, T. von Kalle, V. Ferraresi, R. Schwarz, R. Bertulli, A. K. Kasperek, G. Grignani, F. Krasniqi, B. Sorg, S. Hecker-Nolting, P. Picci and P. Reichardt, EURO-B.O.S.S.: A European study on chemotherapy in bone-sarcoma patients aged over 40: Outcome in primary high-grade osteosarcoma, *Tumori*, 104 (2018) 30-36.

[33] B. E. Walczak and R. B. Irwin, Sarcoma Chemotherapy, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 21 (2013) 48P 491.

[34] B. Wippel, K. R. Gundle, T. Dang, J. Paxton, J. Bubalo, L. Stork, R. Fu, C. W. Ryan and L. E. Davis, Safety and efficacy of high-dose methotrexate for osteosarcoma in adolescents compared with young adults, *Cancer Med*, 8 (2019) 111-116.

[35] C. Carvalho, R. X. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P. J. Oliveira, M. S. Santos and P. I. Moreira, Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect, *Curr Med Chem*, 16 (2009) 3267-3285.

[36] A. B. Ariffin, P. F. Forde, S. Jahangeer, D. M. Soden and J. Hinchion, Releasing pressure in tumors: what do we know so far and where do we go from here? A review, *Cancer Res*, 74 (2014) 2655-2662.

[37] R. J. Lane, N. Y. Khin, N. Pavlakis, T. J. Hugh, S. J. Clarke, J. Magnussen, C. Rogan and R. L. Flekser, Challenges in chemotherapy delivery: comparison of standard chemotherapy delivery to locoregional vascular mass fluid transfer, *Future Oncol*, 14 (2018) 647-663.

[38] L. Yan, J. Shen, J. Wang, X. Yang, S. Dong and S. Lu, Nanoparticle-Based Drug Delivery System: A Patient-Friendly Chemotherapy for Oncology, *Dose-Response*, 18 (2020) 155932582093616.

[39] J. Liu, D. Tu, J. Dancey, L. Reyno, K. I. Pritchard, J. Pater and L. K. Seymour, Quality of life analyses in a clinical trial of DPPE (tesmilifene) plus doxorubicin versus doxorubicin in patients with advanced or metastatic breast cancer: NCIC CTG Trial MA.19, *Breast Cancer Res Treat*, 100 (2006) 263-271.

[40] G. Rosen, B. Caparros, S. Groshen, A. Nirenberg, A. Cacavio, R. C. Marcove, J. M. Lane and A. G. Huvos, Primary osteogenic sarcoma of the femur: a model for the use of preoperative chemotherapy in high risk malignant tumors, *Cancer Invest*, 2 (1984) 181-192.

[41] C. L. Schwartz, R. Gorlick, L. Teot, M. Krailo, Z. Chen, A. Goorin, H. E. Grier, M. L. Bernstein and P. Meyers, Multiple drug resistance in osteogenic sarcoma: INT0133 from the Children's Oncology Group, *J Clin Oncol*, 25 (2007) 2057-2062.

- [42] J. S. Whelan and L. E. Davis, Osteosarcoma, Chondrosarcoma, and Chordoma, *J Clin Oncol*, 36 (2018) 188-193.
- [43] S. A. Desai, A. Manjappa and P. Khulbe, Drug delivery nanocarriers and recent advances ventured to improve therapeutic efficacy against osteosarcoma: an overview, *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 33 (2021) 1-14.
- [44] S. Ferrari and M. Serra, An update on chemotherapy for osteosarcoma, *Expert opinion on pharmacotherapy*, 16 (2015) 2727-2736.
- [45] A. B. Shaikh, F. Li, M. Li, B. He, X. He, G. Chen, B. Guo, D. Li, F. Jiang, L. Dang, S. Zheng, C. Liang, J. Liu, C. Lu, B. Liu, J. Lu, L. Wang, A. Lu and G. Zhang, Present Advances and Future Perspectives of Molecular Targeted Therapy for Osteosarcoma, *Int J Mol Sci*, 17 (2016) 506.
- [46] D. S. Geller and R. Gorlick, Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies, *Clin Adv Hematol Oncol*, 8 (2010) 705-718.
- [47] C. s. O. Group, A Phase 1/2 Trial of CBL0137 (NSC# 825802) in Patients With Relapsed or Refractory Solid Tumors, Including CNS Tumors and Lymphoma, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04870944?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=4&rank=28>, 2022.
- [48] C. s. N. R. Institute, Phase II Study Investigating the Efficacy of Neoadjuvant Dual Checkpoint Inhibition and Cryoablation Therapy in Children, Adolescents, and Young Adults With Relapsed/Refractory Solid Tumors, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05302921?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=6&rank=49>, 2022.
- [49] L. PersonGen BioTherapeutics (Suzhou) Co., Clinical Study of CD276 Targeted Autologous Chimeric Antigen Receptor T Cell Infusion in Patients With CD276 Positive Advanced Solid Tumor, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04864821?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=3&rank=18>, 2021.
- [50] B. G. H. a. R. Institute, Phase I/II Study of Anti-GD2 Chimeric Antigen Receptor-Expressing T Cells in Pediatric Patients Affected by High Risk and/or Relapsed/Refractory Neuroblastoma or Other GD2-positive Solid Tumors, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03373097?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=8&rank=66>, 2022.
- [51] S. C. s. Hospital, Phase I Study of B7H3 CAR T Cell Immunotherapy for Recurrent/Refractory Solid Tumors in Children and Young Adults, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04483778?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=10&rank=82>, 2021.
- [52] T. Health, The Registry of Oncology Outcomes Associated With Testing and Treatment (ROOT), <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04028479?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=2&rank=4>, 2021.
- [53] A. Kim, A Phase I Study of Lyso-thermosensitive Liposomal Doxorubicin (LTLTD, ThermoDox®) and Magnetic Resonance-Guided High Intensity Focused Ultrasound (MR-HIFU) for Relapsed or Refractory Solid Tumors in Children, Adolescents, and Young Adults,

<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02536183?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=8&rank=68>, 2021.

[54] L. OMNI Medical Services, Outcomes Mandate National Integration With Cannabis as Medicine for Prevention and Treatment of COVID-19, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03944447?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=4&rank=25>, 2022.

[55] R. Hospital, A Phase II Study of Gemcitabine-docetaxel Chemotherapy With VEGFR Inhibitor (Apatinib) for Pulmonary Resectable Metastases of Osteosarcoma, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03742193?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=2&rank=5>, 2020.

