T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALTIN NANOPARÇACIĞA KONJUGE EDİLMİŞ HEDEFLENMİŞ İLAÇ TAŞIMA SİSTEMİNİN GEMSİTABİNE DİRENÇLİ ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDAKİ ANTİKANSER ETKİSİNİN FENOTİPİK PROFİLLEME YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

EBRAL AKGÜN

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ GAMZE YEŞİLAY

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TEMMUZ/2024

İTHAF

"Bu tezi hayatımdaki en büyük destekçim ve yol göstericim olan sevgili annem Filiz AKGÜN'e, hayallerimin peşinden giderken aldığım tüm kararların arkasında durarak beni cesaretlendiren sevgili babam Mustafa AKGÜN'e ve neşe kaynağım sevgili kardeşim Görkem AKGÜN'e ithaf ediyorum"

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yepyeni bir dünyanın kapılarını açarak görünenin altında çok daha büyük bir yer olduğunu anlamamı sağlayan, engin bilgisini ve deneyimini benden esirgemeyen, bitmek bilmeyen sorularıma sabırla cevap veren, desteğini her zaman hissettiren, hayata bakışı ve çalışma disiplini ile bana ilham veren saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gamze YEŞİLAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim sürecimde bilgi birikimi ve tecrübesiyle gelişimime katkı sağlayan çok değerli Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Büşra BOLAT'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu yolculuğumu anlamlı ve eğlenceli hale getiren, zor zamanlarımda beni motive eden, yardımlarını esirgemeyen, kalbimde özel bir yer edinen sevgili çalışma arkadaşlarım Züleyha DEMİRCİ, Şuranur AYVAZ, Zeynep KILINÇ ve Gülizar HOCAOĞLU'na ayrıca teşekkür etmek istiyorum. Bu iki yıllık süreçte birçok anı biriktirdik. Paylaştığımız her an, benim için unutulmaz bir deneyim olarak kalacak.

Tüm zorluklara benimle birlikte göğüs geren, her koşulda yanımda olduğunu hissettiren, en büyük motivasyon kaynağım Erdem CANCI'ya bu yoğun ve zorlu yolculukta bana yol arkadaşı olduğu için çok teşekkür ederim.

Ve en büyük teşekkür kıymetli aileme. Hayatımın her anında koşulsuz sevgisi ve ilgisi ile beni sarıp sarmalayan, hayallerimin peşinden gittiğim bu yolda bana en büyük desteği sağlayan, her adımımda yanımda olduğunu bildiğim, yoluma ışık olan, her düştüğümde elimden tutup kaldıran, her başarısızlığımda tekrar denemem için cesaret veren, birçok fedakârlık yaparak bugünlere gelmemi sağlayan biricik annem Filiz AKGÜN, canım babam Mustafa AKGÜN ve can parçam sevgili kardeşim Görkem AKGÜN'e çok teşekkür ederim. Sizin bana olan inancınız, benim için en büyük hazine. Bu süreçte bana verdiğiniz destek ve gösterdiğiniz sonsuz inanç için size minnettarım.

Son olarak, bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 122S737). Ayrıca, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında sağlanan maddi katkılar için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. MEME KANSERİ 2
2.1.1. Meme Kanseri Hakkında Genel Bilgiler 2
2.2. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ 3
2.2.1. Üçlü Negatif Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri 5
2.2.2. Üçlü Negatif Meme Kanserinde Gemsitabin Tedavisi 6
2.2.3. Üçlü Negatif Meme Kanserinde Gemsitabin Direncini Kırmak İçin Kullanılan İkincil İlaç Tedavileri 8
2.2.3.1. Daktolisib 9
2.3. NANOPARÇACIK TABANLI İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ 11
2.3.1. İlaç Taşıma Sisteminde Kullanılan Nanomalzemeler 12
2.3.1.1. Lipozomlar 12
2.3.1.2. Dendrimerler 12
2.3.1.3. Polimerik nanoparçacıklar 13
2.3.1.5. Karbon nanotüpler 13
2.3.1.6. Metalik nanoparçacıklar 14
2.3.1.7. Altın nanoparçacıklar 15
2.4. HEDEFE YÖNELİK NANO-İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ 16
2.4.1. Pasif Hedefleme Temelli İlaç Taşıma Sistemleri 16
2.4.2. Aktif Hedefleme Temelli İlaç Taşıma Sistemleri 16
2.4.2.1. Folik asit reseptörü hedefleme 17
2.5. NANOPARÇACIK YÜZEY İŞLEVSELLEŞTİRME YÖNTEMLERİ 18
2.5.1. Doğrudan Konjugasyon Yöntemleri 18
2.5.1.1. Kovalent olmayan doğrudan konjugasyon yöntemleri 18
2.5.1.2. Kovalent doğrudan konjugasyon yöntemleri 18
2.5.2. Bağlayıcı Moleküller ile Gerçekleştirilen Konjugasyon İşlemleri 18

2.5.2.1. Polietilen glikol zincirleri 19
2.5.3. Klik Kimya Tepkimeleri 20
2.5.3.1. Bakır (I) katalizörlü azid alkin siklokatılma tepkimesi 21
3. GEREÇ VE YÖNTEM 22
3.1. GEREÇ 22
3.2. YÖNTEM 24
3.2.1. Altın Nanoparçacık Sentezi 24
3.2.2. Altın Nanoparçacık Yüzey İşlevselleştirmesi 25
3.2.2.1. Klik kimyası 27
3.2.3. Çıplak ve İşlevselleştirilmiş Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu 28
3.2.4. Stabilite Testleri 30
3.2.5. Hücre Kültürü 31
3.2.5.1. Hücrelerin işlevselleştirilmiş altın nanoparçacık ile muamele edilmesi ve hücre boyama deneyi 32
4. BULGULAR 33
4.1. ÇIPLAK ALTIN NANOPARÇACIKLARIN KARAKTERİZASYONU 33
4.2. YÜZEYİ İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ ALTIN NANOPARÇACIKLARIN KARAKTERİZASYONU 34
4.2.1. Klik Kimya Sonrasında Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu 38
4.3. STABİLİTE TESTLERİ 46
4.4. HÜCRE BOYAMA DENEYİ 51
5. TARTIŞMA 54
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 63
KAYNAKLAR 64

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Meme kanserinin moleküler alt tiplerinde ifade edilen reseptörler 3

Tablo 2.2: Klinikte kullanılan kemoterapi ilaç grupları ve etki mekanizmaları 6

Tablo 3.1: Altın nanoparçacık sentezi ve yüzey işlevselleştirmesi için kullanılan kimyasallar 22

Tablo 3.2: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar 23

Tablo 3.3: Karakterizasyon ve hücre kültürü deneyleri için kullanılan cihazlar 23

Tablo 3.4: Klik kimya tepkimesinde kullanılan çözelti miktarları 28

Tablo 3.5: N_3-PEG-SH derişimine bağlı olarak tepkime ortamına eklenen daktolisib miktarı 28

Tablo 4.1: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektrumlarında yer alan bantların frekans tanımları 42

Tablo 4.2: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin Raman spektrumlarında yer alan bantların frekans tanımları 44

Tablo 4.3: Altın nanoparçacık başına düşen PEG zincir ve daktolisib miktarı 45

Tablo 4.4: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin SPR tepe noktalarında ortam pH'ına bağlı gözlemlenen değişimler 50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Üçlü negatif meme kanseri gelişiminde rol alan sinyal yolakları 4

Şekil 2.2: Deoksisitidin ve gemsitabinin moleküler yapısı 7

Şekil 2.3: Daktolisibin kimyasal yapısı 9

Şekil 2.4: Folik asitin kimyasal yapısı 17

Şekil 2.5: Polietilen glikol zincirlerinin fırça ve mantar konformasyonu 20

Şekil 2.6: Bakır (I) katalizörlüğünde Huisgen azid-alkin siklokatılma klik kimya tepkimesi 21

Şekil 3.1: Altın nanoparçacık sentezinin şematik özeti 25

Şekil 3.2: Yüzey işlevselleştirmesi ile FA-N_3-AuNP ve PEG-N_3-AuNP üretiminin şematik özeti 26

Şekil 3.3: Klik kimyası ile FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP üretiminin şematik özeti 27

Şekil 4.1: Sentezlenen altın nanoparçacıkların (A) boyut dağılım grafiği ve (B) Atomik Kuvvet Mikroskop görüntüsü 33

Şekil 4.2: Çıplak altın nanoparçacıkların absorbans grafiği 34

Şekil 4.3: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen çıplak altın nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği 35

Şekil 4.4: Farklı derişimlerdeki FA-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen çıplak altın nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği 35

Şekil 4.5: Farklı derişimlerdeki PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen çıplak altın nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği 36

Şekil 4.6: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen FA-N_3-AuNP'lerin boyut dağılım grafiği 37

Şekil 4.7: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen PEG-N_3-AuNP'lerin boyut dağılım grafiği 37

Şekil 4.8: FA-N_3- AuNP ve PEG-N_3- AuNP'lerin absorbans grafiği 38

Şekil 4.9: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin boyut dağılım grafiği 39

Şekil 4.10: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen BEZ@PEG-AuNP'lerin boyut dağılım grafiği 39

Şekil 4.11: (A) FA-N_3-AuNP ve (B) FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin Atomik Kuvvet Mikroskop görüntüleri 40

Şekil 4.12: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin absorbans grafiği 40

Şekil 4.13: N_3-AuNP ve FA-N_3-AuNP'lerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektrumları 41

Şekil 4.14: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektrumları 42

Şekil 4.15: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin Raman spektrumları 43

Şekil 4.16: Sırasıyla (A) 1 nM N_3-PEG-SH, (B) 150 nM N_3-PEG-SH ve (C) 300 nM N_3-PEG-SH içeren FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin Termogravimetrik Analiz grafiği 45

Şekil 4.17: FA/BEZ@PEG-AuNP, BEZ@PEG-AuNP ve çıplak altın nanoparçacıkların 24 saatlik liyofilizasyon stabilite testi 46

Şekil 4.18: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin 24 saatlik liyofilizasyon sonrası boyut dağılım grafiği 47

Şekil 4.19: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin 24 saatlik liyofilizasyon sonrası absorbans grafiği 47

Şekil 4.20: Otoklav sterilizasyonu sonrasında (A) FA/BEZ@PEG-AuNP ve (B) BEZ@PEG-AuNP'ler 48

Şekil 4.21: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP ile ortam pH'ına bağlı olarak gerçekleştirilen (A) 10 dakika, (B) 30 dakika, (C) 1 saat, (D) 2 saat ve (E) 24 saatlik stabilite testi 49

Şekil 4.22: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin 24 saatlik tuz derişimine bağlı stabilite testi 50

Şekil 4.23: MDA-MB-231^{GEM} hücre hattında artan FA/BEZ@PEG-AuNP, BEZ@PEG-AuNP, çıplak altın nanoparçacık ve daktolisib derişimine bağlı olarak PI boyasından hücre başına alınan sinyal yoğunluğu grafiği 51

Şekil 4.24: Farklı derişimlerde FA/BEZ@PEG-AuNP ile 72 saat muamele edilen MDA-MB-231^{GEM} hücre hattına ait görüntüler.....52

Şekil 4.25: Farklı derişimlerde BEZ@PEG-AuNP ile 72 saat muamele edilen MDA-MB-231^{GEM} hücre hattına ait görüntüler.....53

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFM : Atomik Kuvvet Mikroskobu

AuNP : Altın Nanoparçacık

CuAAC : Bakır (I) Katalizörlü Azid-Alkin Siklokatılma Tepkimesi

DAPI : 4',6-diamidino-2-fenilindol hidroklorür

dCDA : Deoksisitidin Deaminaz

dCK : Deoksisitidin Kinaz

dFdC : 2',2'-diflorodeoksistidin

dFdCDF : Gemsitabin Difosfat

dFdCTF : Gemsitabin Trifosfat

DLS : Dinamik Işık Saçılımı

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

EPR : Artırılmış Geçirgenlik ve Tutma

FBS : Fetal Sığır Serumu

FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi

hCNT : Sodyum-Bağımlı Konsantre Edici Nükleozid Taşıyıcılar

hENT : Sodyum-Bağımsız Dengeleyici Nükleozid Taşıyıcılar

JAK/STAT : Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücü Transkripsiyon Aktivatör

LSPR : Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı

MAPK : Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz

NF- κB : Nükleer Faktör Kappa B

NIR : Yakın Kızılötesi

NM : Nanomalzemeler

NP **:** Nanoparçacık

PBS **:** Fosfat Tamponlu Salin

PEG **:** Polietilen Glikol

PI **:** Propidyum İyodür

PTEN **:** Fosfat ve Tensin Homoloğu

RRM **:** Ribonükleotid Redüktazın Katalitik Büyük Alt Birimin

TGA **:** Termogravimetrik Analiz

TGF-β **:** Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta

ÜNMK **:** Üçlü Negatif Meme Kanseri

ALTIN NANOPARÇACIĞA KONJUGE EDİLMİŞ HEDEFLENMİŞ İLAÇ TAŞIMA SİSTEMİNİN GEMSİTABİNE DİRENÇLİ ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDAKİ ANTİKANSER ETKİSİNİN FENOTİPİK PROFİLLEME YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Bu tezde, üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) tedavisinde gemsitabine karşı gelişen ilaç direncinin kırılmasında kullanılmak üzere PI3K/mTOR ikili inhibitörü daktolisib ve folik asit konjugasyonu içeren altın nanoparçacık (AuNP) tabanlı hedefli ilaç taşıma sistemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen sistemin gemsitabine dirençli ÜNMK hücre hattındaki potansiyel antikanser etkisinin fenotipik profilleme yöntemi ile belirlenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Taşıyıcı ajan olarak çıplak AuNP'ler üretilmiş, ilaç yüklemesi ve folik asit konjugasyonu için AuNP yüzeyi polietilen glikol (PEG) zincirleri ile işlevselleştirilmiştir. Daktolisib, klik kimya tepkimesi ile AuNP'lere konjuge edilmiştir. Spektroskopik yöntemler ile karakterize edilen nihai ürünlerin antikanser etkisi, gemsitabin direnci kazandırılmış ÜNMK hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde fenotipik profilleme analizi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Klik kimya tepkimesi ile daktolisibin AuNP yüzeyine başarılı şekilde konjuge edildiği görülmüştür. Fenotipik profilleme analizi, geliştirilen ilaç taşıma sisteminin serbest ilaca oranla hücre canlılığını azalttığını ve hücre ölümünü artırdığını göstermiştir.

Sonuç: Geliştirilen sistemin ve hedefleme ajanının MDA-MB-231 hücre hattında hücre içerisine alımı kolaylaştırdığı, ayrıca hücrelerin hedefleme ajanına ihtiyaç duymadan endositoz yoluyla AuNP alımı yapabildiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Altın Nanoparçacık, Daktolisib, Görüntü Tabanlı Fenotipik Profilleme, Klik Kimya, Üçlü Negatif Meme Kanseri

INVESTIGATION OF THE ANTICANCER EFFECT OF A TARGETED DRUG DELIVERY SYSTEM CONJUGATED TO GOLD NANOPARTICLES ON GEMCITABINE-RESISTANT TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER CELL LINE USING PHENOTYPIC PROFILING

ABSTRACT

Aim: This thesis aims to develop a gold nanoparticle (AuNP)-based targeted drug delivery system, including the PI3K/mTOR dual inhibitor dactolisib and folic acid conjugation, to overcome drug resistance to gemcitabine in the treatment of triple-negative breast cancer (TNBC). The potential anticancer effect of the developed system on gemcitabine-resistant TNBC cell lines will be determined using phenotypic profiling.

Materials and Methods: Bare AuNPs were produced as the carrier agent, and their surfaces were functionalized with polyethylene glycol (PEG) chains for drug loading and folic acid conjugation. Dactolisib was conjugated to AuNPs using a click chemistry reaction. The anticancer effects of the final products, characterized by spectroscopic methods, were evaluated on the gemcitabine-resistant TNBC cell line MDA-MB-231 using phenotypic profiling analysis.

Results: The click chemistry reaction successfully conjugated dactolisib to the AuNP surface. Phenotypic profiling analysis demonstrated that the developed drug delivery system reduced cell viability and increased cell death compared to the free drug.

Conclusion: The developed system and targeting agent facilitated cellular uptake in the MDA-MB-231 cell line. Additionally, cells were able to internalize AuNPs via endocytosis without requiring a targeting agent.

Keywords: Click Chemistry, Dactolisib, Gold Nanoparticle, Image-Based Phenotypic Profiling, Triple-Negative Breast Cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanserinin moleküler alt tiplerinden biri olan üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK), insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2), östrojen (ER), progesteron (PR) reseptörlerinin ifadesini gerçekleştirmemesi ve agresif yapısıyla karakterize edilmektedir. Kemoterapi, ÜNMK'de birincil tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu süreçte sıklıkla tercih edilen kemoterapötik ilaçlardan biri olan gemsitabin, her ne kadar klinikte olumlu sonuçlar oluştursa da bir süre sonra ÜNMK hücrelerinin geliştirdiği direnç mekanizması ile terapötik etkisi kaybolmaktadır. Gelişen direncin kırılması adına kombine ilaç sistemleri geliştirilmiştir. Bu ilaçlardan biri olan Daktolisib (NVP-BEZ235), PI3K/mTOR ikili inhibitörü olup, hücreleri apoptoza teşvik etmektedir. Fakat sulu ortamdaki düşük çözünürlüğü klinikte istenilen etkiyi oluşturamamasına sebep olmaktadır.

Kemoterapötik ilaçların en yaygın yan etkilerinden biri de tümörlü dokunun yanı sıra sağlıklı dokuları da olumsuz etkilemesidir. Bu noktada ilaçların istenilen bölgeye yüksek verimle iletilebilmesi için hedefli ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler arasında altın nanoparçacıklar (AuNP) yüksek biyouyumlulukları ve kolay işlevselleştirilmelerinden dolayı ilgi odağı olmuştur.

Daktolisib ile AuNP tabanlı hedefli ilaç taşıma sisteminin geliştirilmesi ve ÜNMK'de gelişen gemsitabin direncinin kırılması amacıyla planlanan bu tez çalışmasında, daktolisibin klinikteki verimliliğinin artırılması ve sağlıklı hücreler üzerindeki toksik yan etkilerinin en aza indirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için Daktolisib, bakır (Cu) katalizörlüğündeki klik kimya reaksiyonu ile AuNP'lere konjuge edilecek ve hedefleme işleminde ise ÜNMK'de folik asit reseptörünün yüksek ifadesinden dolayı folik asit konjugasyonundan yararlanılacaktır. Oluşan etkinin belirlenmesi içinse görüntü tabanlı fenotipik profilleme kullanılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

2.1.1. Meme Kanseri Hakkında Genel Bilgiler

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 yılı Türkiye'ye ait kanser istatistik verilerine göre meme kanseri, yeni kanser vakalarının %10,3'ünü oluşturarak akciğer kanserinden (%17,6) sonra Türkiye'de en sık görülen ikinci, kadınlar arasında ise %23,9 yeni vaka oranı ile birinci kanser türüdür.

Meme kanseri, hastalar arasında klinik ve patolojik olarak yüksek heterojenite göstermesinin yanı sıra tümör dokuda hücresel düzeyde de oldukça farklı popülasyonları yapısında bulundurmaktadır (1). Bu da meme kanserinde prognozu, klinik olgularının belirlenmesini, uygun tedavi yönteminin seçilmesini zorlaştırmakta, hastaların tedaviye yanıtlarını değiştirmektedir (2).

Günümüzde meme kanserinin moleküler sınıflandırılması yaygın olarak immunohistokimya analizleri ve gen anlatım profillemesi ile gerçekleştirilmektedir (3,4). Bu yöntemler, meme kanserinin moleküler düzeydeki üç temel prognostik biyobelirteci olan insan epidermal büyüme faktör reseptörü 2 (HER2), östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörlerinin anlatım düzeylerini belirlemeyi hedeflemektedir (5).

İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ailesine mensup olan tirozin kinaz reseptörüdür (6). Sağlıklı hücrelerde, ligand-reseptör etkileşimi ile hücre içerisinde fosfatidilinositol 3 kinaz/Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (PI3K/mTOR) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yolaklarının aktive ederek hücre proliferasyonu, adezyonu, farklılaşması, göç ve apoptozunda görev almaktadır. HER2 proteininin aşırı ifadesi hücre döngüsündeki düzenin bozulmasına ve karsinogeneze öncülük etmektedir (7,8). HER2 aşırı ifadesinin başlıca bu onkogende görülen amplifikasyonlar ile gerçekleştiği ve meme kanserinin %20-30'u ile ilişkilendirildiği bilinmektedir (9,10).

Östrojen ve progesteron reseptörleri ise steroid hormon reseptörü olup meme fizyolojisinin oluşmasında ve aynı zamanda artan ifade düzeyi ile meme kanseri gelişiminde önemli bir role sahiptir (11). Sağlıklı meme dokuda az oranda bulunan bu reseptörler, nükleer reseptörler olup ligand- reseptör etkileşimi ile genel olarak transkripsiyon aktivatörleri olarak işlevselleşmiştir (12). Özellikle bu iki reseptörün hücre döngüsü, proliferasyonu ve farklılaşmasını kontrol eden genlerin ifadelerini düzenlendiği ve bu mekanizma üzerinden meme kanseri gelişimini tetiklediği bilinmektedir (11).

Bu reseptörlerin anlatım düzeylerine bakılarak karakterize edilen meme kanseri, Luminal A, Luminal B, HER2 aşırı anlatımı, bazal benzeri ve normal benzeri olmak üzere başlıca beş moleküler alt tipten oluşmaktadır (13–16). Tablo 2.1'de özetlendiği gibi, Luminal A'da ER/PR, Luminal B'de HER2/ER/PR veya ER/PR, HER2 aşırı anlatımda yalnızca HER2 anlatımı, normal ve bazal benzerinde ise bu üç reseptörden hiçbirinin anlatımı yapılmamaktadır (4,15).