[56] P. U. P. s. Hospital, Apatinib in Combination With Ifosfamide and Etoposide (IE) for Relapsed or Refractory Osteosarcoma Progressed Upon First-line Chemotherapy (AIEO): a Prospective, Multiple-centre, Two-arm, Phase 2 Trial, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05277480?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=5&rank=38>, 2022.

[57] P. U. P. s. Hospital, A Randomized Trial of Comparison of MAPI+Camrelizumab Versus API+Apatinib Versus MAPI in Patients With a Poor Response to Preoperative Chemotherapy for Newly Diagnosed High-grade Osteosarcoma : an Open-label, Exploratory Study, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04351308?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=5&rank=40>, 2020.

[58] N. C. I. (NCI), GD2-CAR PERSIST: Production and Engineering of GD2-Targeted, Receptor Modified T Cells (GD2CART) for Osteosarcoma or Neuroblastoma to Increase Systemic Tumor Exposure, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04539366?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=2&rank=6>, 2022.

[59] U. L. C. C. Center, A Phase I Study of Autologous Activated T-Cells Expressing a 2nd Generation GD2 Chimeric Antigen Receptor, IL-15, and iCaspase9 Safety Switch Administered To Patients With Relapsed/Refractory Neuroblastoma or Relapsed/Refractory Osteosarcoma, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03721068?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=3&rank=14>, 2022.

[60] M. D. A. C. Center, Clinical Study to Assess Efficacy and Safety of LN-145/LN-145-S1 (Autologous Centrally Manufactured Tumor Infiltrating Lymphocytes) Across Multiple Tumor Types, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03449108?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=7&rank=54>, 2021.

[61] M. Varun Monga, A Pilot Study of Gemcitabine Plus High-Dose Ascorbate in Locally Advanced Unresectable or Metastatic Soft Tissue and Bone Sarcomas in Adults, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04634227?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=4&rank=21>, 2022.

[62] D. Dickens, A Pilot Study of Gemcitabine Plus High-Dose Ascorbate in Locally Advanced Unresectable or Metastatic Soft Tissue and Bone Sarcomas Including Adolescents, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04877587?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=8&rank=61>, 2022.

- [63] L. s. P. Limited, An Open-label, Dose-escalation, Bi-weekly Phase I+II Clinical Trial in Treating Patients With Limited Stage of High-grade Osteosarcoma of Maintenance Therapy After Adjuvant Chemotherapy,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03676985?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=4&rank=23>, 2018.
- [64] S. Y.-s. University, A Phase II ,Open-label ,Single Institution Study to Investigate the Efficacy and Safety of Camrelizumab in Combination With Neoadjuvant Chemotherapy in the Treatment of Locally , Resectable Osteosarcoma,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04294511?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=4&rank=24>, 2020.
- [65] C. L. Berard, A Randomized, Placebo-controlled, Double-blinded, Multicentre Study Evaluating the Efficacy and Safety of Regorafenib as Maintenance Therapy After First-line Treatment in Patients With Bone Sarcomas,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04055220?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=4&rank=26>, 2021.
- [66] H. L. M. C. C. a. R. Institute, Phase II Study of Nab-Paclitaxel in Combination With Gemcitabine for Treatment of Recurrent/Refractory Sarcoma in Teenagers and Young Adults,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02945800?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=4&rank=30>, 2021.
- [67] A. T. Inc., Phase 1/2 Study of 9-ING-41, a Glycogen Synthase Kinase-3 Beta (GSK-3 $\beta$ ) Inhibitor, as a Single Agent and Combined With Chemotherapy, in Patients With Refractory Hematologic Malignancies or Solid Tumors,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03678883?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=9&rank=72>, 2022.
- [68] A. Foundation, BLESSED: Expanded Access for DeltaRex-G for Advanced Pancreatic Cancer and Sarcoma,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04091295?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=8&rank=65>, 2022.
- [69] G. E. d. I. e. Sarcomas, Phase II Multicohort Trial of Trabectedin and Low-dose Radiation Therapy in Advanced/Metastatic Sarcomas,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05131386?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=7&rank=59>, 2021.
- [70] N. C. s. Hospital, Phase 2 Study of Cabozantinib as a Maintenance Agent to Prevent Progression or Recurrence in High-Risk Pediatric Solid Tumors,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05135975?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=10&rank=90>, 2022.
- [71] N. C. I. (NCI), NCI-COG Pediatric MATCH (Molecular Analysis for Therapy Choice) Screening Protocol,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03155620?term=targeted+therapy&cond=osteosarcoma&draw=2&rank=2>, 2022.
- [72] D. University of Colorado, Effects of Cannabis Use in Cancer Patients: A Feasibility Study,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03617692?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=2&rank=10>, 2021.

- [73] A. a. C. C. R. United, Treatment of Established Chemotherapy-Induced Neuropathy With N-Palmitoylethanolamide, a Cannabimimetic Nutraceutical: A Randomized Double-Blind Phase II Pilot Trial,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05246670?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=4&rank=22>, 2022.
- [74] A. m. Tumorthérapie, Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase III Clinical Trial to Investigate the Efficacy and Safety of Dronabinol in the Improvement of Chemotherapy-induced and Tumor-Related Symptoms in Patients With Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Cancer During First-line Chemotherapy (DISCOVER),  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03984214?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=3&rank=16>, 2022.
- [75] L. S. A. S, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of 3 Standard Formulations of  $\Delta^9$ -THC in Healthy Volunteers and Post-chemotherapy Patients in Colombia,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05272865?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=3&rank=15>, 2022.
- [76] G. E. d. I. e. Neurooncología, Phase Ib, Open-label, Multicenter, Inpatient Dose-escalation Clinical Trial to Assess the Safety Profile of the TN-TC11G (THC+CBD) Combination With Temozolomide and Radiotherapy in Patients With Newly-diagnosed Glioblastoma,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03529448?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=4&rank=24>, 2022.
- [77] T. Bio-Pharma, Inhaled PPP001 Versus Immediate-release Oral Opioids for the Management of Breakthrough Pain in Cancer Subjects: a Randomized, Open Label, Crossover, Comparison Study,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03564548?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=2&rank=1>, 2018.
- [78] D. University of Colorado, Quantification of Endo- and Phytocannabinoids With Comparison to Pain Medication Requirements and Surgical Outcomes for Patients Undergoing Abdominal Surgery for Cancer,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04988490?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=2&rank=6>, 2021.
- [79] M. Clinical, NanaBis™ an Oro-buccal Administered Equimolar  $\Delta^9$ -THC & CBD Formulation as Monotherapy for Management of Opioid Requiring Bone Pain Due to Metastatic Cancer: Phase 3 Multi Centre Blinded Randomized Withdrawal Active & Placebo Controlled Trial,  
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04808531?term=cannabinoid&cond=cancer&draw=3&rank=11>, 2022.
- [80] P. Pacher, N. M. Kogan and R. Mechoulam, Beyond THC and endocannabinoids, Annual review of pharmacology and toxicology, 60 (2020) 637-659.
- [81] A. C. Howlett and M. E. Abood, CB(1) and CB(2) Receptor Pharmacology, Adv Pharmacol, 80 (2017) 169-206.
- [82] J. Tam, L. Hinden, A. Drori, S. Udi, S. Azar and S. Baraghithy, The therapeutic potential of targeting the peripheral endocannabinoid/CB1 receptor system, European journal of internal medicine, 49 (2018) 23-29.

- [83] V. Di Marzo, New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system, *Nature Reviews Drug Discovery*, 17 (2018) 623-639.
- [84] B. Raphael and Y. Gabet, The skeletal endocannabinoid system: clinical and experimental insights, *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 27 (2016) 237-245.
- [85] G. Velasco, C. Sánchez and M. Guzmán, Towards the use of cannabinoids as antitumour agents, *Nature Reviews Cancer*, 12 (2012) 436-444.
- [86] H. Golan, T. Fisher and A. Toren, The Role of Cannabinoids in the Treatment of Cancer in Pediatric Patients, *Isr Med Assoc J*, 19 (2017) 89-94.
- [87] S. Hryhorowicz, M. Walczak, O. Zakerska-Banaszak, R. Słomski and M. Skrzypczak-Zielińska, Pharmacogenetics of cannabinoids, *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 43 (2018) 1-12.
- [88] J. Ehrenkranz and M. A. Levine, Bones and joints: The effects of cannabinoids on the skeleton, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 104 (2019) 4683-4694.
- [89] O. Almogi-Hazan and R. Or, Cannabis, the Endocannabinoid System and Immunity-the Journey from the Bedside to the Bench and Back, *Int J Mol Sci*, 21 (2020).
- [90] J. Li, J. Zhao, T. Tan, M. Liu, Z. Zeng, Y. Zeng, L. Zhang, C. Fu, D. Chen and T. Xie, Nanoparticle Drug Delivery System for Glioma and Its Efficacy Improvement Strategies: A Comprehensive Review, *Int J Nanomedicine*, 15 (2020) 2563-2582.
- [91] C. M. O'Connor, A. A. Anoushiravani, C. Adams, J. R. Young, K. Richardson and A. J. Rosenbaum, Cannabinoid Use in Musculoskeletal Illness: a Review of the Current Evidence, *Curr Rev Musculoskelet Med*, 13 (2020) 379-384.
- [92] A. P. López-Cardona, S. Pérez-Cerezales, R. Fernández-González, R. Laguna-Barraza, E. Pericuesta, N. Agirregoitia, A. Gutiérrez-Adán and E. Agirregoitia, CB(1) cannabinoid receptor drives oocyte maturation and embryo development via PI3K/Akt and MAPK pathways, *Faseb j*, 31 (2017) 3372-3382.
- [93] C. Turcotte, M.-R. Blanchet, M. Laviolette and N. Flamand, The CB(2) receptor and its role as a regulator of inflammation, *Cell Mol Life Sci*, 73 (2016) 4449-4470.
- [94] T. W. Moody, S. Mantey, R. T. Jensen, D. Wink, P. Mukhopadhyay and P. Pacher, Cannabinoids inhibit epidermal growth factor receptor transactivation in lung cancer cells, *AACR*, 2012.
- [95] J. Ravi, A. Sneh, K. Shilo, M. W. Nasser and R. K. Ganju, FAAH inhibition enhances anandamide mediated anti-tumorigenic effects in non-small cell lung cancer by downregulating the EGF/EGFR pathway, *Oncotarget*, 5 (2014) 2475-2486.
- [96] T. Hua, K. Vemuri, S. P. Nikas, R. B. Laprairie, Y. Wu, L. Qu, M. Pu, A. Korde, S. Jiang, J. H. Ho, G. W. Han, K. Ding, X. Li, H. Liu, M. A. Hanson, S. Zhao, L. M. Bohn, A. Makriyannis, R. C. Stevens and Z. J. Liu, Crystal structures of agonist-bound human cannabinoid receptor CB(1), *Nature*, 547 (2017) 468-471.
- [97] P. González-Naranjo, C. Pérez, R. Girón, E. M. Sánchez-Robles, M. I. Martín-Fontelles, N. Carrillo-López, J. Martín-Vírgala, M. Naves, N. E. Campillo and J. A. Páez, New cannabinoid receptor antagonists as pharmacological tool, *Bioorg Med Chem*, 28 (2020) 115672.