Tablo 2.1: Meme kanserinin moleküler alt tiplerinde ifade edilen reseptörler

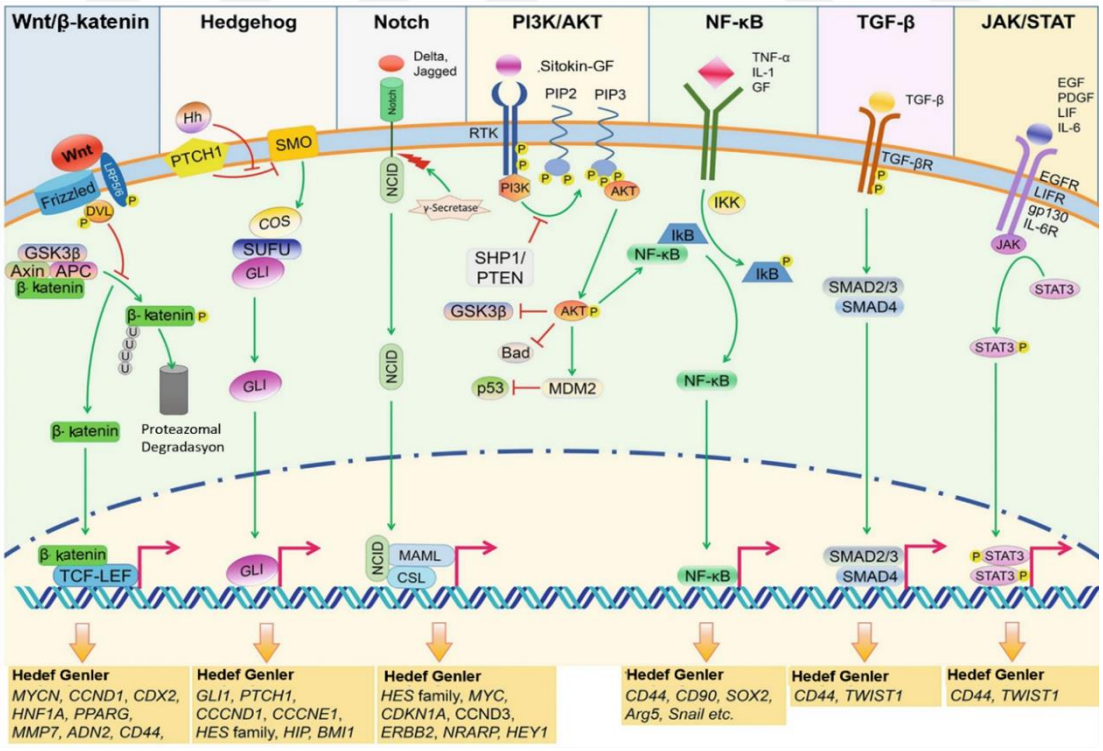
Meme kanseri moleküler alt tipleri	**HER2 ifadesi**	**ER ifadesi**	**PR ifadesi**	**Bazal belirteçler**
Luminal A	-	+	+	-
Luminal B	+/-	+	+	-
HER2 aşırı anlatım	+	-	-	-
Bazal benzeri	-	-	-	+
Normal	-	-	-	-

2.2. ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİ

Yüksek oranda agresif, invaziv ve metastatik özellik gösteren üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK), HER2 anlatımını gerçekleştirememesi, ER ve PR'yi ise oldukça az oranda (<%1) ifade etmesiyle üç reseptör bakımından da negatif olarak karakterize edilmiş olup meme kanserinin yaklaşık %10-30'unu oluşturmaktadır (17,18). Bazal benzeri ile oldukça benzer bir moleküler profil sunması bazen ÜNMK'nin bazal benzeri olarak sınıflandırılmasına sebep olsa da literatürde aslında birbirlerinden farklı oldukları

belirtilmektedir (19). ÜNMK, diğer meme kanseri alt tiplerine oranla çok daha agresif bir ilerleme kaydetmektedir. Tanı almış hastaların %70'inin 5 yıl içerisinde hayatını kaybetmekte, 6 yıllık süre içerisinde hastaların %35'inde başta akciğer olmak üzere beyin ve sinir sistemi, kemik ve karaciğer gibi uzak bölgelere metastaz olduğu bilinmektedir (20–22).

Üçlü negatif meme kanserinin gelişiminde birden fazla sinyal yolağının etkili olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1). Hücre büyümesi, farklılaşması ve hücre-hücre etkileşimlerinde görev alan Notch ve Wnt/β-katenin sinyal yolağı, ÜNMK gelişimini ve aynı zamanda anti-apoptotik genlerin aktivasyonu ile ilaç direncinin oluşmasını tetikleyen nükleer faktör kappa B (NF- κB) sinyal yolağı, ÜNMK'de epitelyal-mezenkimal geçişi düzenleyen ve MAPK, PI3K/mTOR, transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β), Wnt/β-katenin, NF-κB gibi sinyal yolakları tarafından aktive edebilen Hedgehog sinyal yolağı, epitelyal-mezenkimal geçişi kontrol eden TGF-β sinyal yolağı, PI3K/mTOR ve janus kinaz/sinyal dönüştürücü transkripsiyon aktivatör (JAK/STAT) sinyal yolakları örnek verilebilir (23–31).



Şekil 2.1: Üçlü negatif meme kanseri gelişiminde rol alan sinyal yolakları (32)'ten alınarak düzenlenmiştir

Diğer sinyal yolakları gibi hücre büyümesi, apoptozu, migrasyonu gibi çeşitli hücresel aktivitelerin kontrolünü sağlayan PI3K/AKT/mTOR, hücre içi sinyal yolağını temel olarak tirozin kinaz aktivitesi gösteren reseptörlerin ya da EGFR gibi çeşitli büyüme faktörü reseptörlerinin ligandlar ile etkileşime girmesine bağlı olarak PI3K'nin hücre içerisinde aktif forma geçmesiyle sinyal iletimini sağlamaktadır (33). Yapılan çalışmalar PI3K/mTOR sinyal yolağında hiperaktivasyonun PI3K proteinin katalitik alt birimini kodlayan PI3CA geninde görülen mutasyonlar veya gen amplifikasyonları, fosfat ve tensin homoloğu (PTEN) fonksiyon kaybedici mutasyonları veya AKT aktivasyon mutasyonları ile gerçekleşebileceğini göstermiştir (34). PI3CA mutasyonunun en sık hormon reseptörü bakımından pozitif olan meme kanserlerinde görüldüğü kanıtlanmış fakat ileriki yıllarda yapılan çalışmalarda ÜNMK'de birincil olarak PI3CA genindeki mutasyonun bu sinyal yolağında hiperaktivasyona sebep olduğu rapor edilmiştir (35–37).

2.2.1. Üçlü Negatif Meme Kanserinde Tedavi Yöntemleri

Birçok kanser türünde olduğu gibi meme kanserinde de birincil strateji, geleneksel tedavi yöntemlerine dayanmaktadır. Cerrahi müdahaleler bu yöntemlerden biri olup genellikle meme koruyucu cerrahi veya mastektomiye dayanmaktadır (38). Cerrahi müdahaleler sonrasında hastalarda ÜNMK tekrarını önlemek amacıyla radyoterapi tamamlayıcı bir yöntem olarak tercih edilmektedir (39). Fakat tümörlü dokunun cerrahi yöntemlerle uzaklaştırıldığı ÜNMK hastalarında bölgesel nüks eğilimi olduğu ve ilk 5 yıl içerisinde hastaların yüksek risk grubunda yer aldığı görülmüştür (40). Her ne kadar klinikte tercih ediliyor olsa da bu yöntemler ÜNMK'nin agresif yapısından dolayı uzun süreli ve etkili bir çözüm sunmamaktadır.

Güncel olarak, ÜNMK tedavisinde birincil ve altın standartlardaki yöntem kemoterapidir (41). ÜNMK tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar mikrotübül polimerizasyonu, deoksiribonükleik asit (DNA) sentez mekanizması, hücre içi toksisite gibi farklı moleküler yolaklar üzerinden etki etmektedir (42,43). Bu sebeple, tedavi için uygun ilacın seçimi oldukça önemlidir. Klinikte antrasiklin, taksan, siklofosfamid, platin, ve antimetabolit tabanlı kemoterapi yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.2) (44).

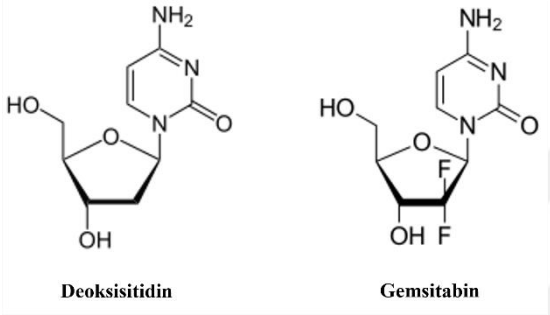
Tablo 2.2: Klinikte kullanılan kemoterapi ilaç grupları ve etki mekanizmaları

Kemoterapi ilaç grubu	**İlaç**	**Etki ettiği yolak**	**Etki Mekanizması**
Antrasiklin (Antibiyotik)	Doksorubisin Epirubisin	DNA sentez mekanizması	Topoizomeraz II inhibisyonu sonucu DNA kırıklarının oluşturulması ve apoptoza teşvik (45)
Taksan (Anti-mitotik)	Paklitaksel Dosetaksel	JNK/SAPK ve NFκB sinyal yolağı	Mikrotübül depolimerizasyonun engellenmesi sonucu hücre döngüsünün G2/M fazında durdurulması ve apoptoza teşvik edilmesi (46)
Siklofosfamid (Alkilleyici)	Sitoksan	DNA sentez mekanizması	Metabolik aktivasyon sonucunda oluşan azot hardalın Guanin bazını alkillemesi ile DNA çapraz bağlarının oluşması ve DNA sentezinin durdurulması (47)
Platin (Alkilleyici)	Sisplatin Karboplatin	MAPK, JNK, AKT, p53 sinyal yolakları	Pürin bazları arasında çapraz bağların oluşmasıyla DNA sentezinin, durdurulması ve apoptoza teşvik (48)
Antimetabolitler	Florourasil Gemsitabin	PI3K/AKT ve p53 sinyal yolakları	Urasil ve sitozin gibi çeşitli nükleozid analoglarının DNA yapısına katılıp DNA sentez mekanizmasını durdurması ve Timidilat sentaz enzimini inhibe etmesi (49)

2.2.2. Üçlü Negatif Meme Kanserinde Gemsitabin Tedavisi

Kemoterapi bazlı ÜNMK tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardan biri de sitotoksik antimetabolit özellikte olan Gemsitabindir (2',2'-diflorodeoksistidin, dFdC). Moleküler formülü $C_9H_{11}F_2N_3O_4$, molekül ağırlığı ise 263,198 g/mol olan gemsitabin, deoksisitidin analoğudur (50). Deoksisitidinden farklı olarak beş karbonlu deoksiriboz halkasının ikinci karbon atomunda belirli modifikasyonlar içerir (51). Gemsitabinin yapısında bu pozisyon üzerinde yer alan hidrojen atomları yerine flor atomu bulunmaktadır (Şekil 2.2). Gemsitabin yapısına katılan iki flor atomu, hem lipofilik yapı

oluşturarak biyouyumluluğu hem de riboz şekeri üzerinde asidik iyonlaşma sabitini değiştirerek biyoaktiviteyi artırmaktadır (52). İlaç öncü formunda olan gemsitabinin hücre zarından geçişi sodyum-bağımlı konsantre edici nükleozid taşıyıcılar (hCNT-1, hCNT-2 ve hCNT-3) ve sodyum-bağımsız dengeleyici nükleozid taşıyıcılar (hENT-1, hENT-2) tarafından kontrol edilmektedir (53). Hücre içerisine alınan gemsitabin, deoksisitidin kinaz (dCK) tarafından fosforlanarak aktif metabolit formu olan nükleozid gemsitabin difosfat (dFdCDF) ve trifosfata (dFdCTF) dönüştürülmektedir (54).



Şekil 2.2: Deoksisitidin ve gemsitabinin moleküler yapısı

Gemsitabinin etki mekanizmalarından biri, trifosfat formunun replikasyon sırasında DNA zincirinin içerisine girerek DNA sentezinin sonlandırılması ve buna bağlı olarak hücrelerin apoptotik eğilime girmesine dayanmaktadır (55). Yapılan çalışmalar gemsitabinin doza bağlı olarak hücre döngüsünün tüm fazlarında etkili olabileceğini fakat bunlar arasında düşük derişimde bile yüksek hassasiyet gösteren S fazının birincil etki yolağı olduğunu göstermiştir (56,57).

Gemsitabin ilk olarak 1996 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin onayı ile ileri seviyede metastatik pankreas adenokarsinom tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (58). Meme kanseri hastalarının gemsitabin birinci basamak tedavisine oluşturduğu cevap oranı %14 ile %37 arasında değişiklik göstermektedir (59–61).

Her ne kadar gemsitabin kanser tedavisinde klinik olarak bir başarı yakalasa da tedavi esnasında bir süre sonra gemsitabine karşı direnç geliştiği ve buna bağlı olarak terapötik etkinin azaldığı bilinmektedir. Bu direnç gelişiminde etki gösteren mekanizmalardan ilki, dCK ve membran taşıyıcılarının anlatımında azalma veya aktivitesinde görülen değişimlerdir (62,63). Gemsitabinin hücre içerisinde inaktif forma

dönüştürülmesinde görevli olan deoksistidin deaminaz (dCDA) da direnç gelişim sürecinde önemli role sahiptir (64).

Ayrıca ÜNMK gelişiminde önemli rol oynayan NF-κB, PI3K/AKT/mTOR, MAPK gibi sinyal yolaklarının da gemsitabin direncinin gelişmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Gemsitabin direnci geliştiren MDA-MB-231 ÜNMK hücre hatlarıyla yapılan çalışmalardan birinde fosforlanmış AKT, mTOR ve ERK (p-AKT, p-mTOR, p-ERK) ifade seviyelerinin direnç gelişmeyen hücrelere oranla arttığı görülmüştür (65–67). Aynı çalışmada gemsitabin dirençli hücre hattının PI3K inhibitörü ile muamele edilmesiyle hücre canlılığının anlamlı oranda azaldığı kanıtlanmıştır. mTOR inhibitörünün ise dirençli hücrelerin proliferasyon yeteneklerini az oranda etkilediği gözlemlenirken, MAPK inhibitörünün herhangi bir etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Protein anlatım düzeyleri incelendiğinde mTOR ve MAPK inhibitörlerinin p-AKT ifadesini PI3K inhibitörüne oranla daha fazla artırdığı ve buna bağlı olarak PI3K/AKT sinyal yolağının ÜNMK'de gemsitabin direncinin oluşmasında görev aldığı fakat MAPK ve mTOR sinyal yolakları tarafından negatif olarak kontrol edildiği sonucuna varılmıştır.

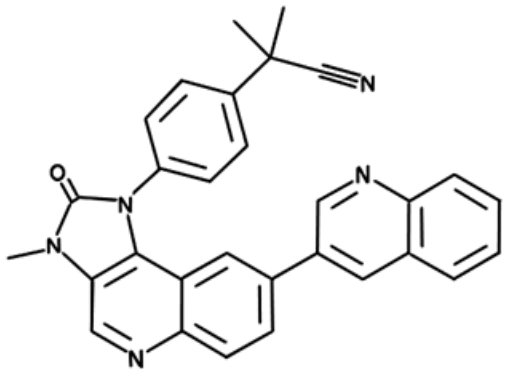
Direnç gelişiminde dolaylı olarak görev alan bir diğer sinyal yolağı ise Wnt/β-katenin sinyal yolağıdır. Gemsitabin dirençli ÜNMK hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalar sonunda meme kanseri metastazı ve ilaç direnci ile ilişkilendirilen Nod benzeri reseptör proteini 3'ün baskılanması ile gemsitabine karşı gelişen direncin Wnt/β-katenin sinyal yolağının inaktivasyonu ile azaldığını kanıtlamıştır (68). Bu inaktivasyonla birlikte NLRP3 ifadesinin azaldığı ve hücrelerin gemsitabine karşı hassasiyetinin yaklaşık 3 kat arttığı görülmüştür.

2.2.3. Üçlü Negatif Meme Kanserinde Gemsitabin Direncini Kırmak İçin Kullanılan İkincil İlaç Tedavileri

Gemsitabin tabanlı kemoterapiye karşı zamanla gelişen bu ilaç direnci tedavi yanıtını olumsuz yönde etkilemekte ve ÜNMK'de gemsitabinin klinik başarısının düşmesine sebep olmaktadır. Bu durum direncin kırılmasına ve ilaç etkinliğinin artırılmasına yönelik çalışmaların başlamasına öncülük etmiştir. Bu noktada kullanılacak ilaçların farklı mekanizmalar üzerinden etki etmesi, toksisite değerlerinin örtüşmemesi, sinerjistik etki gösteren optimize doz değerlerinin olması ve benzer çözünürlük değerine sahip olması gibi önemli şartları sağlaması gerekmektedir (69).

Literatürde antimetabolit ajan sınıfında yer alan gemsitabinin farklı kemoterapötik ilaçlarla veya sinerjistik etki oluşturabilecek kimyasal maddelerle kombine edildiğinde daha etkili olabileceği ve meme kanserinde gemsitabine karşı gelişen direncin aşılabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, gemsitabin-birinapant kombinasyonun ÜNMK hücre hatlarında proliferasyonu anlamlı oranda düşürdüğü ve gemsitabine karşı hassasiyeti 4 kat artırdığı görülmüştür (70). Bir başka çalışmada ise gemsitabin-lobaplatin kombinasyonunun ÜNMK hücre hattı üzerinde apoptotik etki oluşturarak gemsitabine olan hassasiyetin artırılabileceği gözlemlenmiştir (71). Paklitakselin gemsitabinin etkisini artırarak gemsitabin kaynaklı DNA fragmantasyonunu ve aynı zamanda apoptoz belirteci olan Bax/Bcl-2 oranını anlamlı bir artırdığı görülmüştür (72). Gemsitabin-romidepsin-sisplatin gibi üçlü kombinasyonların da hücre canlılık oranını anlamlı derecede düşürdüğü ve bu ilaçlar arasında gözlenen sinerjistik etkinin ÜNMK özelinde %50 oranında daha fazla olduğu görülmüştür.

2.2.3.1. Daktolisib: Kombine ilaç sistemlerinde tercih edilen ilaçlardan biri olan daktolisib, imidazo[4,5-c]kinolin türevi olup, üçüncü nesil PI3K/mTOR inhibitörüdür (73). NVP-BEZ235 olarak da bilinen daktolisibin moleküler formülü $C_{30}H_{23}N_5O$, molekül ağırlığı ise 469,5 g/mol'dür (Şekil 2.3). Novartis tarafından geliştirilen bu ilaç ilk olarak 2008 yılında klinik deneylere dâhil edilmeye başlanmıştır (74).



Şekil 2.3: Daktolisibin kimyasal yapısı

Daktolisib, PI3K ve mTOR kinazlarının adenozin trifosfat bağlanma bölgelerine bağlanarak aktivitelerini düşürmekte ve bu şekilde hücre içerisinde bu iki sinyal yolağını inhibe etmekte, böylelikle hücreleri apoptoza teşvik etmektedir (75). Yapılan homoloji ve moleküler modelleme çalışmaları ile daktolisibin her iki kinaz için de aynı bağlanma modülünü kullandığı ve yan zincirlerinde bulunan serin amino asit ile hidrojen bağı oluşturarak aktif bölgelerle etkileşime girdiği görülmüştür. Ayrıca daktolisibin yapısında bulunan imidazol veya kinolinindeki nitrojen aracılığı ile de kinaz bağlanma noktalarını hedef alabileceği ve bu şekilde farklı bağlanma modları oluşturarak da görev alabileceği bilinmektedir (76).

Meme, pankreas, akciğer, kolon, rahim ağzı ve renal gibi çeşitli kanser türleri üzerinde yürütülen klinik öncesi çalışmalar, daktolisibin kanserli hücrelerde proliferasyon ve invazyonu baskıladığını, hücre döngüsünü durdurarak apoptotik eğilimi artırdığını göstermiştir (77–82).

Klinik öncesi çalışmalarda yakaladığı başarı ile oldukça umut vaat eden bu ilaç tek başına uzun süreli kullanıldığında hastalık durgunluğuna sebep olmakta ve bundan dolayı klinikte yetersiz kalmaktadır (83). Buna ek olarak daktolisibin faz I çalışmalarında ortaya koyduğu yüksek toksisite ve düşük farmakolojik etkinlik klinik çalışmaların durdurulmasına, aynı zamanda ileriki faz çalışmaları için onay alamamasına sebep olmuştur. İleri seviye pankreas kanseri hastalarının katılımı ile yürütülen faz II klinik çalışmalarında daktolisib tedavisi sonrasında hastaların %83,9'unda 3. ve 4. seviye yan etkilerin gözlendiği raporlanmıştır (84).

Daktolisibin bir diğer dezavantajı ise suda çözünürlüğünün düşük olmasıdır (85). Bu durum, daktolisibin ağız yoluyla alındığında düşük biyouyumluluk göstermesinde sebep olmakta ve klinikteki etkinliğini düşürmektedir. Yapılan klinik çalışmalarda daktolisibin suda düşük çözünürlüğü sebebiyle bağırsaklarda birikim eğiliminde olduğu ve böylelikle gastrointestinal sisteme karşı spesifik bir toksisite oluşturduğu bildirilmiştir. Daktolisibin doz sınırlayıcı toksisitesi, zayıf tolere edilebilirliğinin yanı sıra hastalarda gözlemlenen şiddetli mide bulantısı, kusma, yorgunluk gibi olumsuz yan etkileri faz I ve faz II aşamasındaki klinik çalışmaların durdurulmasına sebep olmuştur (86,87).

Bu sonuçların ardından yapılan çalışmalarda daktolisibin çeşitli kemoterapötik ilaçlar ile kombine şekilde kullanıldığında sinerjistik etki oluşturduğu ve bu şekilde

hastalık durgunluğunun aşılabileceği kanıtlanmıştır. Literatürde, gemsitabin, sisplatin, temozolomid, vinkristin, doksorubisin gibi çeşitli ilaçların daktolisibin terapötik etkisini artırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (78,81,88–90). Farklı kanser hücreleri üzerinde yapılan bu çalışmalarda, kombine kemoterapinin ilaçların bireysel etkisine oranla hücre proliferasyonunu anlamlı oranda azaltırken apoptozu da aynı oranda artırdığı görülmüştür.

Meme kanseri özelinde ise daktolisib ile kombine terapi uygulandığında trastuzumab direncinin ortadan kaldırılabileceği görülmüştür (77). MDA-MB-431 ÜNMK hücre hattı üzerinde yapılan in vitro çalışmalar daktolisib-trastuzumab ikilisinin apoptotik etkiyi %16,3 artırdığını, in vivo çalışmalar ise tümör gerilemesine sebep olduğunu göstermektedir. Sisplatin direnci geliştiren ÜNMK hücre hatlarında ikili ilaç kombinasyonu sonrasında hücrelerde apoptoz belirteci olan parçalanmış poli ADP-riboz polimeraz seviyesini arttığı belirtilmiştir (91). Aynı çalışmada daktolisibin sisplatinin tek başına oluşturduğu apoptotik etkiyi 3 kat artırırken MDA-MB-231 hücre hattında ilaç direncini 2,1 oranında tersine çevrildiği rapor edilmiştir.

2.3. NANOPARÇACIK TABANLI İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ

"Nanoteknoloji" fenomenin ortaya çıkış serüveni aslında 1925 yılında Richard Zsigmondy'e Nobel Bilim ödülünü kazandıran "nanometre" kavramıyla başlamıştır (92). Yunancada cüce anlamına gelen "nanos" ön eki bir ölçü birimi olan metre ile kullanıldığında metrenin milyarda birini (10^{-9} m) ifade etmektedir. Modern nanoteknolojinin babası olarak bilinen Richard Feynman ise 1959 yılında Amerikan Fizik Topluluğu'nun Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'ndeki toplantısında maddelerin atomik düzeyde kontrol edilebileceğini ve bu düzeye inildiğinde çok daha büyük bir dünyanın bizi karşıladığını belirtmiştir (93). Konuşmasında nanoteknoloji kavramını hiç kullanmamasına rağmen verdiği örnekler ile maddelerin minyatürize edilmesi fikrini ortaya koyarak nanoteknolojinin temellerini atmıştır. Nanoteknolojinin terminolojik olarak hayatımıza girmesi ise 1974 yılında Norio Taniguchi'nin bu kavramı "malzemelerin temel olarak bir atom veya bir molekül tarafından ayrılması, birleştirilmesi ve deformasyonu" olarak tanımlamasıyla gerçekleşmiştir (94). Drexler ise Feynman ve Taniguchi'nin literatüre sunduklarını birleştirerek 1986 yılında "Yaratılış Motorları: Nanoteknolojinin Yaklaşan Çağı" kitabını yayınlamış ve nano boyuttaki robotlar ile moleküler seviyede düzenleme ya da üretiminin mümkün

olabileceğini belirtmiştir (95). Drexler'in nanoteknolojiye kazandırdığı bu yeni bakış açısı "moleküler nanoteknoloji" olarak isimlendirilmiştir.

En az bir boyutu 1 ile 100 nm olan malzemeler olarak tanımlanan nanomalzemeler (NM), hastalık tanı biyosensörleri, ilaç taşıma sistemleri, moleküler görüntüleme ve tedavi yöntemleri gibi birçok uygulamanın geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (96). Nanoparçacık (NP) tabanlı ilaç taşıma sistemleri, ilaçların dolaşım sistemi üzerinde daha etkili bir yolla iletilmesi ve ilaç kimyasal yapısındaki stabilitenin sağlanması için geliştirilmiş sistemlerdir (97). Ayrıca NM'ler şekillerine ve boyutlarına göre farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları, ultra küçük boyutları sayesinde hücre zarından kolaylıkla geçip hücre içerisine alınmaları, yüzeylerinin kolaylıkla işlevselleştirilebilmesi ve yüksek yüzey alanı/hacim oranları sayesinde ilaç taşıma sistemlerinde taşıyıcı ajan olarak tercih edilmektedirler (98).

2.3.1. İlaç Taşıma Sisteminde Kullanılan Nanomalzemeler

2.3.1.1. Lipozomlar: Lipozomlar, genellikle sulu ortamda fosfolipitlerin amfifilik özelliği nedeniyle bir araya gelerek oluşturduğu, içerisinde sulu bir faz bulunduran çift katmanlı kapalı küresel parçacıklardır (99). Doğal lipidlerin yanı sıra sentetik lipidlerle de üretilebilen lipozomlar, boyutlarına göre küçük tek tabakalı, büyük tek tabakalı ve çok tabakalı olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (100). Boyut aralığı genellikle 50 ile 500 nanometre arasında değişmekte ancak katman sayısının artmasıyla birlikte bu boyutlar mikron seviyesine de ulaşabilmektedir.

Lipozomlar, yapıları sayesinde yağda veya suda çözülebilen ilaçların ayrı ayrı veyahut eş zamanlı enkapsüle edilmesine olanak sağlayan düşük toksisiteye ve yüksek biyouyumluluğa sahip sistemlerdir (101,102). Fakat tüm bunlara rağmen lipid oksidasyonuna bağlı olarak düşük stabilite göstermeleri, dolaşım sisteminden hızlıca atılmaları veya fagositozla yok edilmeleri, agregasyon eğiliminde olmaları ve üretim aşamasında seriye bağlı farklılıklar oluşturması bu sistemler için büyük bir dezavantaj oluşturmaktadır (103).

2.3.1.2. Dendrimerler: Dendrimerler, düzenli bir şekilde tekrar ederek organize olan polimerik birimlerinin yüksek oranda dallanarak oluşturduğu üç boyutlu yapılar olarak tanımlanmaktadır (104). Her bir dallanmış birimin uçlarındaki birçok fonksiyonel gruplar ile çeşitli kimyasal etkileşime olanak sağlarlar (105). Bunun

yanında, boyut dağılımlarının stabil ve sabit bir aralıkta olması, suda çözünebilme, geçirgenlik gibi karakteristik özelliklerinin fonksiyonel gruplara bağlı olarak kontrol edilebilmesi, biyoyıkılabilir yapıda olması gibi avantajları vardır (106).

Dendrimerler, ilaç taşıma sistemleri için ideal taşıyıcı ajanlardan biri olmalarına rağmen, klinik uygulamalarda yapılarından kaynaklanabilecek toksisite, yüksek maliyet, düşük üretim verimi ve ilaç yükleme kapasitesi, saklama koşullarında stabil kalamaması dendrimerler için sorun oluşturmaktadır (107–110).

2.3.1.3. Polimerik nanoparçacıklar: Polimerik nanoparçacıklar, doğal hidrofilik veya sentetik hidrofobik özellikler sergileyen polimerlerin nano boyutlarda yapılandırılmasıyla oluşturulan ve yüksek kontrol edilebilirlikleri ile dikkat çeken taşıyıcı ajanlardır (111). Jelatin, aljinat, kitosan, kolajen ve dekstran gibi doğal kökenli polimerlerin yanı sıra poliglikolik asit, polilaktik asit, poli(laktid-ko-glikolid), poliakrilamid, polimetilakrilamid gibi çeşitli sentetik polimerlerle üretilebilmekte ve kullanılan polimere bağlı olarak farklı karakteristik özellikler sergilemektedirler.

Bunun yanı sıra, çeşitli yöntemler ile geniş ölçekte tekrarlanabilir üretimi, fizikokimyasal özelliklerinin kolay kontrol edilebilmesi, enzimatik bozulmalara karşı dirençli olması, immünojenik olmaması ve yüksek biyouyumluluğu gibi özellikleri polimerik NP'leri ilaç taşıma sistemi için uygun bir aday hâline getirmiştir (112,113). Fakat biyoyıkılabilirlik ve toksisite özellikleri ilaç taşıma sistemlerinde kullanımını etkilemektedir (114).

2.3.1.5. Karbon nanotüpler: İlk olarak 1991 yılında Iijima tarafından keşfedilen bu yapılar adından da anlaşılacağı üzere tek veya birden fazla grafitik karbon levhanın üst üste silindirik bir form almasıyla oluşan nano boyuttaki içi boş tüplerdir (115).

Silindirik yapının iç yüzeyi, ilaç yükleme alanı olarak kullanılabilirken yan duvar yüzeyleri de birçok molekülün kimyasal bağlar veya adsorpsiyon yöntemi ile bağlanmasına imkân tanımaktadır (116). Karbon nanotüplerin ilaç taşıma sistemlerinde oluşturduğu en temel sorunlardan biri su dâhil olmak üzere birçok çözücü içerisinde oldukça düşük çözünürlüğe sahip olmasıdır (117). Bu durum karbon nanotüplerin vücuttan uzaklaştırılamamasına ve yüksek toksisiteye sebep olarak ilaç taşıma sistemlerindeki uygulamalarını kısıtlamaktadır.

2.3.1.6. Metalik nanoparçacıklar: Metalik nanoparçacıklar, altın, gümüş, demir, platinyum, alüminyum, bakır, çinko, titanyum gibi çeşitli metalik elementlerden üretilirler ve kullanılan materyale bağlı olarak farklı fizikokimyasal özellik taşırlar.

Metalik nanoparçacıklar, kullanılan materyale bağlı olarak farklı fiziksel, kimyasal ve optik özelliklere sahip olabilmektedir. Bu özelliklerin boyut ve morfoloji üzerinden kontrol edilebilmesi metalik NP'lerin başta ilaç taşıma sistemleri olmak üzere kanser teşhisi ve tedavisi gibi farklı alanlarda da ilgi odağı olmasında rol oynamıştır (118,119).

Metalik NP'lerin en dikkat çekici özelliklerinden biri yüzeylerinde serbest hareket eden elektronların dışarıdan ışık enerjisi ile uyarılması sonrasında elektromanyetik alanın etkisi altına girerek gerçekleştirdiği toplu salınım hareketi olarak bilinen lokalize yüzey plazmon rezonansıdır (LSPR) (120). Bu rezonans sayesinde absorpsiyon ve saçılım özellikleri artmakta olan metalik NP'ler çeşitli biyomoleküllerin tespit edilmesinde biyosensör olarak kullanılabilmektedir (121). Bunun yanı sıra bazı metalik NP'lerde, LSP'lerin uyarılması ile termal enerjinin açığa çıktığından, bölgesel olarak kanser hücreleri üzerinde hasar oluşturarak ölüme sebep olmaktadır (122). Fototermal terapi olarak bilinen bu yöntemde altın gibi boyut ve şekillerine bağlı olarak yakın kızılötesi (NIR) bölgesindeki emilim özellikleri optimize edilebilen metalik NP'ler sıklıkla tercih edilmektedir (123). Bunun en temel sebebi ise NIR ışınlarının insan vücuduna nüfuz etme yeteneğinin daha derin olması ve metalik NP'lerin LSPR bantlarını NIR bölgesine uygun şekilde kontrol edilebilme yeteneğidir (124).

Metalik nanoparçacıklar, geniş çaplı üretimi, yüksek stabilitesi, vücuttan atılımının kolay olması gibi birçok avantajı sayesinde hedefli ilaç taşıma sistemleri için ideal malzemeler olarak görülmektedir (125). Bunun yanı sıra metalik NP'lerin, hücre içi veya çevresel faktörlere bağlı olarak kontrollü bir şekilde ilaç salınımı gerçekleştirebilmesi, bu NP'lerin ilaç taşıma sistemlerinde sunduğu bir diğer avantajdır. Örneğin, demir gibi metallerden yapılan NP'lerin manyetik özellikleri sayesinde hedefli bölgede ilaç birikiminde ve kademeli ilaç salınımında etkili olduğu bilinmektedir (126). Fakat bu alanda metallerin birçoğu yüksek toksisite ve zorlu sentez aşamalarından dolayı klinik uygulamalar açısından bazı sınırlamalara sahiptir (125,127,128). Ayrıca fizikokimyasal özelliklerinin ve davranışlarının zamana ve çevre koşullarına bağlı olarak değişim göstermesi bazı metalik NP'lerin kullanım ömrünü kısaltmaktadır (129).

2.3.1.7. Altın nanoparçacıklar: Altın nanoparçacıklar (AuNP), diğer metalik NP'lere kıyasla medikal uygulamalardaki sınırlamaları en aza indirmesi ile ilaç taşıma sistemlerinin gözde nanotaşıyıcıları arasında yer almaktadır. AuNP'lerin tercih edilmesinin birçok sebebi arasında, yüksek biyouyumluluğa sahip olması, biyolojik sistemlerde yüksek stabilite göstermesi, optik ve elektriksel özelliklerinin ayarlanabilir olması, farklı boyut ve şekillerde üretilebilmesi, karakterizasyonunun kolay olması, negatif yüzey yükü sayesinde konjugasyonunun kolay olması, yüzey plazmon rezonans özelliğine sahip olması ve uzun süreli medikal kullanım imkânı sunması bulunmaktadır (130–133).

Küre, çubuk, kafes, yıldız gibi farklı şekillerde üretilen AuNP'ler sahip oldukları morfolojik yapıları ile ilaç taşıma sistemlerinin etkinliğinde ve hücre içerisine alınmalarında oldukça önemli bir role sahiptir. Bir çalışmada küresel AuNP'lerin çubuk formundakilere kıyasla hücre içerisine daha kolay alındığı belirtilmiştir (134). Ayrıca aynı çalışmada 14, 50 ve 74 nm çapındaki AuNP'ler arasında maksimum hücre içine alımın 50 nm'de görüldüğü ve diğer boyutlara göre çok daha hızlı bir şekilde hücre içerisine girdiği belirlenmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalar ise 50 nm'nin AuNP'ler ve farklı türdeki NP'ler için hücre içerisine alımda optimum boyut aralığı oluşturduğunu desteklemektedir (135,136).

Altın nanoparçacıkların diğer metalik NP'lere kıyasla sunduğu en büyük avantajlardan biri de yüzey kimyasının kolay ve farklı yöntemlerle yeniden yapılandırılabiliyor olmasıdır. Bu yüzey modifikasyonları çeşitli kemoterapötik ilaç ve hedefleyici ligandların eş zamanlı olarak yüzeye konjuge olabilmesine olanak sağlamaktadır (137).

Literatürde, AuNP'lerin meme kanseri tedavisinde ilaç taşıma ajanı olarak kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Örneğin, bir çalışmada yüzeyi jelatin kaplı AuNP'lere metotreksat yüklemesi yapılarak MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkisi incelenmiş ve oluşturulan kompleksin serbest ilaca oranla daha fazla toksik etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (138). Bir başka çalışmada ise tamoksifen bağlı polietilen glikol (PEG) zincirlerinin AuNP yüzeyine konjugasyonu ile oluşturulan ilaç taşıma sisteminin $EGFR^+$ meme kanseri üzerinde serbest ilaca oranla 2,7 kat daha etkili olduğu görülmüştür (139).

2.4. HEDEFE YÖNELİK NANO-İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ

Günümüzde birçok kanserin tedavisinde ilk tercih olarak kabul görülen geleneksel kemoterapi yöntemi, hedefe yönelik ilaç iletimi gerçekleştirememesi ve buna bağlı olarak sağlıklı doku üzerinde yan etkiler oluşturması, suda çözünürlüğü düşük hidrofobik ilaçlar için uygun bir yöntem olmaması, tümör heterojenitesinden dolayı kitlede eşit ilaç dağılımının sağlanamaması sebebiyle klinik olarak bazı sınırlamalara sahiptir (140). Hasta üzerinde oluşan bu yan etkilerin en aza indirilmesi ve ilaç farmakokinetiğinin artırılması amacıyla hedefli ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir (141). Böylece hedeflenen bölgeye yüksek oranda ilaç iletimi ve birikimi sağlanırken, hedeflenmeyen bölgelerde ilaç toksisitesinin düşük olmaktadır (142). Bu sistemler, hedefe yönelik kontrollü ilaç salımı yaparak ilaç kaynaklı toksisite oranını düşürmekte ve aynı zamanda ilaç etken maddelerinin biyolojik koşullardaki uyumluluğunu artırmaktadır.

2.4.1. Pasif Hedefleme Temelli İlaç Taşıma Sistemleri

Pasif hedefleme temelli ilaç taşıma sistemleri NP'lerin artırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi ile tümör ve çevre dokuda birikimine dayanmaktadır (143). Yapılan çalışma doğrultusunda katı tümör ve mikroçevresindeki kan damarlarının fizyolojik olarak bozuk yapılanması sebebiyle geçirgenliğin arttığı gözlemlenmiştir (144). Damar yapısındaki görülen bu anormal gözenek yapıların boyutları 50-1000 nm arasında değişkenlik göstermekte ve farklı boyutlardaki NP'lerin geçişine olanak sağlamaktadır (145). Aynı zamanda damarların anormal morfolojisi içerideki sıvı akışını etkileyerek tümör dokusunda NP'lerin tutulumunu sağlamaktadır (146). Pasif hedefleme her ne kadar hızlı ve kolay bir iletim sağlasa da hedeflenen bölgedeki EPR etkisinin nanotaşıyıcının fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değişim göstermesi, standart bir yöntem oluşturulamadığından sürecin kontrol altında tutulamıyor olması, tümör heterojenitesi gibi dezavantajlarından dolayı bazı sınırlamalara sahiptir (147).

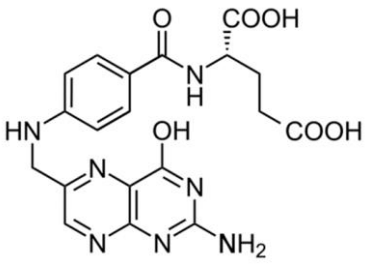
2.4.2. Aktif Hedefleme Temelli İlaç Taşıma Sistemleri

Aktif hedefleme temelli ilaç taşıma sistemleri, NP yüzeylerinin hedeflenen hücrelerdeki yüzey reseptörleri tarafınca tanınacak ligandlar ile işlevselleştirilmesine dayanan bir hedefleme yöntemidir (147). Ligand-reseptör etkileşimleri, özgün olduğundan ilaç iletiminde hedeflenen bölgeye yönelik seçiciliği sağlarken aynı

zamanda nanotaşıyıcıların hücreler tarafından tanınarak hücre içine alımını ve tutulumunu artırmaktadır. Ayrıca hedeflenmeyen organ ve dokularda ilaç kaynaklı toksisite ve oluşabilecek yan etkilerin en aza indirilmesidir (148).

Meme kanserinde artan anlatım seviyelerinden dolayı, HER2, ER, PR, transferrin reseptörü, integrin reseptörü, EGFR, folik asit reseptörü ve CD44 sıklıkla hedeflenen reseptörlerin başında gelmektedir (149–151). Fakat bu biyobelirteçler arasında HER2, ER ve PR anlatımı ÜNMK'de gerçekleşmediğinden bu üç reseptöre dışındaki biyobelirteçler kullanılarak hedefleme stratejileri geliştirilebilmektedir.

2.4.2.1. Folik asit reseptörü hedefleme: Folik asit (FA), suda çözünebilen B grubu bir vitamin olup, pürin ve pirimidin sentezinde kritik rol oynamaktadır (152). Kimyasal formülü $C_{19}H_{19}N_7O_6$ olup yapısında pteridin halkası, para-aminobenzoik asit ve glutamik asit bulundurmaktadır (Şekil 2.4). FA, kendi reseptörü aracılığı ile hücre içerisine alınmakta ve birçok metabolik tepkimede karbon donörü olarak görev almaktadır (153). Membrana bağlı bir yüzey reseptörü olan FA reseptörü ise folik asit reseptörü-alfa, folik asit reseptörü-beta ve folik asit reseptörü-gamma olmak üzere üç farklı forma sahiptir (154). Normal hücrelerde anlatımı çok yüksek olmayan bu reseptörün özellikle folik asit reseptörü-alfa formunun kanserli hücrelerde arttığı bilinmektedir. Ayrıca, FA, nanotaşıycılara kolay konjuge edilebilmesi, toksisite ve immünojenik etki yaratmaması, kolay erişilebilir ve ucuz olması gibi avantajları ile aktif hedefleme için uygun bir adaydır. FA ve reseptörleri arasındaki yüksek bağlanma afinitesi, dolaşımda kalabilme süresini artırarak ilaç taşıma sistemleri için stabilite oluşturmaktadır (155).



Şekil 2.4: Folik asitin kimyasal yapısı

Folik asit reseptörü-alfa, başta meme kanseri olmak üzere yumurtalık, küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde aşırı ifade edilmektedir (156–158). Yapılan çalışmalar, FA reseptörünün ÜNMK vakalarının %80-86'sında aşırı anlatıldığını göstermektedir (159,160). Bu durum FA reseptörünün ÜNMK'ye yönelik geliştirilen ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilecek önemli hedefleme adaylardan biri hâline gelmesini sağlamıştır.

2.5. NANOPARÇACIK YÜZEY İŞLEVSELLEŞTİRME YÖNTEMLERİ

2.5.1. Doğrudan Konjugasyon Yöntemleri

2.5.1.1. Kovalent olmayan doğrudan konjugasyon yöntemleri: Kolloid sistemlerde, NP'lerin sahip olduğu yüzey yükleri hem parçacıkların birbirleri ile hem de konjuge edilecek molekül ile arasında oluşacak elektrostatik etkileşimde belirleyici bir rol oynamaktadır. Aynı yüzey yüküne sahip olan NP'ler arasında görülen itme kuvveti, parçacıkların kolloid sistem içerisinde dağılma eğilimini artırmakta ve böylelikle agregasyonu önlemektedir (161). Bunun yanı sıra yüzey yükleri, hedef molekülün elektrostatik etkileşimler sonucu NP'lerin yüzeyine tutunmasına da olanak sunmaktadır (162). Bu konjugasyon yöntemi, molekülün özgün yapısının bozulmadan iyon değişimi ile yüzeye tutunmasını sağlasa da buradaki etkileşim rastgele gerçekleştiği ve pH duyarlı olduğundan, bağlanma stabilitesi zayıf ve yönlendirilebilir olmamaktadır (163).

2.5.1.2. Kovalent doğrudan konjugasyon yöntemleri: Kovalent doğrudan konjugasyonların temeli, hedef molekül ve NP'lerde bulunan tiyol, karboksilik asit, amin, aldehit, maleimid, hidrazid gibi işlevsel gruplar arasında görülen veya klik kimya gibi ortogonal reaksiyonlar aracılığı ile oluşan yüksek stabiliteye sahip kimyasal bağlara dayanmaktadır (164). Bu tür konjugasyonlarda sıklıkla kullanılan tiyol grubundaki sülfür atomunun nükleofilik yapısı ve metallere karşı yüksek afinitesi sebebiyle altın ile kendiliğinden bağ kurma eğilimindedir (165). Bu durum AuNP'lerin yüzeyinde tekli tabaka oluşturularak stabilitenin artmasını sağlamaktadır (166).

2.5.2. Bağlayıcı Moleküller ile Gerçekleştirilen Konjugasyon İşlemleri

Bazı durumlarda konjugasyon, farklı amaçlarla kullanılan bağlayıcı moleküller aracılığı ile gerçekleştirilebilmektedir. Karboksil grubu içeren moleküllerin kovalent

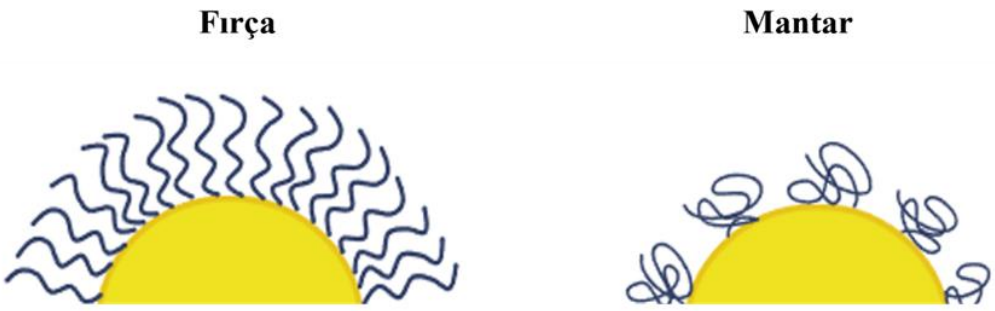
bağ oluşumu ile başka moleküllere bağlanmasını sağlayan 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve N-hidroksi süksinimid (NHS) reaktif çifti bu bağlayıcı moleküllerin popüler örneklerinden biridir (167). EDC/NHS direkt bağlayıcılar, herhangi bir bağlayıcı yapının NP'ler ve konjuge edilecek molekül arasında köprü görevi görmeden direkt olarak kovalent bağ ile bağlanmasına olanak sağlamaktadır (163).

Bunun dışında PEG gibi polimerik yapıdaki bağlayıcılar da NP ve konjuge edilecek molekül arasında köprü görevi görerek bağlanmayı sağlayabilmektedir (168). PEG bağlayıcılar, fonksiyonel uçlarına göre monofonksiyonel, homo-bifonksiyonel ve hetero-bifonksiyonel olarak kategorize edilebilir (169). Monofonksiyonel PEG'ler, yalnızca bir ucunda fonksiyonel grup içeren ve bu sayede NP'lere bağlanmayı sağlayan bağlayıcılardır. Buna karşılık, bifonksiyonel PEG'lerin her iki ucunda da fonksiyonel grup bulunmaktadır. Başlıca homo- ve hetero- olmak üzere iki türden oluşabilmektedir. Homo-bifonksiyonel PEG bağlayıcıların iki ucunda da aynı fonksiyonel grup bulunurken, hetero-bifonksiyonel PEG'ler ise her iki ucunda farklı fonksiyonel gruplar içerir (170). Hetero-bifonksiyonel PEG'ler farklı fonksiyonel grupları sayesinde daha çeşitli bağlama stratejilerine olanak tanır.

2.5.2.1. Polietilen glikol zincirleri: Polietilen glikol zincirleri, etilen glikol [$(OCH_2CH_2)_n$] birimlerinin sıralı bir şekilde birbirini tekrar etmesiyle oluşan doğrusal veya dallanmış yapıdaki hidrofilik polimer bağlayıcılardır (168). PEG zincirleri genel olarak kovalent bağlar veya kovalent olmayan zayıf etkileşimler aracılığı ile taşıyıcı ajanlara konjuge edilmektedirler (171). PEGilasyon olarak adlandırılan bu işlem, NP'ler için birçok avantaj sağlamaktadır. Örneğin, NP'lerin yüzeyinde bir bariyer oluşturarak serum proteini gibi çeşitli biyomoleküllerle özgün olmayan bağlanmaları veya elektrostatik etkileşimlerle gerçekleşebilecek hızlı adsorpsiyonları engelleyebilmektedir (172). Bu da NP'lerin yüzeyinde sterik bir kalkan oluşturarak, stabiliteyi artırmaktadır (173). PEG bağlayıcıların dikkat çeken bir diğer özelliği ise immünojenik yapıda olmamalarıdır. Bu durum, immün sistem tarafından "yabancı" olarak algılanan NP'ler için kaçış yolu olmuş ve dolaşımda kalma süresini artırarak, stabilitenin korunmasını sağlamıştır (174).