- [98] A. I. Idris and S. H. Ralston, Cannabinoids and bone: friend or foe?, *Calcif Tissue Int*, 87 (2010) 285-297.
- [99] A. Dietrich, Transient Receptor Potential (TRP) Channels in Health and Disease, *Cells*, 8 (2019).
- [100] B. Chakravarti, J. Ravi and R. K. Ganju, Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications, *Oncotarget*, 5 (2014) 5852.
- [101] M. Du, Y. Wang, W. Zhao, Z. Wang, J. Yuan and H. Bai, Study on the relationship between livin expression and osteosarcoma, *J Bone Oncol*, 12 (2018) 27-32.
- [102] S. D. Kim, K. J. Cho and J. C. Kim, Expression of cannabinoid 1 and, 2 receptors and the effects of cannabinoid 1 and, 2 receptor agonists on detrusor overactivity associated with bladder outlet obstruction in rats, *BMC Urol*, 17 (2017) 121.
- [103] J. Wu, Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system: yesterday, today, and tomorrow, *Acta Pharmacol Sin*, 40 (2019) 297-299.
- [104] I. Bab, O. Ofek, J. Tam, J. Rehnelt and A. Zimmer, Endocannabinoids and the regulation of bone metabolism, *J Neuroendocrinol*, 20 Suppl 1 (2008) 69-74.
- [105] A. Sophocleous, A. I. Idris and S. H. Ralston, Genetic background modifies the effects of type 2 cannabinoid receptor deficiency on bone mass and bone turnover, *Calcif Tissue Int*, 94 (2014) 259-268.
- [106] I. Galve-Roperh, V. Chiurchiù, J. Díaz-Alonso, M. Bari, M. Guzmán and M. Maccarrone, Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation, *Prog Lipid Res*, 52 (2013) 633-650.
- [107] Y. Ma, J. S. Nyman, H. Tao, H. H. Moss, X. Yang and F. Elefteriou,  $\beta$ 2-Adrenergic receptor signaling in osteoblasts contributes to the catabolic effect of glucocorticoids on bone, *Endocrinology*, 152 (2011) 1412-1422.
- [108] F. Niu, S. Zhao, C. Y. Xu, H. Sha, G. B. Bi, L. Chen, L. Ye, P. Gong and T. H. Nie, Potentiation of the antitumor activity of adriamycin against osteosarcoma by cannabinoid WIN-55,212-2, *Oncology Letters*, 10 (2015) 2415-2421.
- [109] A. Notaro, S. Sabella, O. Pellerito, R. Di Fiore, A. De Blasio, R. Vento, G. Calvaruso and M. Giuliano, Involvement of PAR-4 in cannabinoid-dependent sensitization of osteosarcoma cells to TRAIL-induced apoptosis, *International journal of biological sciences*, 10 (2014) 466.
- [110] A. Notaro, S. Sabella, O. Pellerito, R. Vento, G. Calvaruso and M. Giuliano, The secreted protein acidic and rich in cysteine is a critical mediator of cell death program induced by WIN/TRAIL combined treatment in osteosarcoma cells, *International Journal of Oncology*, 48 (2016) 1039-1044.
- [111] A. Notaro, S. Emanuele, F. Geraci, A. D'Anneo, M. Lauricella, G. Calvaruso and M. Giuliano, WIN55, 212-2-induced expression of Mir-29b1 Favours the suppression of osteosarcoma cell migration in a SPARC-independent manner, *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (2019) 5235.
- [112] G. Zhang, H. Bi, J. Gao, X. Lu and Y. Zheng, Inhibition of autophagy and enhancement of endoplasmic reticulum stress increase sensitivity of osteosarcoma Saos-2 cells to cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2, *Cell Biochem Funct*, 34 (2016) 351-358.

- [113] A. S. Figueiredo, H. J. García-Crescioni, S. C. Bulla, M. K. Ross, C. McIntosh, K. Lunsford and C. Bulla, Suppression of vascular endothelial growth factor expression by cannabinoids in a canine osteosarcoma cell line, *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 4 (2013) 31-34.
- [114] S. S. Hsu, C. J. Huang, H. H. Cheng, C. T. Chou, H. Y. Lee, J. L. Wang, I. S. Chen, S. I. Liu, Y. C. Lu, H. T. Chang, J. K. Huang, J. S. Chen and C. R. Jan, Anandamide-induced  $\text{Ca}^{2+}$  elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells, *Toxicology*, 231 (2007) 21-29.
- [115] S. Marino, D. de Ridder, R. T. Bishop, N. Renema, M. Ponzetti, A. Sophocleous, M. Capulli, A. Aljeffery, G. Carrasco, M. D. Gens, A. Khogeer, S. H. Ralston, J. Gertsch, F. Lamoureux, D. Heymann, N. Rucci and A. I. Idris, Paradoxical effects of JZL184, an inhibitor of monoacylglycerol lipase, on bone remodelling in healthy and cancer-bearing mice, *EBioMedicine*, 44 (2019) 452-466.
- [116] S. Marino, G. Carrasco, B. Li, K. M. Shah, D. L. Lath, A. Sophocleous, M. A. Lawson and A. I. Idris, JZL184, A Monoacylglycerol Lipase Inhibitor, Induces Bone Loss in a Multiple Myeloma Model of Immunocompetent Mice, *Calcif Tissue Int*, 107 (2020) 72-85.
- [117] L. Yang, F.-F. Li, Y.-C. Han, B. Jia and Y. Ding, Cannabinoid receptor CB2 is involved in tetrahydrocannabinol-induced anti-inflammation against lipopolysaccharide in MG-63 cells, *Mediators of inflammation*, 2015 (2015).
- [118] J. Roy, J. E. Watson, I. S. Hong, T. M. Fan and A. Das, Antitumorigenic properties of omega-3 endocannabinoid epoxides, *Journal of medicinal chemistry*, 61 (2018) 5569-5579.
- [119] N. Pourkhalili, M. H. Ghahremani, N. Farsandaj, S. Tavajohi, M. Majdzadeh, M. Parsa, N. J. Lavasani and S. N. Ostad, Evaluation of anti-invasion effect of cannabinoids on human hepatocarcinoma cells, *Toxicology mechanisms and methods*, 23 (2013) 120-126.
- [120] E. Bilgic, E. Guzel, S. Kose, M. C. Aydin, E. Karaismailoglu, I. Akar, A. Usubutun and P. Korkusuz, Endocannabinoids modulate apoptosis in endometriosis and adenomyosis, *Acta histochemica*, 119 (2017) 523-532.
- [121] A. Notaro, S. Emanuele, F. Geraci, A. D'Anneo, M. Lauricella, G. Calvaruso and M. Giuliano, WIN55,212-2-Induced Expression of Mir-29b1 Favours the Suppression of Osteosarcoma Cell Migration in a SPARC-Independent Manner, *Int J Mol Sci*, 20 (2019).
- [122] X. Guo, X. Wei, Z. Chen, X. Zhang, G. Yang and S. Zhou, Multifunctional nanoplatfroms for subcellular delivery of drugs in cancer therapy, *Progress in Materials Science*, 107 (2020) 100599.
- [123] R. S. Kadam, D. W. Bourne and U. B. Kompella, Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: contribution of reduced clearance, *Drug Metabolism and Disposition*, 40 (2012) 1380-1388.
- [124] A. A. Yetisgin, S. Cetinel, M. Zuvun, A. Kosar and O. Kutlu, Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications, *Molecules*, 25 (2020) 2193.
- [125] K. Shimbo, S. Miyaki, H. Ishitobi, Y. Kato, T. Kubo, S. Shimose and M. Ochi, Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration, *Biochem Biophys Res Commun*, 445 (2014) 381-387.