Polietilen glikol zincirleri NP'lerin yüzeyindeki bağlanma yoğunluklarına göre farklı konformasyonlar almaktadır (171). Bu konformasyonlar "mantar" ve "fırça"

konformasyonu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. PEG bağlayıcıları arasındaki mesafenin artması durumunda esneyerek daha yaygın bir yapıya geçerek "mantar" konformasyonunu oluştururlar (175). Bu durumun tersi olarak, yüzeydeki PEG bağlayıcıların yoğunluğunun artması ise esnemeyi engelleyerek bağlayıcıların yüzeyden uzaklaşmasına, aralarındaki mesafenin azalmasına ve böylelikle "fırça" konformasyonu almasına sebep olmaktadır (Şekil 2.5).



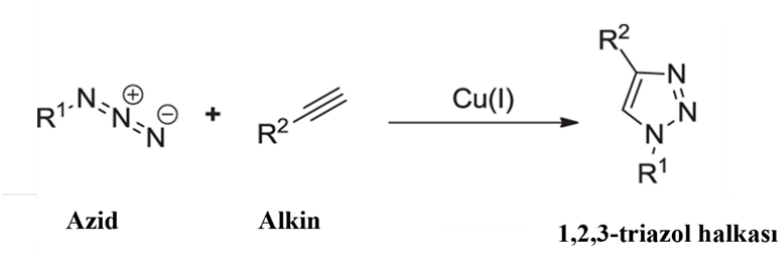
Şekil 2.5: Polietilen glikol zincirlerinin fırça ve mantar konformasyonu

2.5.3. Klik Kimya Tepkimeleri

Klik kimya tepkimeleri, NP'ler için popüler olarak tercih edilen kovalent bağ temelli konjugasyon yöntemlerinden biridir. Bu tepkimeler, ilk olarak 2001 yılında Barry Sharpless ve ekibinin yaptığı çalışma literatüre kazandırılarak karbonil kimyasına yeni bir soluk getirmiş ve 2022 Nobel Kimya ödülü almıştır (176).

Klik kimya konsepti, hafif koşullar altında karbon ve heteroatomlar arasında hızlı bir bağ oluşturarak, moleküllerin birbirleriyle bağlanmasını sağlayan bir dizi kimyasal reaksiyon içermektedir. Bir reaksiyonun klik kimya olarak sınıflandırılabilmesi için modüler reaksiyonlara olanak sağlaması, geniş kullanım alanına sahip olması, çözücü kullanmadan veya kullanılıyorsa su gibi kolayca uzaklaştırılabilen çözücüler ile yapılıyor olması, stereospesifik olması, yüksek verimli olması, kromatografik yöntemler kullanılmadan saflaştırılabilen az miktarda zararsız yan ürünler oluşturması, basit reaksiyon koşullarına ve kolay erişilebilir başlangıç materyaline sahip olması gerekmektedir (176).

2.5.3.1. Bakır (I) katalizörlü azid alkin siklokatılma tepkimesi: Klik kimya tepkimeleri arasından bakır (I) katalizörlü azid-alkin siklokatılma tepkimesi (CuAAC) klik kimyanın model tepkimesi hâline gelmiştir (177). CuAAC, azid (-N=N=N-) ve alkin (-C≡C-) grupları arasında gözlemlenen ve bakır katalizörlüğünde gerçekleşen bir siklokatılma tepkimesi olup stabil 1,2,3-triazol halkasının oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.6) (178). Bu tepkime, aslında bir azid ve bir alkin arasındaki siklokatılım tepkimesinin bakır katalizi olmadan gerçekleştiği Huisgen tepkimesinin modifiye edilmiş hâli olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tepkime, geniş pH aralığında ve su gibi basit çözücüler kullanılarak gerçekleştirilebilmesi bakımından diğer tepkimeler üzerinde büyük bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, azid ve alkin gruplarının oldukça stabil bir yapıda olması, oksijen ve su ile tepkimeye girmemesi bu reaksiyonun popüler olmasında önemli bir rol oynamaktadır (179). Fakat bu stabilite, tepkimenin yavaş olması gibi bir dezavantajı beraberinde getirmektedir. Bu sebeple, bir Huisgen tepkimesi CuAAC'den daha yavaş bir hızla gerçekleşmektedir. Ortama bakır katalizör eklendiğinde tepkimenin 10^5-10^7 kat daha hızlı gerçekleştiği görülmüştür (180,181).



Şekil 2.6: Bakır (I) katalizörlüğünde Huisgen azid-alkin siklokatılma klik kimya tepkimesi

Klik kimya tepkimelerinden CuAAC, enzim, antikor, ilaç gibi çeşitli molekül ve proteinlerin NP'lere konjugasyonunda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Örneğin, Brennan ve arkadaşları, etilen ile işlevselleştirilmiş lipaz enziminin azid ile işlevselleştirilmiş AuNP'lere bakır (I) katalizörlüğünde enzim aktivitesini bozmadan konjugasyonunu gerçekleştirmiştir (182). Cryer ve arkadaşları ise küçük hücre dışı akciğer kanseri tedavisinde kullanılan afatinib için klik kimya reaksiyonlarından yararlanarak AuNP temelli ilaç taşıma sistemi geliştirmiştir (183).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

Altın nanoparçacık sentezi ve yüzey işlevselleştirmesi için kullanılan kimyasallar Tablo 3.1'de, nihâi ilaç taşıma sistemine ait son ürünleri ÜNMK hücre hattı üzerindeki etkisinin araştırılması için hücre kültüründe kullanılan kimyasallar Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Ayrıca karakterizasyon ve hücre kültürü için kullanılan cihazlar Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Altın nanoparçacık sentezi ve yüzey işlevselleştirmesi için kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı	**Kimyasal formül**	**Marka**	**Katalog No.**
Altın (III) klorür trihidrat	$HAuCl4 \cdot 3H_2O$	Sigma-Aldrich	#520918
Trisodyum sitrat dihidrat	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Supelco	#106448
Azid-PEG-tiyol	N3-PEG-SH,	Nanocs	#PG2-AZTH-1k
Folik asit-PEG-tiyol	FA-PEG-SH	Nanocs	#PG2-FATH-2k
Polietilen glikol metil eter tiyol	PEG-SH	Sigma-Aldrich	#729159
Daktolisib (NVP-BEZ235)	$C_{30}H_{23}N_5O$	Cayman	#10565
L(+)-Askorbik asit	$C_6H_8O_6$	Carlo Erba	#402404
Bakır (II) sülfat pentahidrat	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Biobasic	#CBD0063
Trietilamin	$C_6H_{15}N$	Isolab	#121-44-8
Hidroklorik asit	HCl	Isolab	#932-106
Nitrik asit	HNO_3	Honeywell	#7697-37-2
Sodyum klorür	NaCl	Isolab	#7647-14-5

Tablo 3.2: Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar

Kimyasal adı	**Marka**	**Katalog No.**
Roswell Park Memorial Institute 1640 (1X) L-Glutamin	Gibco	#21875034
Dulbecco's fosfat tamponlu salin (PBS) (1X)	Capricorn	#PBS-1A
Fenol kırmızısı içeren tripsin-EDTA (0.25%) (1X)	Gibco	#250200-56
Isı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS)	Diagnovum	#D154
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Honeywell	#41640
4',6-diamidino-2-fenilindol hidroklorür (DAPI)	Cayman	#14285
Propidyum İyodür (PI)	Sigma-Aldrich	#P4170

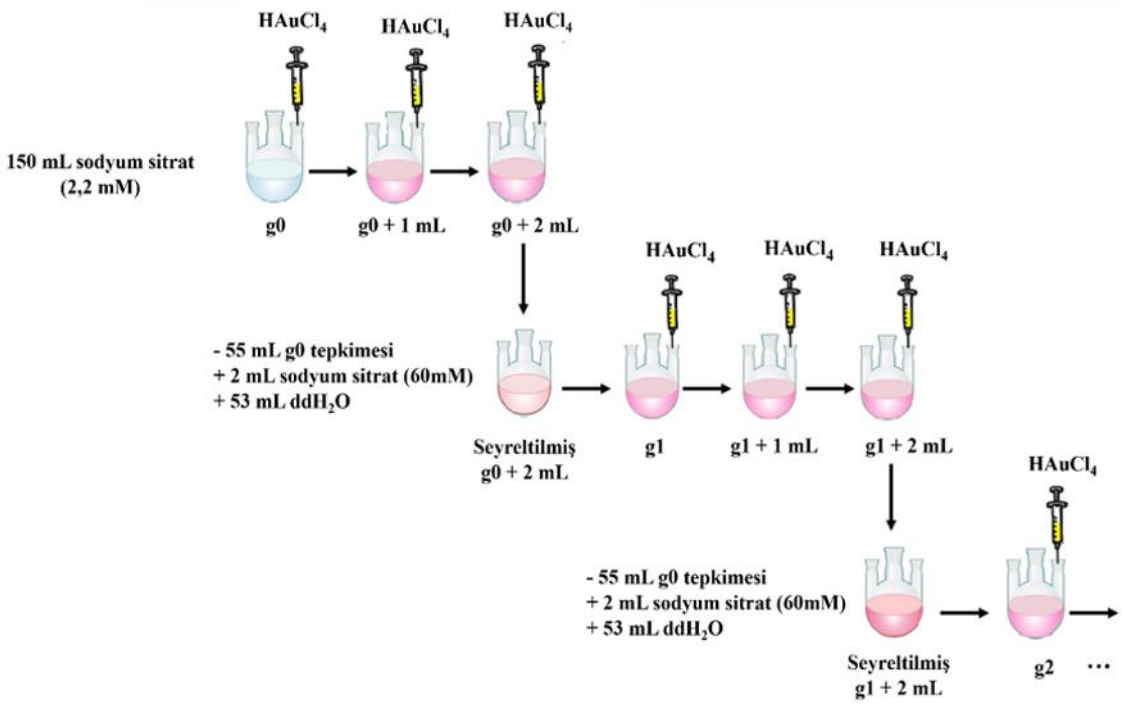
Tablo 3.3: Karakterizasyon ve hücre kültürü deneyleri için kullanılan cihazlar

Cihaz	**Marka**	**Model**
Hassas terazi	Ohaus	AX-224
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph	MR-Hei-Tec
Çalkalamalı blok ısıtıcı	Allsheng	MS/100-MCS/100
Santrifüj	Beckman Coulter Allegra	X-30R
Dinamik Işık Saçılımı (DLS)	Malvern	Zetasizer Ultra
Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	Nanosurf	CoreAFM
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopi cihazı	Thermo Scientific	Nicolet iS50
Raman spektroskopi cihazı	Reinshaw	InVia Qontor
Termogravimetrik Analiz (TGA) cihazı	PerkinElmer	TGA 8000
Yüksek içerikli görüntüleme mikroskobu	PerkinElmer	Operetta CLS
Biyogüvenlik kabini	SafeFAST	Classic 209
Ters ışık mikroskop	Motic	AE 2000
Etüv	Binder	CB Z70

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Altın Nanoparçacık Sentezi

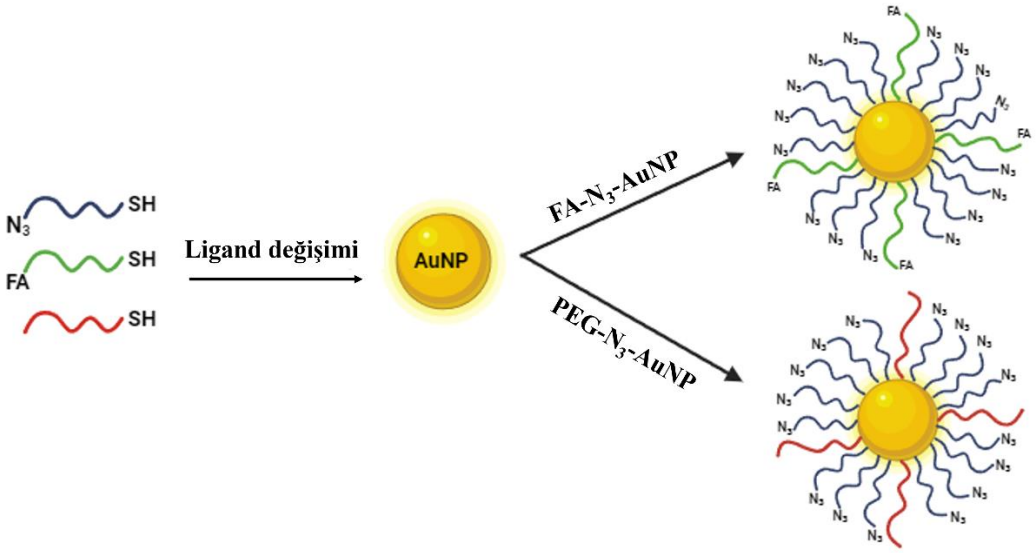
Sentez öncesinde kullanılacak tüm cam malzemeler kral suyu ($3HCl:1HNO_3$) ile muamele edilerek tepkimeyi etkileyebilecek iyon ve metallerden arındırılmıştır. Şekil 3.1'de şematik olarak özetlendiği gibi, 55 nm AuNP sentezi Bastús ve arkadaşlarının yayınladığı "çekirdek büyütme" yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (184). Karıştırmalı ortamda kaynamakta olan 150 mL 2,2 mM sodyum sitrat çözeltisi üzerine 30 dakikalık aralıklar ile toplamda üç kere 1 mL 25 mM tetrakloroaurik asit ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) eklenerek 8-9 nm boyutlarında AuNP çekirdekleri elde edilmiştir. Çekirdek üzerinden gerçekleşecek boyut artışı, 90°C'deki tepkime ortamına eklenen tetrakloroaurik asit ve trisodyum sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ile kontrol altında tutulmuştur. Her büyüme aşamasının sonunda elde edilen AuNP'ler, ultra saf su (ddH_2O) ile seyreltildikten sonra 2 mL 60 mM trisodyum sitrat dihidrat eklemesiyle bir sonraki büyüme adımına hazırlanmış ve her 30 dakikada 1 mL 25 mM $HAuCl_4$ çözeltisinden üç kere ekleyerek büyüme adımı tamamlanmıştır. Toplamda 6 büyüme adımının ardından 55 nm boyutunda AuNP'ler elde edilmiştir. Elde edilen AuNP'ler oda sıcaklığında (25°C) soğumaya bırakılmış ve soğutma işlemi sonrasında karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1: Altın nanoparçacık sentezinin şematik özeti

3.2.2. Altın Nanoparçacık Yüzey İşlevselleştirmesi

Altın nanoparçacık yüzey işlevselleştirilmesi için moleküler ağırlıkları sırasıyla 1000, 2000 ve 6000 Dalton olan azid-PEG-tiyol (N_3-PEG-SH), folik asit-PEG-tiyol (FA-PEG-SH), ve PEG metil eter tiyol (PEG-SH) zincirleri kullanılmıştır. İşlevselleştirme, Wang'ın 2013 yılındaki çalışması baz alınarak gerçekleştirilmiştir (185). Yüzey işlevselleştirme sırasında, FA-N_3-AuNP ve PEG-N_3-AuNP olacak şekilde iki farklı konjugasyon gerçekleştirilmiştir. FA-N_3-AuNP'ler, N_3-PEG-SH ve FA-PEG-SH zincirlerinin kombinasyonundan oluşmakta ve yapısındaki FA ile ÜNMK hücre hattına üzerinde hedefli ilaç iletimi sağlaması amaçlanmıştır. PEG-N_3-AuNP'ler ise N_3-PEG-SH ve PEG-SH zincirlerinden oluşan ilaç taşıma ajanları olup yapısında herhangi bir hedefleyici ajan bulundurmamaktadır (Şekil 3.2).

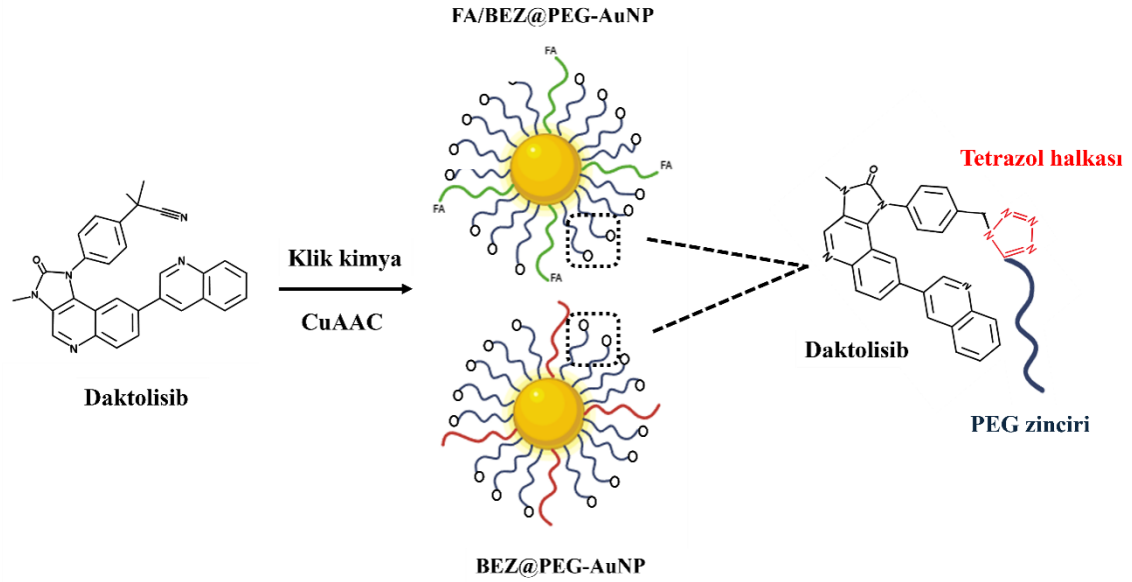


Şekil 3.2: Yüzey işlevselleştirmesi ile FA-N_3-AuNP ve PEG-N_3-AuNP üretiminin şematik özeti

Her iki grup içinde ilk olarak, 13 mL 55 nm çıplak AuNP üzerine tepkime ortamındaki son derişimi 1 nM, 150 nM ve 300 nM olacak şekilde N_3-PEG-SH solüsyonundan gerekli miktarda ekleme yapılmış ve çalkalamalı ortamda 6 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem ile çıplak AuNP'lerin yüzeyleri N_3-PEG-SH zincirleri ile doyurulmuş ve N_3-AuNP'ler elde edilmiştir. Sonrasında tepkime ortamındaki son derişimi 100 nM olacak şekilde FA-PEG-SH çözeltisinden gerekli miktarda ekleme yapılmış ve tekrardan çalkalamalı ortamda 18 saatlik inkübasyona bırakılarak inkübasyon süresi 24 saate tamamlanmıştır. Böylelikle FA-N_3-AuNP'ler elde edilmiştir. Aynı işlem PEG-N_3-AuNP'ler için tekrar edilmiş ve tepkime ortamındaki son derişimi 10 nM olacak şekilde PEG-SH çözeltisinden gerekli miktarda eklenerek tekrardan çalkalamalı ortamda 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen FA-N_3-AuNP ve PEG-N_3-AuNP'ler 10 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Yüzeye bağlanmayan fazla FA-PEG-SH, N_3-PEG-SH, PEG-SH zincirleri ortamdan uzaklaştırılmış ve çökelti üç kere 6 mL ddH_2O ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında elde edilen son ürün pelletleri 2 mL ddH_2O ile süspanse edilerek +4°C'de karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2.2.1. Klik kimyası: Daktolisibin AuNP yüzeyine konjuge edilen N3-PEG-SH zincirlerdeki azid grubuna CuAAC ile bağlanması Meneghetti ve Litti'nin yönteminin uyarlanması ile gerçekleştirilmiştir (186). Daktolisib, dimetilformamid içerisinde çözünmüş ve sonrasında ddH2O ile seyreltilerek 1 mM derişimdeki ana çözelti elde edilmiştir. Her bir grup için toplamda 39 mL çıplak AuNP ile yüzey işlevselleştirme gerçekleştirilmiş ve yıkama işlemi sonunda elde edilen FA-N3-AuNP ve PEG-N3-AuNP pelletleri 6 mL ddH2O ile süspanse edilmiştir.

Tepkime ortamındaki son derişimi 0,8 nM olan Daktolisibin, 6 mL hacminde konsantre edilmiş FA-N_3-AuNP ve PEG-N_3-AuNP'lere konjugasyonu 100 mM sodyum askorbat, 36 mM trietilamin ilavesi ve 30 mM bakır (II) sülfat pentahidrat ($Cu_2SO_4 \cdot 5H_2O$) katalizörlüğünde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında 630 rpm'deki karıştırmalı ortamda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Klik kimyası ile FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP üretiminin şematik özeti

Tepkime ortamına eklenen çözelti miktarları sırasıyla Tablo 3.4'te belirtilmiştir. Tablo 3.4'te belirtilen bu değerler her grup için sabit kalırken daktolisib miktarı FA-N_3-AuNP ve PEG-N_3-AuNP'lerdeki N_3-PEG-SH miktarına bağlı olarak değişmektedir. Tepkime ortamına eklenen daktolisib miktarı ise Tablo 3.5'te belirtilmiştir.

Tablo 3.4: Klik kimya tepkimesinde kullanılan çözelti miktarları

Çözelti	**Derişim**	**Miktar**
Sodyum askorbat	100 mM	51,6 µL
Trietilamin	36 mM	288 µL
Bakır (II) sülfat pentahidrat	30 mM	16 µL

Tablo 3.5: N_3-PEG-SH derişimine bağlı olarak tepkime ortamına eklenen daktolisib miktarı

N_3-PEG-SH Derişimi	**Daktolisib ana çözelti derişimi**	**Miktar**
1 nM	200 nM	24 µL
150 nM	10 µM	72 µL
300 nM	100 µM	14,4 µL

Elde edilen nihaî ilaç taşıma sistemine ait ürünler, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'ler, 10 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Yüzeye bağlanmayan fazla daktolisib ortamdan uzaklaştırılmış ve pellet üç kere 6 mL ddH_2O ile yıkanmıştır. Son yıkama işlemi sonrasında elde edilen nihai ürünlerin pelleti 500 µL ddH_2O ile süspanse hale getirilmiş ve +4°C'de karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Çıplak ve İşlevselleştirilmiş Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Üretilen çıplak ve işlevselleştirilmiş AuNP'lerin karakterizasyonunda dinamik ışık saçılması (DLS), Ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis) spektrofotometre, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, Raman spektroskopisi, Termogravimetrik Analiz (TGA) yöntemleri kullanılmıştır.

Çıplak ve işlevselleştirilmiş AuNP'lerin hidrodinamik çap ölçümü, kolloid sistemler içerisindeki NP'lerin boyut ve polidispersite endeks analizi için yaygın olarak

kullanılan DLS yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntem aynı zamanda konjugasyon sonrasında PEG zincirlerinin oluşturduğu yapısal konformasyonun belirlenmesi için kullanılmıştır. AuNP yüzey yüklerinin belirlenmesi ise elektrokinetik potansiyel ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Çıplak ve işlevselleştirilmiş AuNP'ler, ddH_2O içerisinde 1:10 oranında seyreltilmiş ve boyut ölçümü polistiren küvetlerde (DTS0012) gerçekleştirilirken yüzey yükü ölçümleri için tek kullanımlık kılcal tüpler (DTS1070) kullanılmıştır.

Altın nanoparçacık derişimi, AuNP'lerin optik özelliğinden yararlanarak geliştirilen UV-Vis spektroskopisine dayalı yöntemle belirlenmiştir (187). Ayrıca, çıplak AuNP'lerin karakteristik SPR absorbans bantlarının gözlemlenmesinde ve yüzey işlevselleştirmesi sonrasında bantlarda görülen değişiminin incelenmesi için kullanılmıştır. Çıplak ve işlevselleştirilmiş AuNP'ler, ddH_2O içerisinde 1:10 oranında seyreltilmiş ve absorbans spektrumları UV-Vis spektroskopisi ile 400-700 nm dalgaboyu aralığında gözlemlenmiştir

Çıplak ve işlevselleştirilmiş AuNP'lerin üç boyutlu topolojik haritasının çıkartılması ve boyut dağılım analizinin yapılması için AFM kullanılmıştır. Çıplak ve işlevselleştirilmiş AuNP'ler ddH_2O içerisinde 1:10 oranında seyreltilmiş ve silikon levha yüzeyine 2 µL damlatılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Ardından AFM görüntüleri elde edilmiştir.

Yüzey işlevselleştirmesi sonrasında PEG zincirlerinin çıplak AuNP yüzeyine bağlanması FTIR ve Raman spektroskopi cihazı ile karakterize edilmiştir. FTIR spektroskopi analizi için çıplak ve yüzey işlevselleştirilmiş AuNP'ler, üç kere 10 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve 6 mL ddH_2O ile yıkanarak konsantre edilen örnekler toz hale getirilmiştir. Ardından 4000-650 cm^{-1} dalgasayısı aralığında FTIR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir.

Raman spektroskopi analizi için ddH_2O içerisinde 1:100 oranında seyreltilmiş çıplak ve yüzey işlevselleştirilmiş AuNP'lerden alüminyum levha üzerine 2 µL damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurumuş damlalar üzerindeki ölçüm 785 nm dalgaboyu lazer, 20× objektif, 1200 çizgi/mm, %10 lazer gücü ve 10 saniye uygulama süresi koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Bu analizler aynı zamanda klik kimyası kullanılarak gerçekleştirilen FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerde daktolisib konjugasyonunun belirlenmesi için kullanılmıştır.

Bir AuNP yüzeyine bağlanan FA-PEG-SH, N_3-PEG-SH zincirlerinin ve klik kimyası sonrası konjuge edilen daktolisib miktarının ayrı ayrı belirlenmesi ise Rahme'nin yayınındaki TGA yöntemine göre yapılmıştır (188). İşlevselleştirilmiş ve konsantre edilmiş AuNP'ler 60ºC'de 30 dakika boyunca kurutulup TGA için toz hâle getirilmiştir. Analiz nitrojen gazı altında başlangıç sıcaklığı 30°C, bitiş sıcaklığı ise 700°C olacak şekilde her bir dakikada 10°C ısı artışı ile gerçekleşmiştir.

3.2.4. Stabilite Testleri

FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'ler, liyofilizasyon, otoklavla sterilizasyon, ortam pH'ı ve tuz derişiminin arttığı stabilite testleri temel alınarak değerlendirilmiştir (189,190). Liyofilizasyon stabilite testi Yokota v.d.'de olduğu gibi sükroz eklemesi yapılarak modifiye edilmiştir (191).

Liyofilizasyon stabilite testi, son sükroz derişimi 200 mg/mL olacak şekilde cam şişeler içerisinde 2 mL çıplak AuNP, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP örneklerinin hazırlanması ve sonrasında liyofilize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan örnekler içerisindeki sükroz tamamen çözündükten sonra -80°C'de 6 saat dondurulmuş ve sonrasında 24 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası aynı hacimde ddH_2O ile sulandırılan örnekler DLS ve UV-Vis spektrofotometre ile karakterize edilmiştir.

Otoklav sterilizasyon stabilite testinde 100 µL FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'ler 1,5 mL test tüpü içerisine aktarılarak 120°C'de 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır.

Ortam pH'ına bağlı olarak gerçekleştirilen stabilite testi ise pH değeri sırasıyla 5,6; 6,1; 7 ve 8 olan fosfat tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fosfat tampon çözeltisindeki pH değeri 10 M HCl ve NaOH çözeltilerinde ekleme yapılarak denge haline getirilmiştir. FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP pelletlerinden alınan 1 µL örnek yukarıda belirtilen pH değerlerindeki 250 µL fosfat tampon çözeltisine eklenerek 10 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 24 saat olmak üzere farklı sürelerde çalkalamalı ortamda inkübe edilerek test edilmiştir.

Artan tuz konsantrasyonuna bağlı stabilite testinde, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'ler son derişimi 0,1; 1, 5, 10, 30 mg/mL NaCl olan çözeltiler ile 24 saat boyunca çalkalamalı ortamda inkübe edilmiştir.

3.2.5. Hücre Kültürü

Laboratuvarımızda geliştirilmiş olan gemsitabine dirençli MDA-MB-231 hücre hattı (MDA-MB-231^{GEM}) kültürü için RPMI-1640 besiyeri içerisine %10 (v/v) FBS eklenerek tamamlanmıştır. Kültür ortamındaki kontaminasyonların önlenmesinde önemli rol oynayan PSA'nın NP'lerle etkileşime girerek protein koronaya dâhil olduğu ve hücresel alımı etkilediği bilinmektedir (192). Bu sebeple, besiyerine PSA eklenmemiştir.

Dondurulmuş halde olan MDA-MB-231^{GEM} hücre hattı, 37°C su banyosunda hızlıca çözdürülmüştür. Dondurma aşamasında hücre ortamına eklenen %5 DMSO'nun uzaklaştırılması için kriyotüp içerisinde bulunan hücrelerin tamamı 4 mL RPMI-1640 besiyeri içeren tüplere aktarılmıştır. Tüpler, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatan uzaklaştırılarak hücre pelleti 1 mL besiyeri içerisinde nazikçe çözülerek dağıtılmıştır. Çözülen hücreler 4 mL besiyeri içeren 25 cm^2 'lik kültür kabına (T25) aktarılarak 37°C ve %5 CO_2'li ortamda 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında flask yüzeyine tutunamayan hücreler ortamdaki besiyerinin değiştirilmesi ile uzaklaştırılmıştır.

Uygun ortamda bölünen ve büyüyen hücreler, kültür kabında yüzeyin %80'ini doldurarak yeterli yoğunluğa ulaştıktan pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde ilk olarak kültür ortamında bulunan kirli besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından yüzeye tutunamayan ölü hücrelerin, serum kalıntılarının ve metabolizma atıklarının uzaklaştırılması için kültür kabı 3 mL PBS ile yıkanmıştır. Kültür kabının yüzeyine tutunan hücrelerin kaldırılması için tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. T25 kültür kabına %0,25'lik tripsinden 500 µL tripsin eklenerek 4 dakika inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası tripsin aktivasyonunun baskılanması için kültür kabına tripsin miktarının üç katı olacak şekilde 1,5 mL serum ile zenginleştirilmiş besiyeri eklenmiş ve yüzeyden kalkan hücreler toplanarak hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Sonrasında hücre süspansiyonu 15 mL falkon tüplere aktarılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatan uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 5 mL besiyeri içinde dağıtılmış sonrasında Thoma lamına 10 µL damlatılarak ters mikroskop altında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım sonrasından istenilen miktarda hücre 5 mL zenginleştirilmiş besiyeri içeren kültür kabına aktarılarak inkübatöre alınmıştır.

3.2.5.1. Hücrelerin işlevselleştirilmiş altın nanoparçacık ile muamele edilmesi ve hücre boyama deneyi: Yüksek içerikli görüntüleme cihazı ile gerçekleştirilecek olan görüntü analizi için %80 doluluk oranına ulaşan MDA-MB-231^{GEM} hücre hattı yukarıda belirtildiği gibi 384 kuyulu plakalara hücre yoğunluğu 4000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 40 µL besiyeri içerisinde ekilmiştir. Ekilen hücreler, 37℃ ve %5 CO2'li ortamda 24 saat boyunca plaka yüzeyine tutunmaları için inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonrasından plaka yüzeyine tutunan hücreler son derişimi 1 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM ve 50 nM olacak şekilde çıplak AuNP, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP içeren 40 µL besiyeri ile muamele edilerek 72 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol grubu olarak yukarıda belirtilen derişimlerde besiyeri içerisinde hazırlanmış daktolisib kullanılmıştır.

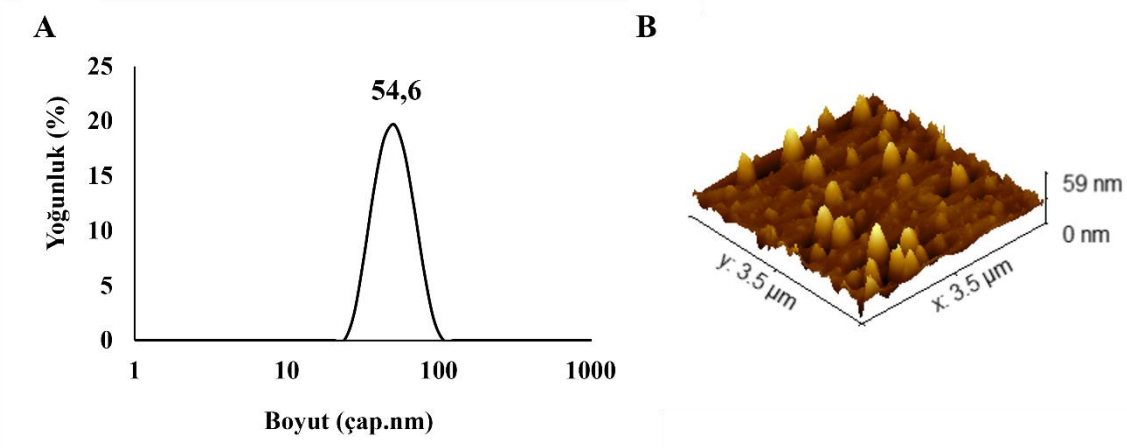
Hücre boyama deneyine geçmeden önce plaka kuyularındaki bulunan besiyeri uzaklaştırılmış ve tüm kuyular 40 µL PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında ise hücre boyama deneyine geçilmiştir. Bu aşamada hücre fiksasyonu olmadan DAPI ve PI ile eş zamanlı hücre çekirdek boyaması gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı hücre çekirdek boyaması için PI ve DAPI son derişimleri sırasıyla 300 nM ve 375 nM olacak şekilde 1,5 mL PBS içerisinde karıştırılarak çekirdek boyama çözeltisi elde edilmiştir. Boyama çözeltisinden 30 µL her kuyuya eklenmiş ve hücreler oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyular bir kez 40 µL PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında kuyulara tekrardan 40 µL PBS eklenmiş ve görüntü alma aşamasına geçilmiştir.

Çekirdek boyaması gerçekleştirilen hücrelerin görüntülemesi Harmony 4,8 bilgisayarlı yazılım sistemi ile floresan modda, 40× objektif kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Görüntü analizinde yazılımda tanımlanan DAPI ve PI boyalarına ait uyarılma ve soğurma dalga boyları kullanılmıştır. Görüntü alınmadan önce objektif ile plaka arasındaki odak mesafesi belirlenmiş ve buna bağlı olarak hücrelerin iki farklı kanaldaki lazere maruz kalma süreleri ayrı ayrı optimize edilmiştir. Toplamda 44 adet kuyu içerisinde 1980 farklı alandan görüntü alınmıştır.

4. BULGULAR

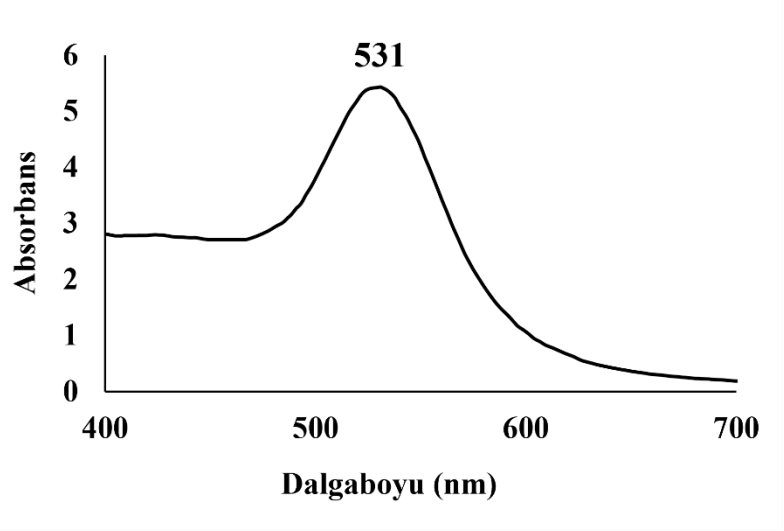
4.1. ÇIPLAK ALTIN NANOPARÇACIKLARIN KARAKTERİZASYONU

Sentezlenen AuNP'lerin hidrodinamik çapları DLS yöntemi ile belirlenmiş ve eş zamanlı olarak elektrokinetik potansiyel ölçümü de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen AuNP'lerin hidrodinamik çapı 54,6±1,6 nm, polidispersite endeksi 0,17 ve yüzey potansiyeli ise -36,1±3,9 mV olarak bulunmuştur. AuNP'lerin boyut dağılımı ve şekil analizinin yapılması için AFM kullanılmıştır. Küresel şekilde olduğu gözlenen parçacıklara boyut analizi yapılmış ve 55,4±4,5 nm çapında AuNP'lerin elde edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Sentezlenen altın nanoparçacıkların (A) boyut dağılım grafiği ve (B) Atomik Kuvvet Mikroskop görüntüsü

Çıplak AuNP'lerin karakteristik SPR tepe noktaları UV-Vis spektrofotometre cihazı kullanılarak gözlemlenmiştir. Ölçüm sonucunda, çıplak AuNP'lerin 531 nm dalgaboyunda tepe noktası yaptıkları görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Çıplak altın nanoparçacıkların absorbans grafiği

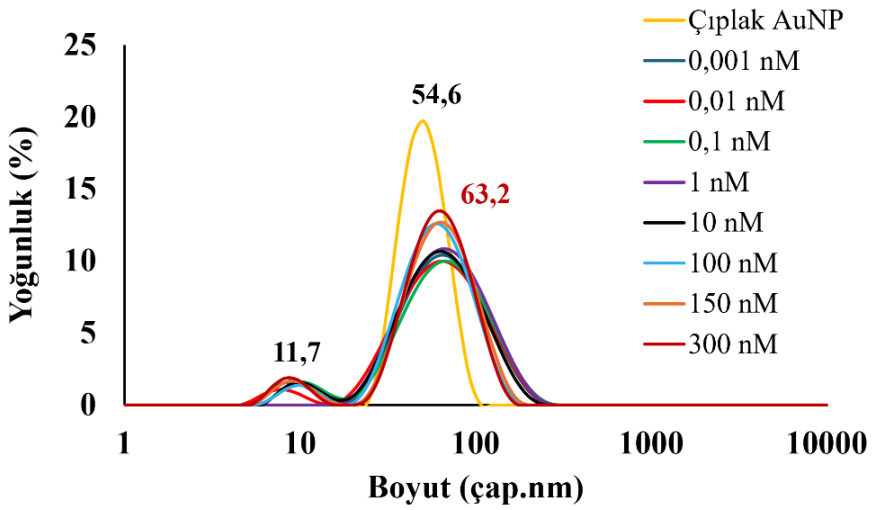
Sentezlenen AuNP'lerin derişimi, Haiss ve arkadaşlarının makalesinde yer alan ve aşağıda belirtilen denklem 4.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{Derişim (M)} = A_{450} / (\varepsilon_{450} \times l\ \text{cm}) \quad (4.1)$$

Denklemde bulunan A_{450} değeri parçacıkların 450 nm dalgaboyundaki absorbans değerini ifade etmektedir ve bu değer 2,65 olarak gözlemlenmiştir. ε_{450} ise aynı makalede yer alan tablodan elde edilmiştir. Bu tabloya göre elde edilen ~55 nm boyutundaki AuNP'lerin çaplarına denk gelen ε_{450} ise $1{,}33\times10^{10}$ $M^{-1}cm^{-1}$ olarak kabul edilmiştir. Bu hesaplama sonucu sentezlenen AuNP'lerin derişimi 0,35 nM olarak bulunmuştur.

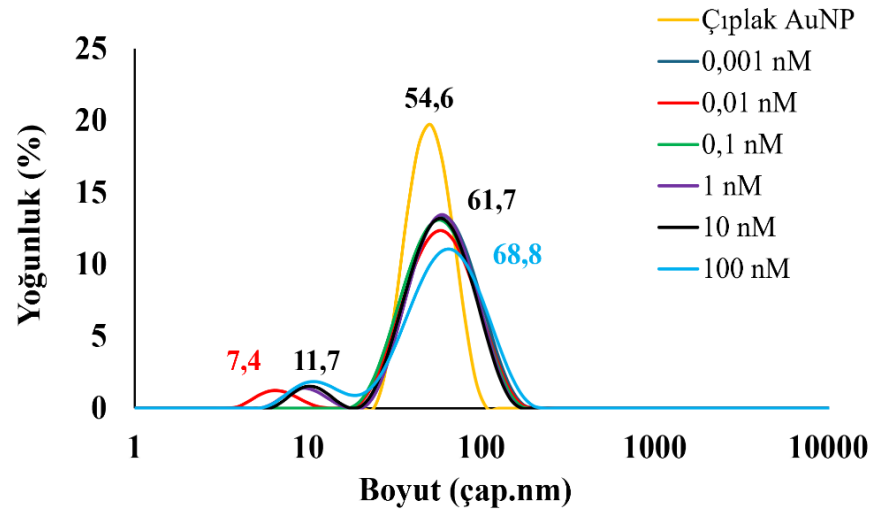
4.2. YÜZEYİ İŞLEVSELLEŞTİRİLMİŞ ALTIN NANOPARÇACIKLARIN KARAKTERİZASYONU

İşlevselleştirme işlemi sonrası PEG zincirlerinin AuNP yüzeyinde aldığı konformasyonun belirlenmesi için DLS yöntemi kullanılmıştır. Optimum PEG zincir derişimlerinin belirlenebilmesi için 300 nM, 150 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM ve 0,001 nM olmak üzere sekiz farklı derişim denenmiştir. Tüm derişimlerde yaklaşık 8 nm'lik bir artış ile boyutun 63,2±2,7 nm'ye yükseldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



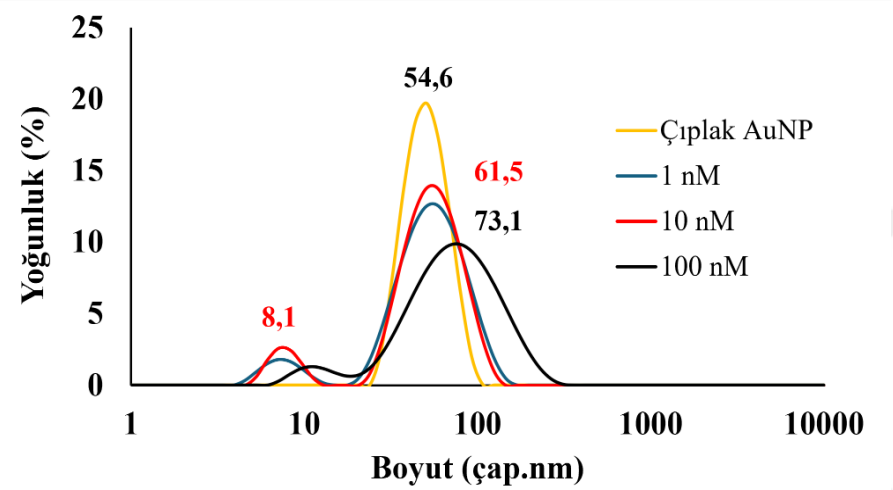
Şekil 4.3: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen çıplak altın nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği

FA-PEG-SH zincirleri içinse 0,001-100 nM arasındaki aynı derişim değerli ile yüzey konjugasyonu denenmiş ve 100 nM FA-PEG-SH ile konjuge edilmiş AuNP'lerde boyutun 68,8±2,9 nm'ye ulaştığı görülmüştür. Geriye kalan 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM ve 0,001 nM FA-PEG-SH derişiminde ise boyutlar 61,7±2,2 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



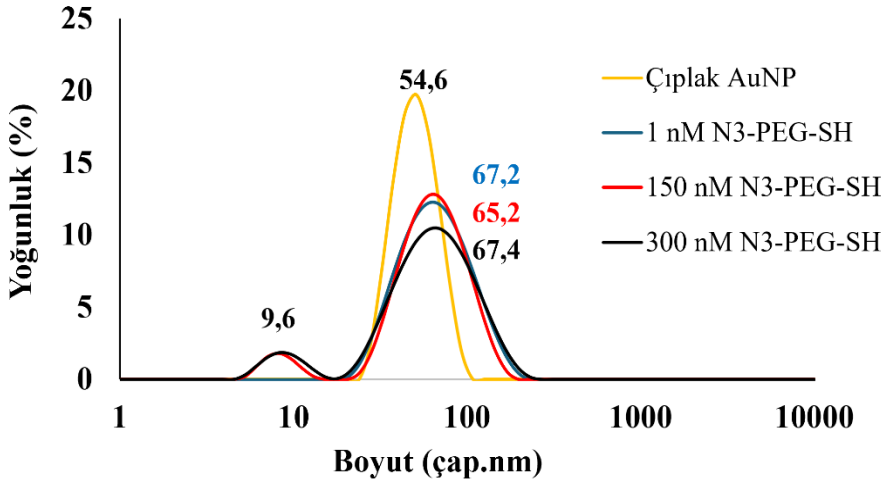
Şekil 4.4: Farklı derişimlerdeki FA-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen çıplak altın nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği

PEG-SH zincirlerinin optimizasyonu için ise 100 nM, 10 nM ve 1 nM olmak üzere üç farklı derişim denenmiştir. 100 nM PEG-SH ile konjuge edilen AuNP'lerde boyutun 9,5 nm'lik bir artış ile 73,1±2,5 nm'ye ulaştığı görülürken, 10 nM ve 1 nM PEG-SH zincir derişimide ise boyutun sırasıyla 61,5±2,9 nm ve 60,6±1,7 nm olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).