- [126] S. Ohno, M. Takanashi, K. Sudo, S. Ueda, A. Ishikawa, N. Matsuyama, K. Fujita, T. Mizutani, T. Ohgi, T. Ochiya, N. Gotoh and M. Kuroda, Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells, *Mol Ther*, 21 (2013) 185-191.
- [127] K. O'Brien, M. C. Lowry, C. Corcoran, V. G. Martinez, M. Daly, S. Rani, W. M. Gallagher, M. W. Radomski, R. A. MacLeod and L. O'Driscoll, miR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity, *Oncotarget*, 6 (2015) 32774-32789.
- [128] N. Bovy, B. Blomme, P. Frères, S. Dederen, O. Nivelles, M. Lion, O. Carnet, J. A. Martial, A. Noël, M. Thiry, G. Jérusalem, C. Josse, V. Bours, S. P. Tabruyn and I. Struman, Endothelial exosomes contribute to the antitumor response during breast cancer neoadjuvant chemotherapy via microRNA transfer, *Oncotarget*, 6 (2015) 10253-10266.
- [129] S. Rayamajhi, T. D. T. Nguyen, R. Marasini and S. Aryal, Macrophage-derived exosome-mimetic hybrid vesicles for tumor targeted drug delivery, *Acta Biomater*, 94 (2019) 482-494.
- [130] V. Maravajhala, N. Dasari, A. Sepuri and S. Joginapalli, Design and evaluation of niacin microspheres, *Indian J Pharm Sci*, 71 (2009) 663-669.
- [131] M. O. Bradley, N. L. Webb, F. H. Anthony, P. Devanesan, P. A. Witman, S. Hemamalini, M. C. Chander, S. D. Baker, L. He, S. B. Horwitz and C. S. Swindell, Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel, *Clin Cancer Res*, 7 (2001) 3229-3238.
- [132] A. Radwan and F. Alanazi, Targeting cancer using cholesterol conjugates, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22 (2014) 3-16.
- [133] A. A. Radwan and F. K. Alanazi, Design and synthesis of new cholesterol-conjugated 5-Fluorouracil: a novel potential delivery system for cancer treatment, *Molecules*, 19 (2014) 13177-13187.
- [134] L. Hao, J. Luan, D. Zhang, C. Li, H. Guo, L. Qi, X. Liu, T. Li and Q. Zhang, Research on the in vitro anticancer activity and in vivo tissue distribution of Amoitone B nanocrystals, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 117 (2014) 258-266.
- [135] R. Zhao, C. P. Hollis, H. Zhang, L. Sun, R. A. Gemeinhart and T. Li, Hybrid nanocrystals: achieving concurrent therapeutic and bioimaging functionalities toward solid tumors, *Molecular Pharmaceutics*, 8 (2011) 1985-1991.
- [136] B. Huang, W. D. Abraham, Y. Zheng, S. C. Bustamante López, S. S. Luo and D. J. Irvine, Active targeting of chemotherapy to disseminated tumors using nanoparticle-carrying T cells, *Sci Transl Med*, 7 (2015) 291ra294.
- [137] B. Shen, Y. Ma, S. Yu and C. Ji, Smart Multifunctional Magnetic Nanoparticle-Based Drug Delivery System for Cancer Thermo-Chemotherapy and Intracellular Imaging, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8 (2016) 24502-24508.
- [138] A. Quintana, E. Raczka, L. Piehler, I. Lee, A. Myc, I. Majoros, A. K. Patri, T. Thomas, J. Mulé and J. R. Baker, Jr., Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor, *Pharm Res*, 19 (2002) 1310-1316.
- [139] J. R. Baker, Jr., Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, (2009) 708-719.

- [140] Y. Cheng, L. Zhao, Y. Li and T. Xu, Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives, *Chem Soc Rev*, 40 (2011) 2673-2703.
- [141] C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos, G. Storm, J. F. Nijsen and W. E. Hennink, Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release, *Pharm Res*, 27 (2010) 2569-2589.
- [142] X. Zhang, Y. Huang and S. Li, Nanomicellar carriers for targeted delivery of anticancer agents, *Ther Deliv*, 5 (2014) 53-68.
- [143] S. El-Shafie, S. A. Fahmy, L. Ziko, N. Elzahed, T. Shoeib and A. Kakarougkas, Encapsulation of Nedaplatin in Novel PEGylated Liposomes Increases Its Cytotoxicity and Genotoxicity against A549 and U2OS Human Cancer Cells, *Pharmaceutics*, 12 (2020).
- [144] J. Volmajer Valh, Z. Peršin, B. Vončina, K. Vrezner, L. Tušek and L. Fras Zemljič, Microencapsulation of Cannabidiol in Liposomes as Coating for Cellulose for Potential Advanced Sanitary Material, *Coatings*, 11 (2021) 3.
- [145] Ü. Yaman, M. Aslan, S. Ozturk, K. Ulubayram and İ. Eroğlu, Surface modified nanoliposome formulations provide sustained release for 5-FU and increase cytotoxicity on A431 cell line, *Pharm Dev Technol*, 25 (2020) 1192-1203.
- [146] P. Kothamasu, H. Kanumur, N. Ravur, C. Maddu, R. Parasuramrajam and S. Thangavel, Nanocapsules: the weapons for novel drug delivery systems, *Bioimpacts*, 2 (2012) 71-81.
- [147] İ. Eroğlu and M. İbrahim, Liposome–ligand conjugates: a review on the current state of art, *Journal of drug targeting*, 28 (2020) 225-244.
- [148] T. M. Allen and P. R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Adv Drug Deliv Rev*, 65 (2013) 36-48.
- [149] W. Liang, Y. Dong, R. Shao, S. Zhang, X. Wu, X. Huang, B. Sun, B. Zeng and J. Zhao, Application of nanoparticles in drug delivery for the treatment of osteosarcoma: focussing on the liposomes, *J Drug Target*, 30 (2022) 463-475.
- [150] Q. Y. Wei, Y. M. Xu and A. T. Y. Lau, Recent Progress of Nanocarrier-Based Therapy for Solid Malignancies, *Cancers (Basel)*, 12 (2020).
- [151] X.-L. He, L. Yang, Z.-J. Wang, R.-Q. Huang, R.-R. Zhu and L.-M. Cheng, Solid lipid nanoparticles loading with curcumin and dexamethasone to treat major depressive disorder, *Neural regeneration research*, 16 (2021) 537.
- [152] P. S. Taskar, A. Patil, P. Lakhani, E. Ashour, W. Gul, M. A. ElSohly, B. Murphy and S. Majumdar,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol derivative-loaded nanoformulation lowers intraocular pressure in normotensive rabbits, *Translational vision science & technology*, 8 (2019) 15-15.
- [153] B. Ozpolat, A. K. Sood and G. Lopez-Berestein, Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy, *Advanced drug delivery reviews*, 66 (2014) 110-116.
- [154] İ. Eroğlu, E. Azizoğlu, M. Özyazıcı, M. Nenni, H. Gürer Orhan, S. Özbal, I. Tekmen, İ. Ertam, İ. Ünal and Ö. Özer, Effective topical delivery systems for corticosteroids: dermatological and histological evaluations, *Drug Deliv*, 23 (2016) 1502-1513.

- [155] H. He, Y. Lu, J. Qi, Q. Zhu, Z. Chen and W. Wu, Adapting liposomes for oral drug delivery, *Acta Pharm Sin B*, 9 (2019) 36-48.
- [156] M. Li, C. Du, N. Guo, Y. Teng, X. Meng, H. Sun, S. Li, P. Yu and H. Galons, Composition design and medical application of liposomes, *Eur J Med Chem*, 164 (2019) 640-653.
- [157] E. Beltrán-Gracia, A. López-Camacho, I. Higuera-Ciapara, J. B. Velázquez-Fernández and A. A. Vallejo-Cardona, Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications, *Cancer Nanotechnology*, 10 (2019) 1-40.
- [158] N. Bruni, C. Della Pepa, S. Oliaro-Bosso, E. Pessione, D. Gastaldi and F. Dosio, Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment, *Molecules*, 23 (2018) 2478.
- [159] W. Yan, S. S. Leung and K. K. To, Updates on the use of liposomes for active tumor targeting in cancer therapy, *Nanomedicine*, 15 (2020) 303-318.
- [160] M. R. I. Shishir, N. Karim, V. Gowd, X. Zheng and W. Chen, Liposomal delivery of natural product: A promising approach in health research, *Trends in food science & technology*, 85 (2019) 177-200.
- [161] A. Gonda, N. Zhao, J. V. Shah, H. R. Calvelli, H. Kantamneni, N. L. Francis and V. Ganapathy, Engineering Tumor-Targeting Nanoparticles as Vehicles for Precision Nanomedicine, *Med One*, 4 (2019).
- [162] S. Fumoto and K. Nishida, Co-delivery Systems of Multiple Drugs Using Nanotechnology for Future Cancer Therapy, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 68 (2020) 603-612.
- [163] L. Stuhne-Sekalec and N. Z. Stanacev, Liposomes as cyclosporin A carriers: the influence of ordering of hydrocarbon chains of phosphatidylglycerol liposomes on the association with and topography of cyclosporin A, *J Microencapsul*, 8 (1991) 283-294.
- [164] A. S. Manjappa, K. R. Chaudhari, M. P. Venkataraju, P. Dantuluri, B. Nanda, C. Sidda, K. K. Sawant and R. S. Murthy, Antibody derivatization and conjugation strategies: application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor, *J Control Release*, 150 (2011) 2-22.
- [165] K. Maruyama, O. Ishida, T. Takizawa and K. Moribe, Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes, *Adv Drug Deliv Rev*, 40 (1999) 89-102.
- [166] Y. Zhang, L. Zhang, Y. Hu, K. Jiang, Z. Li, Y. Z. Lin, G. Wei and W. Lu, Cell-permeable NF- $\kappa$ B inhibitor-conjugated liposomes for treatment of glioma, *J Control Release*, 289 (2018) 102-113.
- [167] M. H. Kang, M. J. Park, H. J. Yoo, K. Y. hyuk, S. G. Lee, S. R. Kim, D. W. Yeom, M. J. Kang and Y. W. Choi, RIPL peptide (IPLVVPLRRRRRRRRC)-conjugated liposomes for enhanced intracellular drug delivery to hepsin-expressing cancer cells, *Eur J Pharm Biopharm*, 87 (2014) 489-499.
- [168] S. S. Kwon, S. Y. Kim, B. J. Kong, K. J. Kim, G. Y. Noh, N. R. Im, J. W. Lim, J. H. Ha, J. Kim and S. N. Park, Cell penetrating peptide conjugated liposomes as transdermal delivery system of *Polygonum aviculare* L. extract, *Int J Pharm*, 483 (2015) 26-37.
- [169] S. A. van der Meulen, G. V. Dubacheva, M. Dogterom, R. P. Richter and M. E. Leunissen, Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring and spectroscopic

ellipsometry measurements of the phospholipid bilayer anchoring stability and kinetics of hydrophobically modified DNA oligonucleotides, *Langmuir*, 30 (2014) 6525-6533.

[170] S. Cogoi, U. Jakobsen, E. B. Pedersen, S. Vogel and L. E. Xodo, Lipid-modified G4-decoy oligonucleotide anchored to nanoparticles: delivery and bioactivity in pancreatic cancer cells, *Sci Rep*, 6 (2016) 38468.

[171] H. W. Yeh, T. S. Lin, H. W. Wang, H. W. Cheng, D. Z. Liu and P. H. Liang, S-Linked sialyloligosaccharides bearing liposomes and micelles as influenza virus inhibitors, *Org Biomol Chem*, 13 (2015) 11518-11528.

[172] K. C. Weng, C. O. Noble, B. Papahadjopoulos-Sternberg, F. F. Chen, D. C. Drummond, D. B. Kirpotin, D. Wang, Y. K. Hom, B. Hann and J. W. Park, Targeted tumor cell internalization and imaging of multifunctional quantum dot-conjugated immunoliposomes in vitro and in vivo, *Nano Lett*, 8 (2008) 2851-2857.

[173] A. C. Anselmo and S. Mitragotri, Nanoparticles in the clinic, *Bioeng Transl Med*, 1 (2016) 10-29.

[174] K. Ando, K. Mori, N. Corradini, F. Redini and D. Heymann, Mifamurtide for the treatment of nonmetastatic osteosarcoma, *Expert opinion on pharmacotherapy*, 12 (2011) 285-292.

[175] S. P. O. Consortium, Phase 1 Dose-escalating Study of MM-398 (Irinotecan Sucrosfate Liposome Injection) Plus Intravenous Cyclophosphamide in Recurrent or Refractory Pediatric Solid Tumors, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02013336?term=liposome&cond=Osteosarcoma&draw=2&rank=4>, 2022.