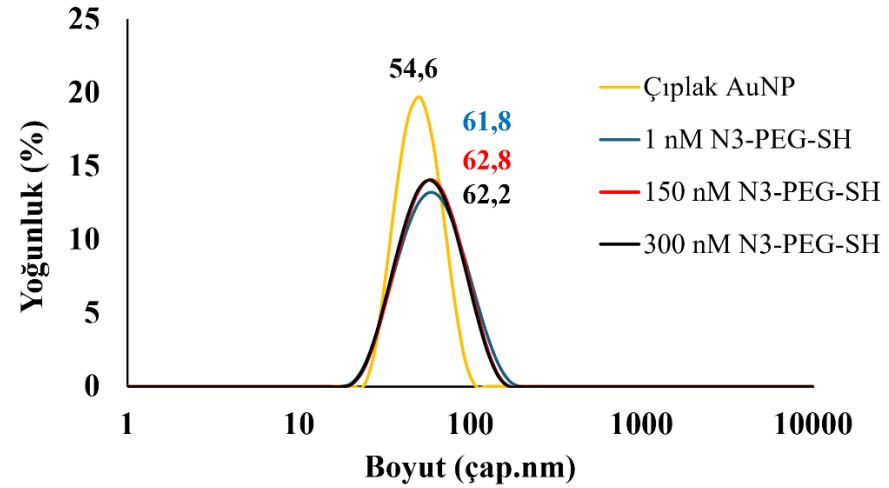
Şekil 4.5: Farklı derişimlerdeki PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen çıplak altın nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği

Boyut analizi sonrasında yüksek stabilite gösteren ve benzer PEG konformasyonuna ulaşılan derişimler optimum olarak kabul edilmiştir. Optimum derişim değerleri N_3-PEG-SH için 1 nM, 150 nM ve 300 nM, PEG-SH için 10 nM, FA-PEG-SH için ise 100 nM olarak belirlenmiştir. Farklı N_3-PEG-SH derişimine sahip FA-N_3-AuNP ve PEG-N_3-AuNP'lerin boyut analizi DLS ile gerçekleştirilmiştir. N_3-PEG-SH derişimi 1 nM, 150 nM, 300 nM FA-N_3-AuNP'lerde boyutlar sırasıyla 67,2±3,4 nm, 65,2±4,1 nm ve 67,4±4 nm olarak belirlenirken yüzey potansiyelleri ise -33,2±3,7 mV, -28,4±3,4 mV, -35,2±2,3 mV olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



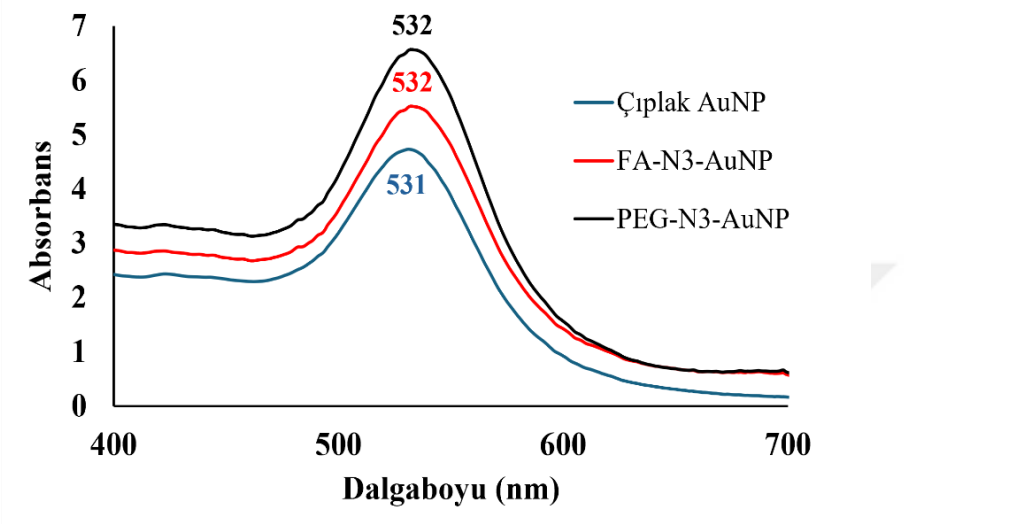
Şekil 4.6: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen FA-N_3-AuNP'lerin boyut dağılım grafiği

N_3-PEG-SH derişimi 1 nM, 150 nM, 300 nM olan PEG-N_3-AuNP'lerin boyutları ise sırasıyla 61,8±2,9 nm, 62,8±2,9 nm ve 62,2±1,7 nm; yüzey potansiyelleri ise -33,5±4,1 mV, -32,7±4,2 mV ve -29,4±3 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen PEG-N_3-AuNP'lerin boyut dağılım grafiği

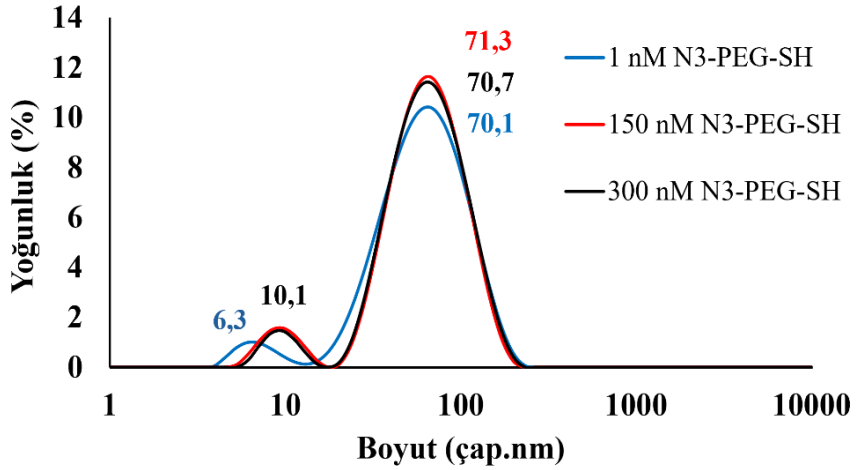
İşlevselleştirilen AuNP'lerin yüzey modifikasyonuna bağlı olarak SPR absorbans bantlarındaki değişim UV-Vis spektrofotometre cihazı ile gözlemlenmiştir. Ölçüm sonucunda, işlevselleştirilmiş AuNP'lerin SPR absorbans bantlarında 531 nm'den 532 nm'ye doğru kırmızıya kayma gerçekleşmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: FA-N_3- AuNP ve PEG-N_3- AuNP'lerin absorbans grafiği

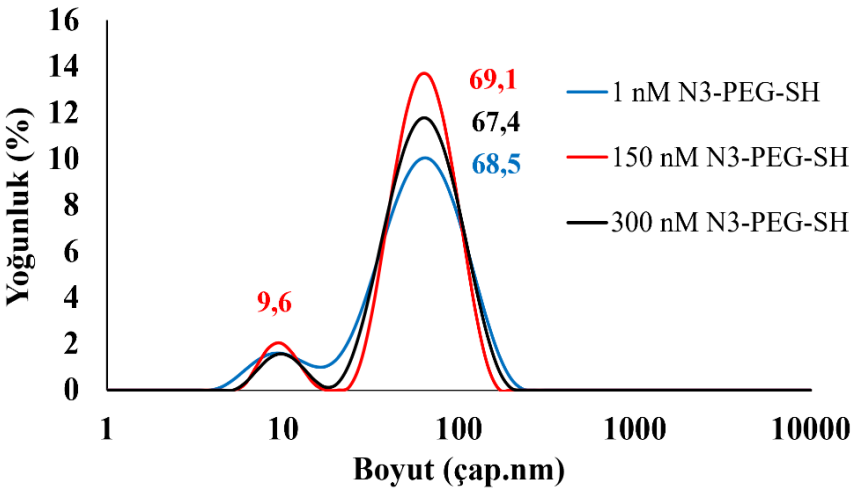
4.2.1. Klik Kimya Sonrasında Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

İlaç konjugasyonu sonrasında FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin boyut değişimi DLS yöntemi ile belirlenmiştir. N_3-PEG-SH derişimi 1 nM, 150 nM, 300 nM olan FA/BEZ@PEG-AuNP'lerde daktolisib konjugasyonu sonrasında boyutun sırasıyla 70,1±1,7 nm, 71,3±2 nm, 70,7±2,5 nm'ye ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.9). Elde edilen FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin elektrokinetik potansiyelleri sırasıyla -28,6±1,7 mV, -28,4±3,9 mV, -38,5±2,6 mV olarak belirlenmiştir.



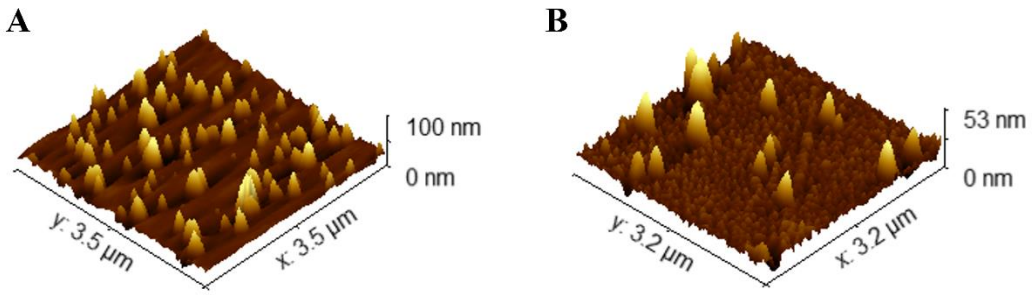
Şekil 4.9: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin boyut dağılım grafiği

N_3-PEG-SH derişimi 1 nM, 150 nM, 300 nM olan BEZ@PEG-AuNP'lerde daktolisib konjugasyonu sonrasında boyutun sırasıyla 68,5±1,5 nm, 67,4±2,7 nm, 69,1±1,5 nm'ye ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.10). Elde edilen BEZ@PEG-AuNP'lerin elektrokinetik potansiyel değerleri ise sırasıyla ise -34,4±3,6 mV, -31,3±2,9 mV ve -28,4±3,3 mV olarak belirlenmiştir.



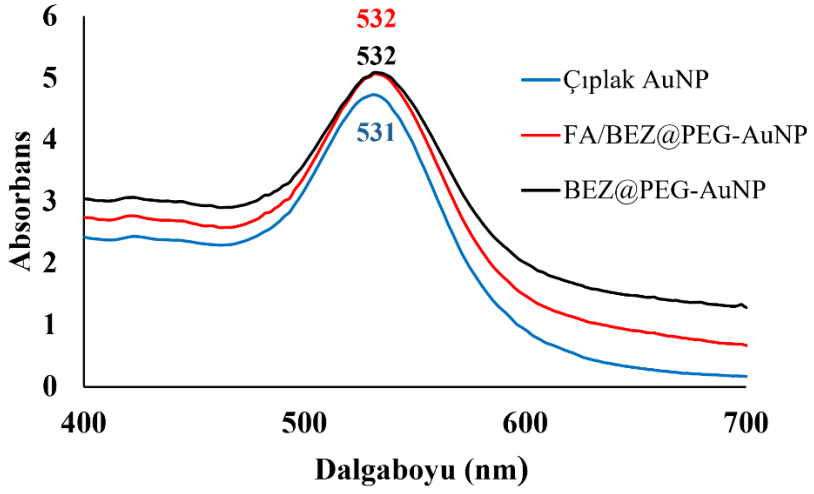
Şekil 4.10: Farklı derişimlerdeki N_3-PEG-SH zincirleri ile konjuge edilen BEZ@PEG-AuNP'lerin boyut dağılım grafiği

Buna ek olarak işlevselleştirilmiş AuNP'lerin boyut dağılımı ve şekil analizinin yapılması için AFM kullanılmıştır. Ortalama 68,5±4,2 nm çapında FA-N_3-AuNP ve 73,7±4,3 nm çapında FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin elde edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.11).



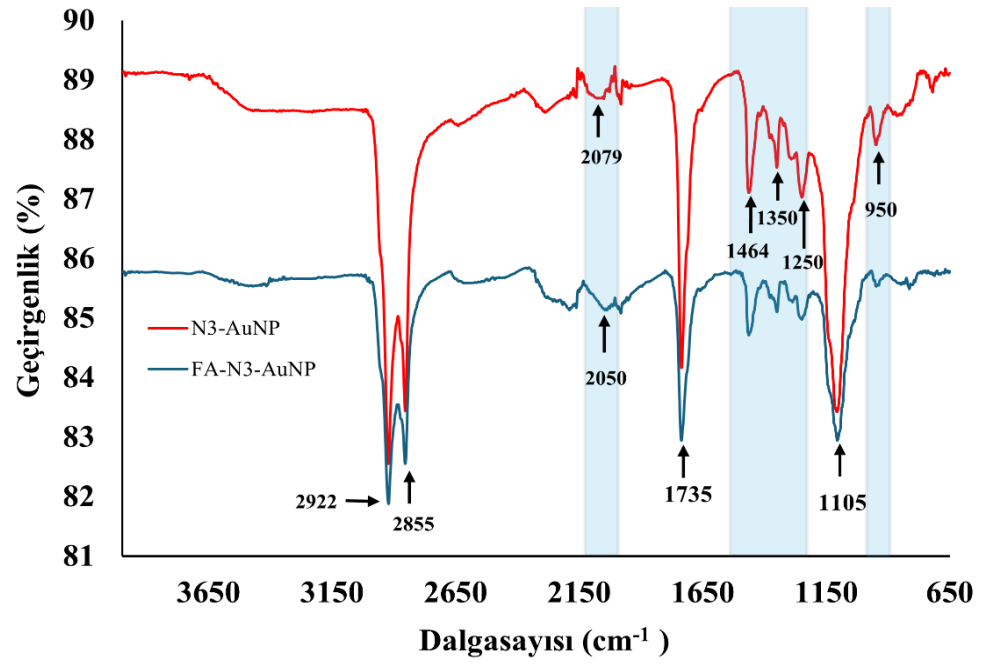
Şekil 4.11: (A) FA-N_3-AuNP ve (B) FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin Atomik Kuvvet Mikroskop görüntüleri

İlaç konjugasyonuna bağlı olarak SPR absorbans bantlarındaki değişim UV-Vis ile gözlemlenmiştir. Ölçüm sonucunda, işlevselleştirilmiş AuNP'lerin SPR absorbans bantlarında herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.12).



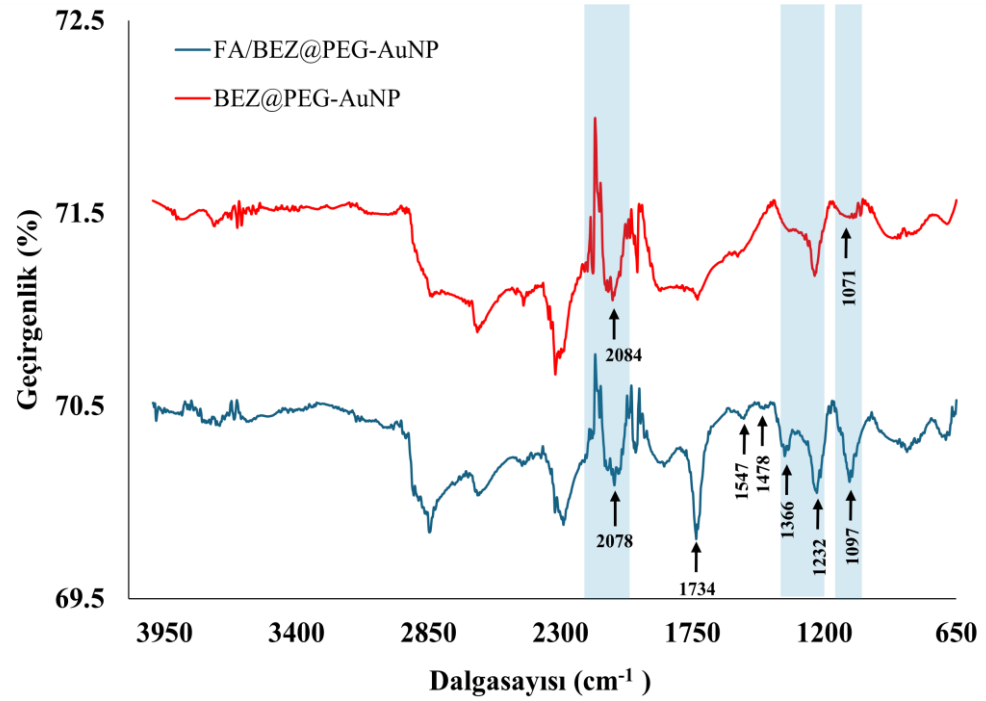
Şekil 4.12: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin absorbans grafiği

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi analizinde PEG zincirlerinin ve uçlarında bulunan fonksiyonel grupların varlığı N_3-AuNP ve FA-N_3-AuNP'lere ait spektrumların karşılaştırılması ile belirlenmiştir. Spektrumda iki spektrumda da 950, 1105, 1250, 1350, 1464, 1735, 2050, 2079, 2855 ve 2922 cm^{-1}'de keskin bantlar görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: N_3-AuNP ve FA-N_3-AuNP'lerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektrumları

Klik kimyası kullanılarak üretilen FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerde ilaç konjugasyonunun belirlenmesinde tetrazol halkasına ait karakteristik tepelerin varlığına bakılmıştır. Spektrumda 1071, 1097, 1232, 1366, 1478, 1547, 1734, 2078, 2084 cm^{-1}'de keskin ve karakteristik bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektrumları

N_3-AuNP, FA-N_3-AuNP, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin FTIR spektrumlarındaki bantlara ait frekans tanımları Tablo 4.1'de belirtilmiştir.

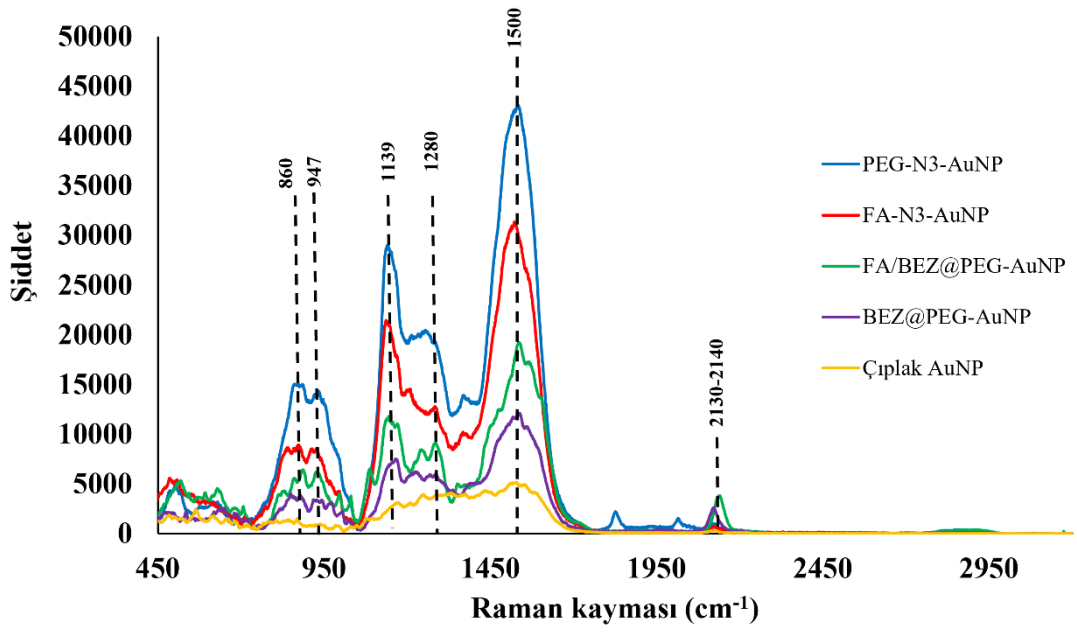
Tablo 4.1: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektrumlarında yer alan bantların frekans tanımları

Dalgasayısı (cm^{-1})	**Bant frekans tanımı**	**Referans**
950	C-H düzlem içi eğilimi	(193)
1050-1100	Tetrazol halka gerilimi	(194–196)
1100-1250	PEG zincirlerindeki C-O gerilimi	(197,198)
1250-1350	Tetrazol halkasındaki C-N ve N-N=N gerilimi	(195,196)
1350	C-H düzlem içi eğilimi	(193)
1366	Folik asitin glutamik asit kısmındaki C-O gerilimi	(199)
1464	C-H düzlem içi eğilimi	(193)

Tablo 4.1 (devam)

1478	Fenil halka gerilimi	(200,201)
1547	Pteridin halka gerilimi	(201,202)
1735	C=O gerilimi	(203,204)
2000-2100	N=N=N gerilimi	(205,206)
2855	C-H düzlem içi gerilimi	(207)
2922	C-H asimetrik gerilimi	(204)

Raman spektroskopi analizinde yüzey işlevselleştirmenin başarısı etilen glikol birimlerine ait sinyallerin varlığı ile doğrulanırken FA'nın varlığı halkasal yapısında görülen gerilmelere, ilaç konjugasyonundaki başarı ise tetrazol halkasına ait karakteristik bantlara bakılarak belirlenmiştir. Spektrumda 860, 947, 1139, 1280, 1500, 2130, 2140 cm^{-1}'de keskin ve karakteristik bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Bu bantlara ait frekans tanımları Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

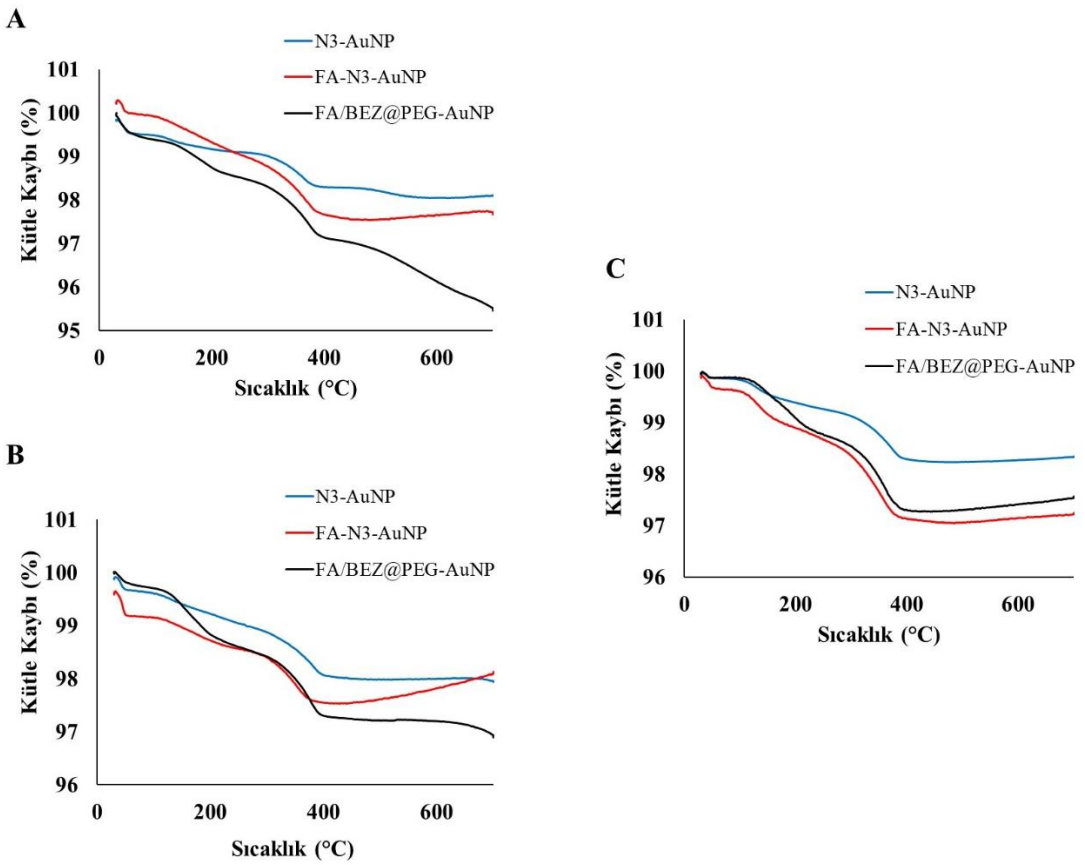


Şekil 4.15: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin Raman spektrumları

Tablo 4.2: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin Raman spektrumlarında yer alan bantların frekans tanımları

Dalgasayısı (cm^{-1})	**Bant frekans tanımı**	**Referans**
850	CH_2 eğilimi	(208)
950	CH_2 eğilimi	(209)
1139	C-O gerilimi	(208,209)
1230-1290	C-H ve C-O-C gerilimi	(208,210)
1283	Glutamik asit yapısındaki C-H eğilimi	(211)
1480-1500	Simetrik CH_2-CH_2 gerilimi	(209)
2100-2200	C≡N gerilimi	(212–214)