[176] C. s. N. R. Institute, A Pilot Study of Lyso-thermosensitive Liposomal Doxorubicin (LTLD, ThermoDox®) and Magnetic Resonance-Guided High Intensity Focused Ultrasound (MR-HIFU) for Treatment of Relapsed or Refractory Solid Tumors, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04791228?term=liposome&cond=Osteosarcoma&draw=3&rank=14>, 2022.

[177] C. C. C. Center, Disulfiram With Copper Gluconate and Liposomal Doxorubicin in Patients With Treatment-Refractory Sarcomas, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05210374?term=liposome&cond=Osteosarcoma&draw=2&rank=9>, 2022.

[178] M. Durán-Lobato, L. Martín-Banderas, R. Lopes, L. M. Gonçalves, M. Fernández-Arévalo and A. J. Almeida, Lipid nanoparticles as an emerging platform for cannabinoid delivery: physicochemical optimization and biocompatibility, *Drug Dev Ind Pharm*, 42 (2016) 190-198.

[179] E. Esposito, L. Ravani, M. Drechsler, P. Mariani, C. Contado, J. Ruokolainen, P. Ratano, P. Campolongo, V. Trezza, C. Nastruzzi and R. Cortesi, Cannabinoid antagonist in nanostructured lipid carriers (NLCs): design, characterization and in vivo study, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 48 (2015) 328-336.

[180] E. Esposito, M. Drechsler, R. Cortesi and C. Nastruzzi, Encapsulation of cannabinoid drugs in nanostructured lipid carriers, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 102 (2016) 87-91.

[181] M. Shin, H. W. Snyder, G. Donvito, L. D. Schurman, T. E. Fox, A. H. Lichtman, M. Kester and K.-L. Hsu, Liposomal delivery of diacylglycerol lipase-beta inhibitors to

macrophages dramatically enhances selectivity and efficacy in vivo, *Molecular pharmaceutics*, 15 (2017) 721-728.

[182] M. Kaczocha, Q. Lin, L. D. Nelson, M. K. McKinney, B. F. Cravatt, E. London and D. G. Deutsch, Anandamide externally added to lipid vesicles containing-trapped fatty acid amide hydrolase (FAAH) is readily hydrolyzed in a sterol-modulated fashion, *ACS chemical neuroscience*, 3 (2012) 364-368.

[183] A. P. Matarazzo, L. M. S. Elisei, F. C. Carvalho, R. Bonfílio, A. L. M. Ruela, G. Galdino and G. R. Pereira, Mucoadhesive nanostructured lipid carriers as a cannabidiol nasal delivery system for the treatment of neuropathic pain, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 159 (2021) 105698.

[184] X. He, Y. Zhu, M. Wang, G. Jing, R. Zhu and S. Wang, Antidepressant effects of curcumin and HU-211 coencapsulated solid lipid nanoparticles against corticosterone-induced cellular and animal models of major depression, *Int J Nanomedicine*, 11 (2016) 4975-4990.

[185] F. Rossi, C. Tortora, F. Punzo, G. Bellini, M. Argenziano, A. Di Paola, M. Torella and S. Perrotta, The Endocannabinoid/Endovanilloid System in Bone: From Osteoporosis to Osteosarcoma, *International journal of molecular sciences*, 20 (2019) 1919.

[186] Ö. Boyacıoğlu, E. Bilgiç, C. Varan, E. Bilensoy, E. Nemutlu, D. Sevim, Ç. Kocaefe and P. Korkusuz, ACPA decreases non-small cell lung cancer line growth through Akt/PI3K and JNK pathways in vitro, *Cell death & disease*, 12 (2021) 1-14.

[187] C. Y. Ting, N. Azmi, M. Makmor-Bakry and A. Shamsuddin, Optimized RNA extraction for detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients during treatment, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (2014) 415-418.

[188] A. Eslahi, M. Atigh, A. Tabatabaee, N. Hosseini and M. Mojarad, microRNA-124 overexpression is associated with lymph node metastasis in breast cancer, *Journal of Cellular Immunotherapy*, 1 (2015) 35-36.

[189] M.-J. Choi, G.-D. Kim, J.-M. Kim and H. K. Lim, Differentially-Expressed Genes Associated with Faster Growth of the Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*, *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (2015) 27520-27534.

[190] M. P. Stevens, S. M. Garland and S. N. Tabrizi, Development and validation of a real-time PCR assay specifically detecting human papillomavirus 52 using the Roche LightCycler® 480 system, *Journal of Virological Methods*, 147 (2008) 290-296.

[191] R. Molenkamp, A. van der Ham, J. Schinkel and M. Beld, Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: Application in viral molecular diagnostics, *Journal of virological methods*, 141 (2007) 205-211.

[192] I. Rodríguez-Rodríguez, J. Kalafut, A. Czerwonka and A. Rivero-Müller, A novel bioassay for quantification of surface Cannabinoid receptor 1 expression, *Sci Rep*, 10 (2020) 18191.

[193] M. Agudelo, A. Yndart, M. Morrison, G. Figueroa, K. Muñoz, T. Samikkannu and M. P. Nair, Differential expression and functional role of cannabinoid genes in alcohol users, *Drug Alcohol Depend*, 133 (2013) 789-793.

[194] F. Garofano and I. G. H. Schmidt-Wolf, High Expression of Cannabinoid Receptor 2 on Cytokine-Induced Killer Cells and Multiple Myeloma Cells, *Int J Mol Sci*, 21 (2020).

- [195] N. Farsandaj, M. H. Ghahremani and S. N. Ostad, Role of cannabinoid and vanilloid receptors in invasion of human breast carcinoma cells, *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 31 (2012) 377-387.
- [196] D. Kho, C. MacDonald, R. Johnson, C. P. Unsworth, #039, S. J. Carroll, E. D. Mez, C. E. Angel and E. S. Graham, Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time, *Biosensors*, 5 (2015) 199-222.
- [197] H. Hamidi, J. Lilja and J. Ivaska, Using xCELLigence RTCA instrument to measure cell adhesion, *Bio-protocol*, 7 (2017).
- [198] J. Muñoz-Garcia, M. Mazza, C. Alliot, C. Siquin, S. Collic-Jouault, D. Heymann and S. Huclier-Markai, Antiproliferative Properties of Scandium Exopolysaccharide Complexes on Several Cancer Cell Lines, *Mar Drugs*, 19 (2021).
- [199] K. S. Dossou, K. P. Devkota, P. V. Kavanagh, J. A. Beutler, J. M. Egan and R. Moaddel, Development and preliminary validation of a plate-based CB1/CB2 receptor functional assay, *Anal Biochem*, 437 (2013) 138-143.
- [200] Y. Yang, R. Vyawahare, M. Lewis-Bakker, H. A. Clarke, A. H. C. Wong and L. P. Kotra, Bioactive Chemical Composition of Cannabis Extracts and Cannabinoid Receptors, *Molecules*, 25 (2020).
- [201] D. Roberto, L. Klotz and V. Venkateswaran, Cannabinoid WIN 55,212-2 induces cell cycle arrest and apoptosis, and inhibits proliferation, migration, invasion, and tumor growth in prostate cancer in a cannabinoid-receptor 2 dependent manner, *The Prostate*, 79 (2018).
- [202] F. Hosami, A. Manayi, V. Salimi, F. Khodakhah, M. Nourbakhsh, B. Nakstad and M. Tavakoli-Yaraki, The pro-apoptosis effects of Echinacea purpurea and Cannabis sativa extracts in human lung cancer cells through caspase-dependent pathway, *BMC Complement Med Ther*, 21 (2021) 37.
- [203] L. Tang, J.-n. Cheng, Y. Long, X.-m. He, G.-n. Liang, X.-p. Tang, C.-x. Jiang and F. Chen, PCB 118-induced endothelial cell apoptosis is partially mediated by excessive ROS production, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27 (2017) 394-399.
- [204] H. Lujan, W. C. Griffin, J. H. Taube and C. M. Sayes, Synthesis and characterization of nanometer-sized liposomes for encapsulation and microRNA transfer to breast cancer cells, *Int J Nanomedicine*, 14 (2019) 5159-5173.
- [205] A. A. Aytekin, S. Tuncay Tanrıverdi, F. Aydın Köse, D. Kart, İ. Eroğlu and Ö. Özer, Propolis loaded liposomes: evaluation of antimicrobial and antioxidant activities, *Journal of liposome research*, 30 (2020) 107-116.
- [206] J. T. Castaneda, A. Harui, S. M. Kiertscher, J. D. Roth and M. D. Roth, Differential expression of intracellular and extracellular CB2 cannabinoid receptor protein by human peripheral blood leukocytes, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8 (2013) 323-332.
- [207] J. T. Castaneda, A. Harui and M. D. Roth, Regulation of Cell Surface CB(2) Receptor during Human B Cell Activation and Differentiation, *J Neuroimmune Pharmacol*, 12 (2017) 544-554.
- [208] G. C. Brailoiu, T. I. Oprea, P. Zhao, M. E. Abood and E. Brailoiu, Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 29166-29174.

- [209] R. Rozenfeld, Type I cannabinoid receptor trafficking: all roads lead to lysosome, *Traffic*, 12 (2011) 12-18.
- [210] K. Iffland and F. Grotenhermen, An update on safety and side effects of cannabidiol: a review of clinical data and relevant animal studies, *Cannabis and cannabinoid research*, 2 (2017) 139-154.
- [211] M. M. Bergamaschi, R. H. Queiroz, A. W. Zuardi and J. A. Crippa, Safety and side effects of cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, *Curr Drug Saf*, 6 (2011) 237-249.
- [212] V. Feinshtein, O. Erez, Z. Ben-Zvi, T. Eshkoli, B. Sheizaf, E. Sheiner and G. Holcberg, Cannabidiol enhances xenobiotic permeability through the human placental barrier by direct inhibition of breast cancer resistance protein: an ex vivo study, *Am J Obstet Gynecol*, 209 (2013) 573.e571-573.e515.
- [213] D.-F. Wu, A. Goschke, R. Stumm, L.-O. Brandenburg, Y.-J. Liang, V. Höllt and T. Koch, Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors, *Journal of neurochemistry*, 104 (2008) 1132-1143.
- [214] J. W. George, C. D. Skaggs, P. A. Thompson, D. M. Nelson, J. A. Gavard and G. A. Gross, A randomized controlled trial comparing a multimodal intervention and standard obstetrics care for low back and pelvic pain in pregnancy, *Am J Obstet Gynecol*, 208 (2013) 295.e291-297.
- [215] I. Rodríguez-Rodríguez, J. Kalafut, A. Czerwonka and A. Rivero-Müller, A novel bioassay for quantification of surface Cannabinoid receptor 1 expression, *Sci Rep*, 10 (2020) 1-9.
- [216] M. Hashemi, S. Bashi and A. Zali, The expression level of cannabinoid receptors type 1 and 2 in the different types of astrocytomas, *Mol Biol Rep*, 47 (2020) 5461-5467.
- [217] J. Morin-Buote, K. Ennour-Idrissi, É. Poirier, J. Lemieux, D. Furrer, A. Burguin, F. Durocher and C. Diorio, Association of Breast Tumour Expression of Cannabinoid Receptors CBR1 and CBR2 with Prognostic Factors and Survival in Breast Cancer Patients, *J Pers Med*, 11 (2021).
- [218] G. A. Rácz, N. Nagy, J. Tóvári, Á. Apáti and B. G. Vértessy, Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines, *Sci Rep*, 11 (2021) 19459.
- [219] S. Lemma, S. Avnet, M. Salerno, T. Chano and N. Baldini, Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells, *PLoS One*, 11 (2016) e0149481.
- [220] U. Yaman, İntratümöral Uygulamaya Yönelik Nanolipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi, Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara, 2019.
- [221] G. Sayıt, S. T. Tanrıverdi, Ö. Özer and E. Özdoğan, Preparation of allantoin loaded liposome formulations and application for cosmetic textile production, *The Journal of The Textile Institute*, (2021) 1-12.
- [222] E. H. Gökçe, E. A. Yapar, S. T. Tanrıverdi and Ö. Özer, Nanocarriers in cosmetology, *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*, Elsevier 2016, pp. 363-393.
- [223] F. Haghirsadat, G. Amoabediny, M. H. Sheikhha, T. Forouzanfar, M. N. Helder and B. Zandieh-Doulabi, A novel approach on drug delivery: investigation of a new nano-

formulation of liposomal doxorubicin and biological evaluation of entrapped doxorubicin on various osteosarcoma cell lines, Cell Journal (Yakhteh), 19 (2017) 55.