Altın nanoparçacıkların yüzeyine bağlanan N_3-PEG-SH, FA-PEG-SH ve klik kimyası sonrasında konjuge edilen daktolisib miktarı TGA yöntemi ile elde edilen grafiklerden yapılan hesaplamalar doğrultusunda belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Sırasıyla (A) 1 nM N_3-PEG-SH, (B) 150 nM N_3-PEG-SH ve (C) 300 nM N_3-PEG-SH içeren FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin Termogravimetrik Analiz grafiği

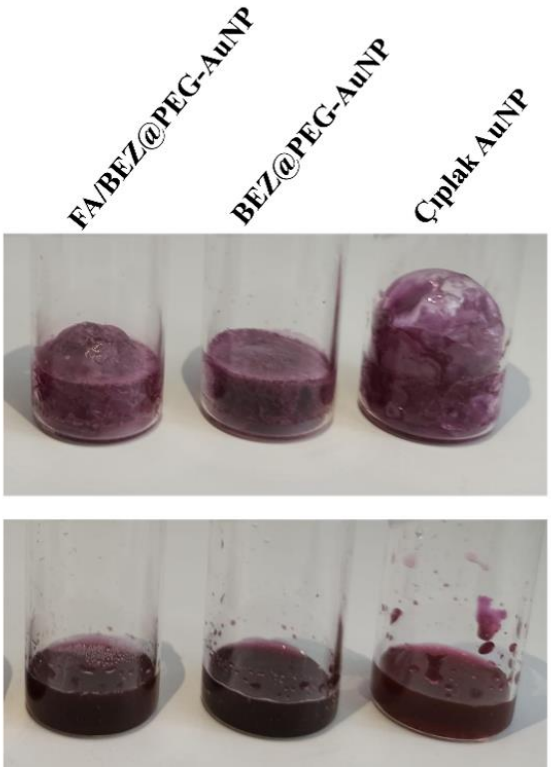
Yapılan hesaplamalar ile yüzey işlevselleştirme sonrasında N_3-PEG-SH derişimi 1 nM, 150 nM, 300 nM olan FA/BEZ@PEG-AuNP'lerde bir AuNP yüzeyine bağlanan N_3-PEG-SH zinciri, hedefleme amacı ile konjuge edilen FA-PEG-SH zinciri ve FA/BEZ@PEG-AuNP yüzeyine bağlanan daktolisib miktarı belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Altın nanoparçacık başına düşen PEG zincir ve daktolisib miktarı

FA/BEZ@PEG-AuNP'lerdeki N_3-PEG-SH derişimi	**N_3-PEG-SH zinciri**	**FA-PEG-SH zinciri**	**Daktolisib**
1 nM	5670/AuNP	1910/AuNP	16 400/AuNP
150 nM	7210/AuNP	579/AuNP	16 650/AuNP
300 nM	9520/AuNP	228/AuNP	20 340/AuNP

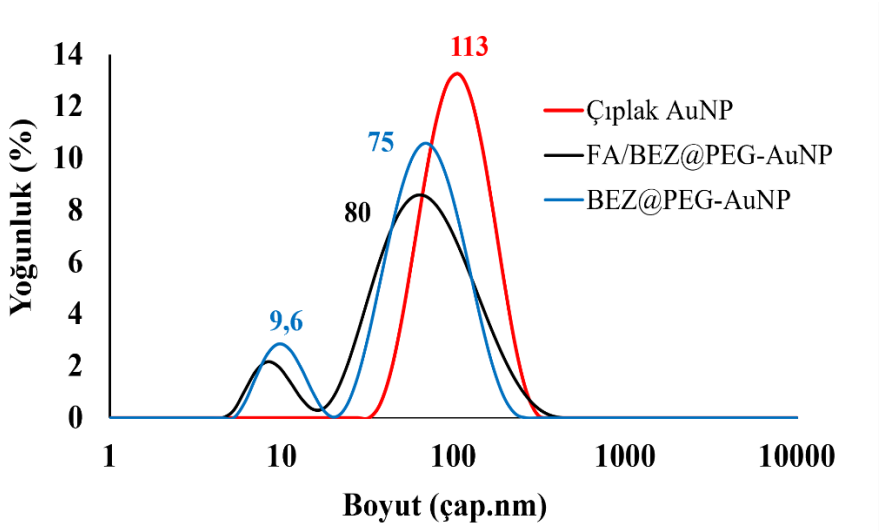
4.3. STABİLİTE TESTLERİ

Liyofilizasyon işlemi sonrasında çıplak AuNP, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerde fiziksel değişim gözlemlenmemiş olup ürünler koyu kırmızı renkte toz forma gelmiştir ve sonrasında eşit hacimde ddH_2O ile sulandırılmıştır (Şekil 4.17).



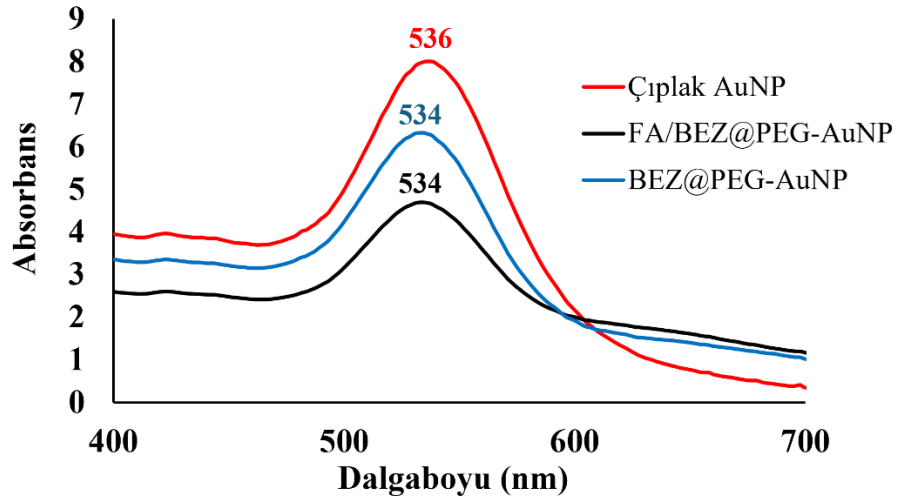
Şekil 4.17: FA/BEZ@PEG-AuNP, BEZ@PEG-AuNP ve çıplak altın nanoparçacıkların 24 saatlik liyofilizasyon stabilite testi

Eski formuna getirilen örnekler, DLS ve UV-Vis spektrofotometre ile karakterize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası çıplak AuNP, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin boyutları sırasıyla 113±2,2 nm, 80±3 nm ve 75±2,1 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18).



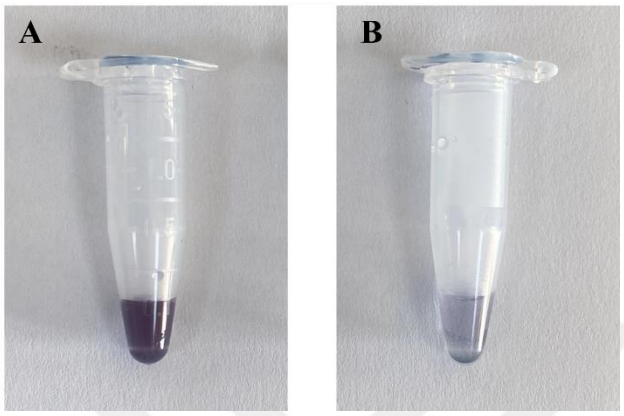
Şekil 4.18: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin 24 saatlik liyofilizasyon sonrası boyut dağılım grafiği

Liyofilizasyon sonrası tüm örneklerin SPR tepe noktalarında kayma gözlemlenmiştir (Şekil 4.19). Çıplak AuNP'lerin dalgaboyunda 531 nm'den 536 nm'ye, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerde ise 532 nm'den 534 nm'ye doğru kırmızıya kayma gerçekleştiği görülmüştür.



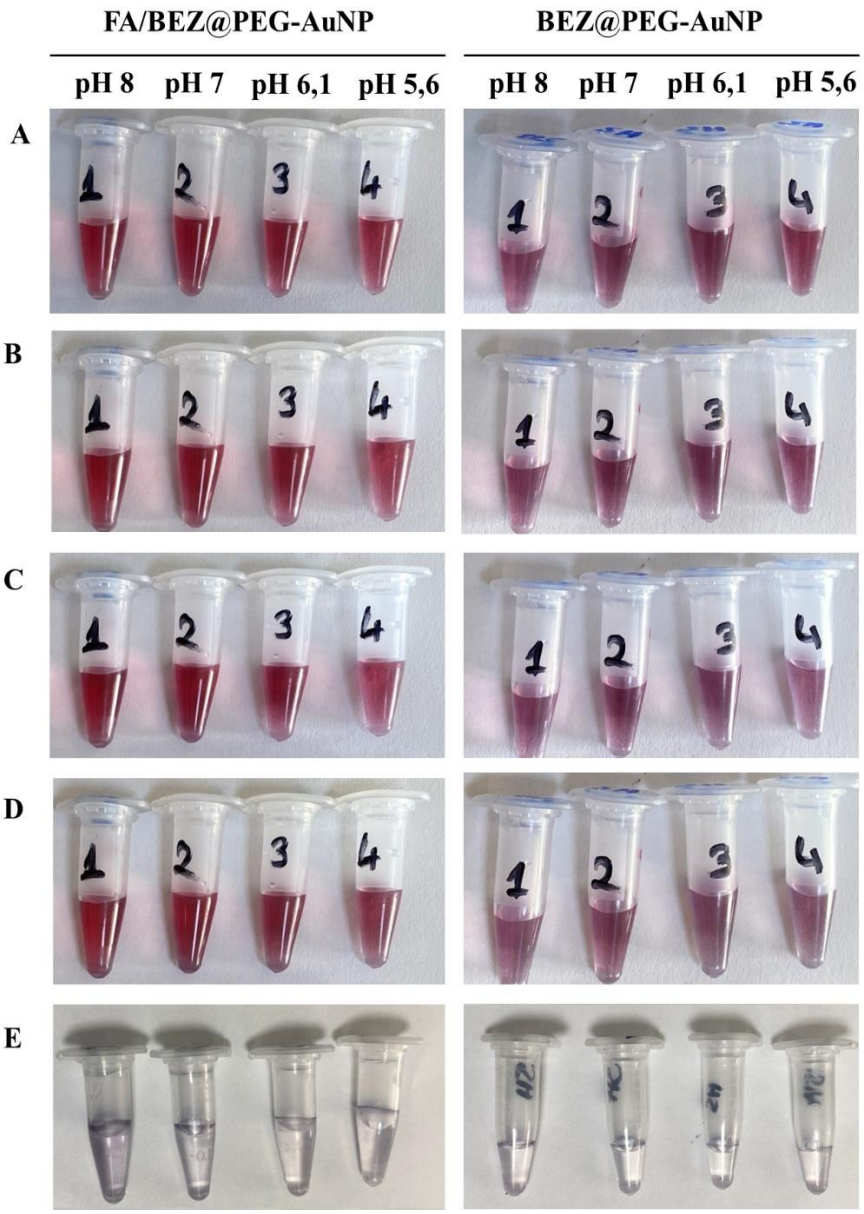
Şekil 4.19: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin 24 saatlik liyofilizasyon sonrası absorbans grafiği

Başlangıçta koyu kırmızı renkte olan FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerde otoklav sterilizasyonu sonrasında renk değişimi gözlemlenmiş ve buna bağlı olarak her iki üründe de stabilitenin korunamadığı görülmüştür (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Otoklav sterilizasyonu sonrasında (A) FA/BEZ@PEG-AuNP ve (B) BEZ@PEG-AuNP'ler

Ortam pH'ına bağlı olarak gerçekleştirilen stabilite testinde, FA/BEZ@PEG-AuNP'lerde 10 dakika ile 2 saat arasındaki inkübasyon süresinde belirtilen tüm pH değerlerinde renk değişimi gözlemlenmemişken 24 saatlik inkübasyon sonunda keskin bir renk değişimi görülmüştür. FA/BEZ@PEG-AuNP'ler 24 saatlik inkübasyonu sonunda asidik ve bazik ortamlarda stabilitesini korumayarak çökelme eğilimine girmiştir. BEZ@PEG-AuNP'ler de ise stabilizasyon kaybı tüm pH değerlerinde 10 dakikalık inkübasyon itibariyle başlamış ve artan inkübasyon süresine bağlı olarak iki saat içerisinde kademeli olarak renk değişimi gözlemlenmiştir. BEZ@PEG-AuNP'ler de 24 saatlik inkübasyonu sonunda çökelme eğilimine geçmiştir (Şekil 4.21).



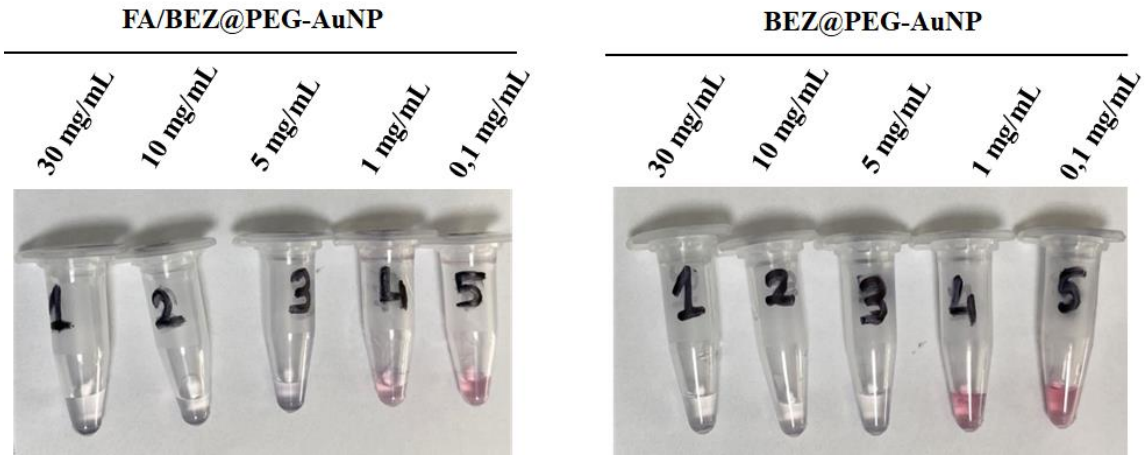
Şekil 4.21: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP ile ortam pH'ına bağlı olarak gerçekleştirilen (A) 10 dakika, (B) 30 dakika, (C) 1 saat, (D) 2 saat ve (E) 24 saatlik stabilite testi

FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin 2 saatlik inkübasyonu sonrasında UV-Vis spektrofotometre ile karakterize edilmiştir. Tablo 4.4'te belirtildiği gibi FA/BEZ@PEG-AuNP'ler ait SPR tepe noktalarında ortam pH değerine bağlı değişim gözlemlenmezken BEZ@PEG-AuNP'lerde maviye kayma olduğu görülmüştür.

Tablo 4.4: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin SPR tepe noktalarında ortam pH'ına bağlı gözlemlenen değişimler

	pH 8	**pH 7**	**pH 6,1**	**pH 5,6**
FA/BEZ@PEG-AuNP	531 nm	531 nm	531 nm	531 nm
BEZ@PEG-AuNP	527 nm	527 nm	528 nm	523 nm

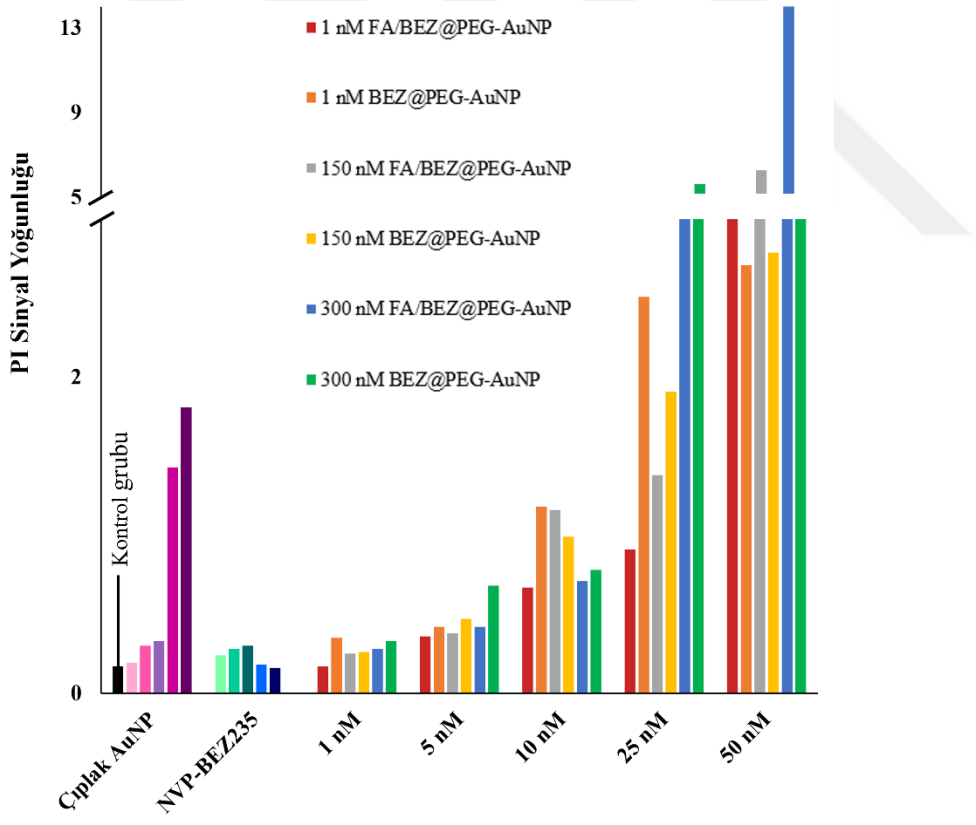
Artan tuz konsantrasyonuna bağlı stabilite testinde, 30 mg/mL NaCl derişimde ilk beş dakika içerisinde FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin her ikisinde de çökme meydana gelirken, 10 ve 5 mg/mL NaCl derişimi için bu sürenin 20-30 dakikaya çıktığı gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresinin 24 saate çıkarıldığı koşulda ise 1 mg/mL ve 0,1 mg/mL derişimdeki NaCl çözeltisinde içerisinde yer alan FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin az miktarda stabilitelerini koruduğu fakat bu artan tuz derişimi ile hiçbir örneğin stabilitesini koruyamadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin 24 saatlik tuz derişimine bağlı stabilite testi

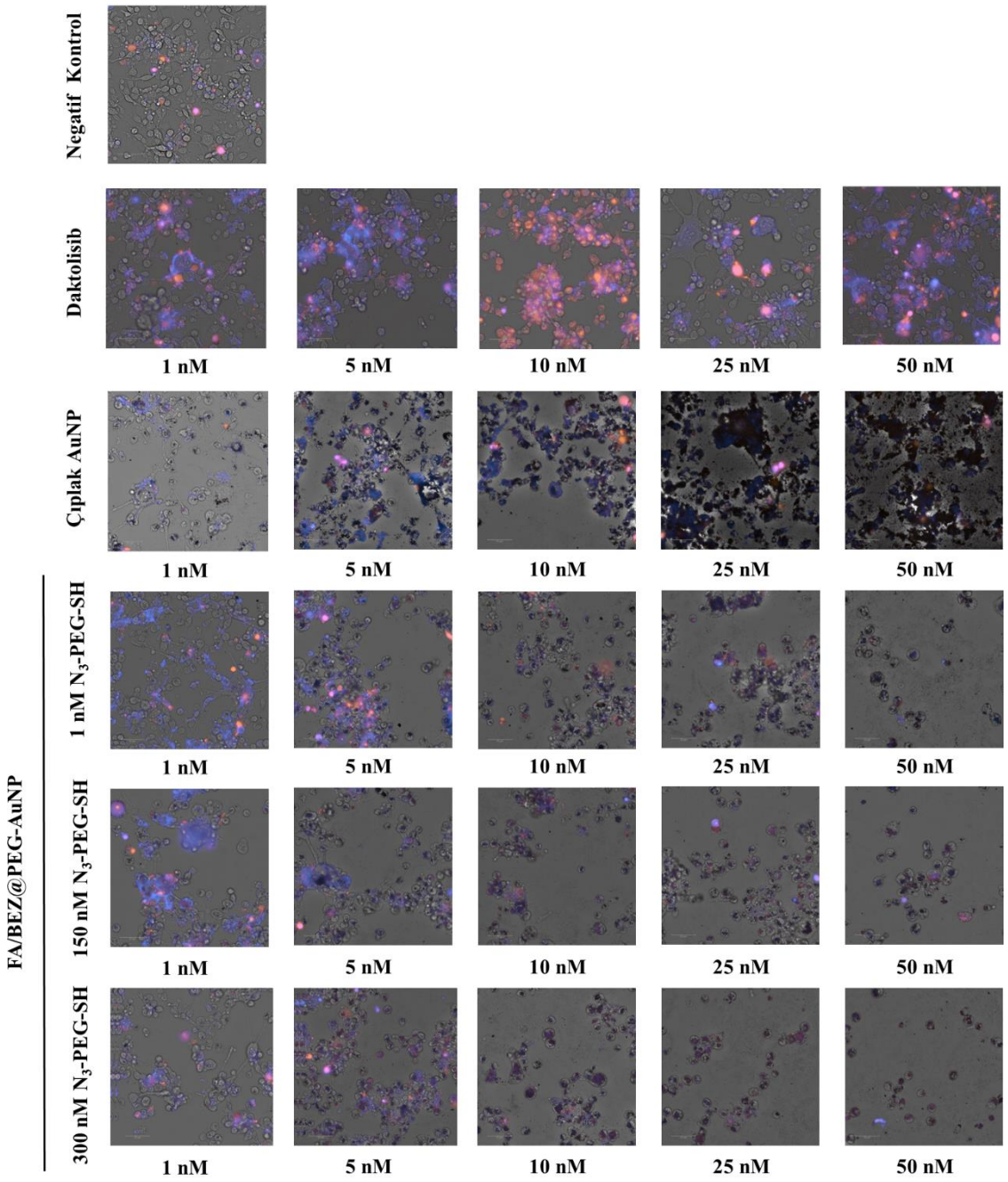
4.4. HÜCRE BOYAMA DENEYİ

Hücre boyama deneyinde 1, 150 ve 300 nM N_3-PEG-SH zincirleri ile işlevselleştirilmiş FA/BEZ@PEG-AuNP'ler ilk olarak kendi grupları içerisinde artan derişim miktarına bağlı olarak değerlendirilmiştir. MDA-MB-231^{GEM} hücre hattında artan daktolisib, çıplak AuNP ve FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP derişimine bağlı olarak tüm gruplarda PI boyasından alınan sinyal yoğunluğundaki artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.23). Geliştirilen ilaç taşıma sistemine ait ürünlerin antikanser etkisinin belirlenmesi için serbest ilaç ile FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin PI boyasından alınan sinyal yoğunluğu karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırma sonucunda geliştirilen ilaç taşıma sisteminin serbest ilaca oranla hücre canlılığını düşürerek daha etkili olduğu görülmüştür.



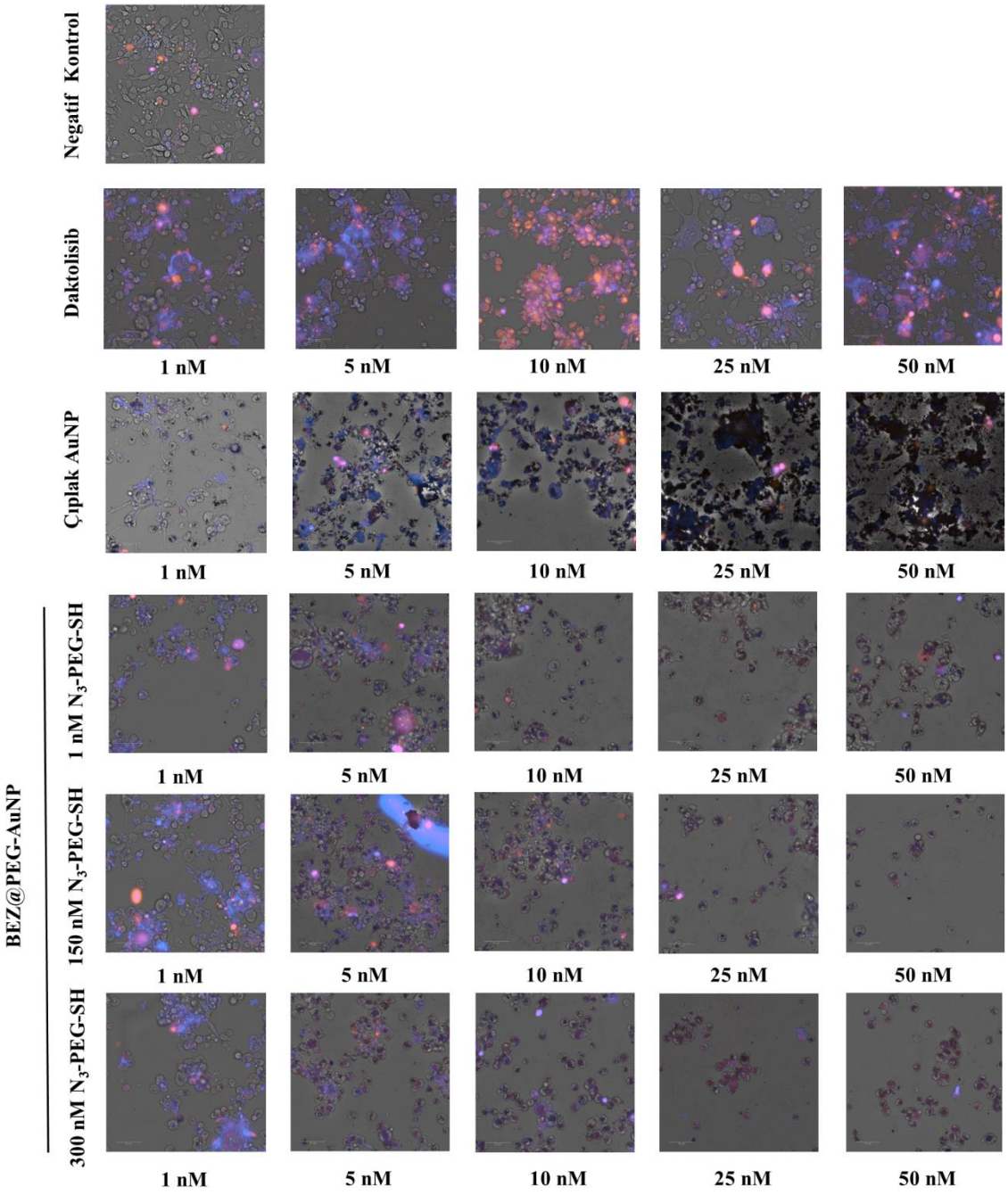
Şekil 4.23: MDA-MB-231^{GEM} hücre hattında artan FA/BEZ@PEG-AuNP, BEZ@PEG-AuNP, çıplak altın nanoparçacık ve daktolisib derişimine bağlı olarak PI boyasından hücre başına alınan sinyal yoğunluğu grafiği

Elde edilen mikroskobik görüntüler doğrultusunda FA/BEZ@PEG-AuNP derişime bağlı olarak kuyucuk başına düşen hücre sayısında azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: Farklı derişimlerde FA/BEZ@PEG-AuNP ile 72 saat muamele edilen MDA-MB-231^{GEM} hücre hattına ait görüntüler

Fakat, beklenenin aksine hücre sayısındaki azalmanın BEZ@PEG-AuNP'lerde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: Farklı derişimlerde BEZ@PEG-AuNP ile 72 saat muamele edilen MDA-MB-231^{GEM} hücre hattına ait görüntüler

5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında ÜNMK'de gemsitabin direncinin kırılmasına yönelik AuNP tabanlı hedefli ilaç taşıma sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemde çıplak AuNP'ler, yüzey işlevselleştirmesi ile hedefe yönelik ilaç taşıyıcı ajan haline getirilmiştir. PI3K/mTOR dual inhibitörü olan daktolisib, AuNP'lere klik kimya tepkimesi ile konjuge edilmiştir. Geliştirilen sistemin karakterizasyonu çeşitli spektroskopik yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nihai ilaç taşıma sistemine ait ürünlerin aktivitesi gemsitabin direncine sahip MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde incelenmiştir. Geliştirilen sistem ile daktolisibin hücre canlılığı üzerinde serbest ilaca oranla daha etkili olduğu görülmüştür.

Sistemin geliştirilmesi için taşıyıcı ajan olarak ~55 nm çapında çıplak AuNP'ler sentezlenmiştir. Üretilen AuNP'lerde polidispersite endeks ve elektrokinetik potansiyel değerlerine bakılarak kolloid sisteme ait karakterizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Polidispersite endeksi NP'lerin boyut dağılımı heterojenitesini ifade etmekte olup 0 ile 1 arasında değer almaktadır (215). Polidispersite endeksinin artması kolloid sistem içerisindeki NP'lere ait boyut dağılımının orantısız ve geniş bir aralıkta olduğunu göstermektedir (216). Bu sebeple sıfıra yakın değerler tekli boyut dağılımı anlamına gelmekte ve genellikle 0,25'ten küçük değerler kabul görmektedir (217). Sentezlenen AuNP'lerde bu değerin 0,17 olarak ölçülmesi kolloid sistem içerisinde tekli boyut dağılımı olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, AFM analizi sonucunda çıplak AuNP'lerin boyut değerleri 55,4±4,5 nm belirlenmiştir. Bu boyut değerlerinin DLS verileri ile uyuşması üretilen AuNP'lerde polidispersite endeksinin düşük olduğunu kanıtlamaktadır.

Elektrokinetik potansiyel ise NP'lerin yüzeylerindeki toplam elektriksel yükü ifade etmekte olup kolloid sistem içerisindeki stabiliteyi değerlendirmede kullanılmaktadır. Bu değerin -28 mV'den yüksek olması durumunda NP'lerde fiziksel stabilitenin düştüğü ve birbirlerine uyguladıkları itici gücün azalması ile aglomerasyonun başladığı bilinmektedir (218). Çıplak AuNP'lerde -36,1±3,9 mV olarak ölçülen elektrokinetik potansiyel değeri sistem içerisindeki parçacıkların stabil olduğunu göstermektedir.

Küresel şekilde ve 20-60 nm arası çapa sahip AuNP'lerin karakteristik olarak 520-535 nm dalgaboyu arasında tepe noktası yaptıkları literatürde yaygın olarak bilinmektedir (187,219). Bu sebeple, ~55 nm boyutunda olan çıplak AuNP'ler UV-Vis karakterizasyonu açısından hedeflendiği sınırlar dâhilinde bulunmuştur.

Literatürde, AuNP derişimi göz önüne alındığında kararlılık ve yüzey doygunluğunun elde edilebilmesi için tepkime ortamında fazla miktarda PEG zincirinin bulunması gerektiği belirtilmiştir (220,221). AuNP /PEG zincir derişim oranına bakıldığında PEG zincirleri için belirlenen optimum derişim değeri yüzey doygunluğunun elde edilebilmesi bakımından uygunluk göstermektedir. Yüzey işlevselleştirme sonrasında PEG zincirlerinin AuNP yüzeyinde aldığı konformasyonun belirlenmesi için DLS yöntemi kullanılmıştır. Fırça konformasyonunda PEG zincirlerinin yoğunluğu fazla olduğundan zincirlerde esneme görülmemekte ve buna bağlı olarak boyut artışı mantar konformasyonuna oranla daha fazla olmaktadır (222). İşlevselleştirmenin ilk adımında elde edilen N_3-AuNP'lerin tüm derişimlerinde boyutun 63,2±2,7 nm'ye ulaştığı ve PEG konformasyonun her derişim için mantar formunda olduğu görülmüştür. FA-PEG-SH ve PEG-SH ile konjuge edilmiş AuNP'lerde ise yalnızca 100 nM derişimde fırça konformasyonu gözlemlenirken, geriye kalan derişimlerde PEG zincirlerinin mantar konformasyonunu aldığı görülmüştür.

İşlevselleştirmede öncelik AuNP yüzeyinin optimum miktarda N_3-PEG-SH ile kaplanmasıdır. Sonrasında yüzeyde kalan boşlukların yüksek derişimdeki FA-PEG-SH veya PEG-SH ile doldurulması hedeflenmiştir. İşlevselleştirme sırasına bakıldığında AuNP yüzeyinde miktar bakımından baskın olan N_3-PEG-SH zincirlerinin oluşturduğu PEG konformasyonu diğer zincirler için optimum derişimin belirlenmesinde referans olarak kullanılmıştır. Bu sebeple, FA-PEG-SH için 100 nM ve PEG-SH için 10 nM derişim değeri optimum olarak belirlenmiştir. Üç farklı N_3-PEG-SH derişimi, 1 nM, 150 nM ve 300 nM, klik kimyası sonrasında yüzeye bağlanan ilaç miktarındaki değişimin gözlemlenmesi için tercih edilmiştir. FA-PEG-SH zincirlerinde 100 nM derişimin seçilmesinin sebebi ise zincir yapısında yer alan FA'nın hedefleme ajanı olarak kullanılması ve yüzeyde fırça konformasyonu alarak FA reseptörü ile etkileşime kolayca girebilmesine dayanmaktadır. PEG-SH zincirlerinde belirlenen 10 nM optimum derişim değeri ise oluşturduğu mantar konformasyonundan dolayı tercih edilmiştir. Bu

zincirler, N_3-PEG-SH zincirlerinden 3 kat daha uzun olduğundan ilaç konjugasyonunun sterik olarak engellenmemesi amacıyla 10 nM derişim tercih edilmiştir (223).

İşlevselleştirilen AuNP'lerin SPR absorbans bantlarında kırmızıya doğru 1 nm kayma gözlemlenmiştir. Bu kayma değerinin yüzeye konjuge edilen molekülün boyutuna ve kırılma endeksine bağlı olarak farklılık gösterdiği bilinmektedir (224). Literatürde konjugasyon sonrası AuNP yüzeyinde oluşan kaplama kalınlığının UV-Vis bandındaki kırmızıya doğru kaymayı artırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır (225,226). Gözlemlenen kaymanın düşük olması işlevselleştirmede kullanılan PEG zincirlerinin düşük moleküler ağırlığa sahip olması ile ilişkili olup konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Klik kimya tepkimesi sonrasında elde edilen FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerin boyut analizi DLS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizler, ilaç taşıma sistemine ait nihai ürünlerin boyutlarında 3-5 nm arasında bir artış olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak, UV-Vis spektrofotometre ile yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise SPR tepe noktasında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu durum, daktolisibin küçük molekül yapıda ilaç olması ve bu nedenle SPR'ye etki etmeyecek kadar küçük kalmasından kaynaklanmaktadır.

Konjugasyonun doğrulanması için FTIR ve Raman spektroskopi yöntemleri kullanılmıştır. FTIR analizinde PEG zincirlerinin ve uçlarında bulunan fonksiyonel grupların varlığı N_3-AuNP ve FA-N_3-AuNP'lere ait spektrumların karşılaştırılması ile belirlenmiştir. PEG zincirleri yapısındaki tekrar eden etilen glikol birimlerinde (C-H), (C-O) ve (O-H) bağlarını bulundurmaktadır. Bu bağlarda görülen gerilme ve eğilme hareketlerine ait karakteristik tepe noktalarının gözlemlenmesi ile PEG zincirlerinin varlığı belirlenmiştir.

İşlevselleştirme sonrasında elde edilen N_3-AuNP ve FA-N_3-AuNP'lerde yıkama aşamalarında stabilite kaybı yaşanmaması için %0,01 Tween-20 ile gerçekleştirilmiştir (227). Tween-20 yüzey aktif maddesine ait bantlar spektrumda da gözlenmiştir.

FA-PEG-SH zincirlerinin varlığı, FA yapısındaki pteridin halkası ve fenil aromatik halka gerilmesine karşılık gelen 1350-1750 cm^{-1} arasındaki karakteristik tepelerin görülmesiyle belirlenmiştir (228).

N_3-PEG-SH zincirlerin varlığı ise yapısındaki azid grubunun 2000-2100 cm^{-1}'de gösterdiği karakteristik tepelerin görülmesiyle belirlenmiştir (205,206). Klik kimya öncesinde bu bantlar belirgin olarak görülürken, tepkime sonrası tamamen kaybolmamış fakat yoğunluğunda azalma gözlemlenmiştir. Bunun olası sebepleri, Raman spektroskopi sonuçları ile birlikte açıklanacaktır.

Klik kimyası kullanılarak üretilen FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerde ilaç konjugasyonunun belirlenmesi için tetrazol halkasına ait karakteristik tepelerin varlığına bakılmıştır. Daktolisibin yapısında terminal siyanür (C≡N) grubu bulunmaktadır. Bu grup klik kimya tepkimesi ile N_3-PEG-SH zincirlerinde bulunan azid (N=N=N) grubu ile tepkimeye girerek tetrazol halkasını oluşturmaktadır. Yaklaşık 1050-1100 cm^{-1} arasında görülen bantların tertrazol halkasına karşılık geldiği bilinmektedir (194,195). Her iki grupta da ~1097 cm^{-1}'de keskin olarak görülen bu bantlar ilaç konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Tetrazol halkalarının varlığını aynı zamanda 3100-3300 cm^{-1} arasında görülen zayıf (N-H) bantlarına bakılarak da belirlenebilmektedir. Fakat klik kimya tepkimesi sonrasında halka yapısındaki bu bağ, ilaç konjugasyonu ile yerini (C-N) bağına bırakmaktadır. Bu aralıkta herhangi bir bağın görülmemesi ise konjugasyondaki başarıyı doğrulamaktadır. Yaklaşık olarak 1230-1350 cm^{-1} arasında görülen keskin bantlar tetrazol halkasındaki (C-N) ve (N-N=N) geriliminden kaynaklanmaktadır (195,196,229–231).

Raman spektroskopi analizinde yüzey işlevselleştirme başarısı etilen glikol birimlerinde görülen (C-H) ve (C-O) bağlarına ait sinyallerin varlığı ile doğrulanmıştır. ($-CH_2$) eğilimi, (C-O) gerilimi ve 1230-1290 cm^{-1} arasında görülen omuz oluşumu zincirdeki yapısal (C-C) gerilimini göstermektedir (208–210). Ayrıca 1480-1500 cm^{-1} aralığında görülen keskin bantlar PEG zincir yapısındaki simetrik (CH_2-CH_2) geriliminden kaynaklanmaktadır. Çıplak AuNP ile karşılaştırıldığında bu dalgasayısına denk gelen keskin bantlar PEG ile işlevselleştirmenin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Polietilen glikol zincirleri hem Raman hem de FTIR spektroskopisinde baskın bantlar göstermektedir. Bu durum, moleküler yapılarındaki kimyasal bağların güçlü emilim ve saçılma özelliklerine sahip olmasından kaynaklanır. Bu nedenle, polimer spektrumları, bu tekniklerle analiz edildiğinde diğer bileşenlerin bantlarını gölgeleyebilmektedir. PEG zincirlerinde bulunan fonksiyonel gruplara ait birçok bant

polimerler tarafından baskılanmaları sebebiyle net olarak görülememektedir. FA'nın karakteristik bantlarından biri olan 1606 cm^{-1}'deki (C=C) gerilimi PEG zincirine ait bantlar ile yakın aralıkta olması sebebiyle gözlemlenememiştir. Fakat FA-N_3-AuNP ve FA/BEZ@PEG-AuNP'lere ait spektrumda 1283 cm^{-1}'de görülen bantların glutamik asit yapısındaki (C-H) eğiliminden kaynaklandığı düşünülmektedir (211).

Raman spektroskopi ile tetrazol halkası oluşumu net bir şekilde gözlemlenememiştir. Literatürde de tetrazol halkasının seçici bir şekilde gözlenmesi için FTIR yönteminin daha başarılı olduğu belirtilmektedir (232). Elde edilen sonuçlarda da yukarıda bahsedildiği üzere FTIR yönteminde belirgin bir şekilde tetrazol bantları görülmektedir. Klik kimyası öncesi N_3-PEG-SH üzerindeki azid grubu ile daktolisib yapısındaki C≡N grubu hem FTIR spektrumunda hem de Raman spektrumunda yaklaşık olarak 2050-2150 cm^{-1} aralığında tepe noktasına sahiptir. Bu sebeple, yalnızca bu iki yöntemden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde klik tepkimesi öncesi ve sonrasında değişen oranlarda da olsa 2050-2150 cm^{-1} aralığında bant gözlenmesinin iki olasılığı bulunmaktadır. İlk olasılık, klik tepkimesi veriminin düşük olması sebebiyle boşta kalan azid gruplarının bu aralıkta bant vermesidir. İkinci olasılık ise daktolisibin içeriğindeki aromatik halkaların AuNP yüzeyine afinitesi sonucu elektrostatik olarak parçacık yüzeyine adsorplanması sonucu bu aralıkta bant gözlenmesidir. Bu olasılıkların hangisinin geçerli olduğu ise TGA sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde anlam kazanmıştır.

Altın nanoparçacık yüzeyine konjuge edilen PEG zincir miktarının ayrı ayrı hesaplanması ve klik kimya tepkime veriminin belirlenmesi için TGA yöntemi kullanılmıştır. TGA, sıcaklık artışına bağlı gelişen kütle kaybını hassas bir şekilde analiz eden bir yöntemdir (233). Sıcaklık artışı ile maddelerde gerçekleşen bozunma tepkimeleri kütle kaybına sebep olmakta ve bu kayıp eğri grafiği oluşturmaktadır. AuNP yüzeyine konjuge edilen PEG zincir ve ilaç miktarı TGA yönteminden elde edilen grafikler üzerinden belirlenen kütle kayıpları dikkate alınarak belirlenmiştir.

Yaklaşık 100-120°C arasında görülen düşük miktardaki kütle kayıpları madde içerisindeki nemin çıkışından kaynaklanmaktadır. Bu sebeple 120°C ve öncesinde görülen kütle kayıpları hesaplamaya dâhil edilmemiştir. Hesaplamalarda 120-700°C arasında görülen yüzdece kütle kaybı başlangıçtaki kütle miktarına oranlanarak net kütle kaybı belirlenmiştir. AuNP yüzeyine bağlanan PEG zincir ve ilaç miktarının hesabı,

işlevselleştirme boyunca kademeli bir şekilde elde edilen ürünlerdeki kütle kayıplarının bir önceki aşamada elde edilen ürün kütle kaybından çıkarılmasıyla bulunmuştur. Böylelikle hedef moleküle ait net kütle kayıp miktarı bulunmuştur. Örneğin, AuNP yüzeyine bağlanan FA-PEG-SH zincir miktarının bulunabilmesi için belirtilen sıcaklık aralığında FA-N_3-AuNP'ye ait toplam %kütle kaybının N_3-AuNP'ye ait %kütle kaybından çıkarılması gerekmektedir. Bu yol ile elde edilen %kütle miktarı FA-PEG-SH zincirine ait olup başlangıç kütle miktarına oranlandığında AuNP yüzeyine bağlanan madde miktarı elde edilmiştir. Fakat bu elde edilen değer tüm AuNP'leri kapsadığından sonrasında bu değer işlevselleştirme anında ortamda bulunan AuNP miktarına bölünerek bir AuNP yüzeyine düşen PEG miktarı belirlenmiştir.

Sıcaklık artışı ile AuNP yüzeyine bağlanmış PEG zincirlerinin 300-450°C arasında yüzeyden ayrılmaya başladığı bilinmektedir (171). Fakat bozunma başlangıç sıcaklığı FA-SH-PEG zincirleri için farklıdır (234). Bu sebeple, AuNP yüzeyine bağlanan PEG zincir miktarı belirlenirken 120-400°C arasında gözlenen kütle kayıpları dikkate alınmıştır. Daktolisib miktarı belirlenirken de 120-700°C arasında gözlenen kütle kayıpları hesaplamaya dâhil edilmiştir.

Artan zincir derişimine bağlı olarak bir AuNP yüzeyine bağlanan N_3-PEG-SH zincir sayısında artış gözlemlenirken, FA-PEG-SH zincir miktarının azaldığı görülmüştür. Bu durum AuNP'lerin artan N_3-PEG-SH derişimine bağlı olarak yüzey doygunluğuna ulaşması ve FA-PEG-SH zincirlerinin bağlanması için yeterli yüzey alanının kalmaması ile açıklanmaktadır. AuNP yüzeyine konjuge edilen daktolisib miktarında N_3-PEG-SH zincir derişimi ile doğru orantılı olarak artış gözlemlenmiştir. Fakat beklenenin aksine daktolisib miktarı N_3-PEG-SH miktarıyla aynı değil, yaklaşık olarak iki kat fazla bulunmuştur. Bu da FTIR ve Raman spektroskopi yönteminde düşünülen iki olasılıktan daktolisibin içeriğindeki aromatik halkaların AuNP yüzeyine afinitesi sonucu elektrostatik olarak parçacık yüzeyine adsorplanması olayının gerçekleştiğine işaret etmektedir (235).

Liyofilizasyon stabilite testi sonunda tüm ürünlerde boyut artışı ve SPR tepe noktalarında kırmızıya kayma gözlemlenmiştir. Ancak bu değişimlerin, çıplak AuNP'lerde FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP örneklerine kıyasla daha belirgin şekilde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda, PEG zincirleri ile gerçekleştirilen yüzey kaplamasının stabiliteyi artırdığı ve bu nedenle

FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP örneklerinde liyofilizasyon veriminin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Otoklav sterilizasyon testinde BEZ@PEG-AuNP ve FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin her ikisinde de anlamlı oranda renk değişimi gözlemlenmiştir. Düşük stabilitenin simgesi olan bu renk değişimine bakıldığında BEZ@PEG-AuNP'lerin FA/BEZ@PEG-AuNP'lere kıyasla otoklav sterilizasyonunda daha stabil kalabildiği görülmüştür. Fakat bu sterilizasyon yönteminin geliştirilen ilaç taşıma sistemi için uygun olmadığı bunun yerine filtrasyon gibi ısı gerektirmeyen ve ürün stabilitesini, işlevselliğini tehlikeye atmadan sterilizasyon sağlayan yöntemlerinin tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır (236). Buna karşılık ortam pH değerine bağlı gerçekleştirilen stabilite testinde ise FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin BEZ@PEG-AuNP'lere oranla 2 saatlik inkübasyon süresinde tüm pH değerlerinde daha stabil kaldığı görülmüştür. Fiziksel olarak gözlemlenen renk değişimi ve fizikokimyasal olarak SPR bantlarında gerçekleşen belirgin kaymalar BEZ@PEG-AuNP'lerin pH değişime karşı duyarlı olduğunu kanıtlamaktadır. Geliştirilen ilaç taşıma sisteminde nihai taşıma ajanı olan FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin 2 saatlik inkübasyon süresi içerisinde gösterdiği stabilite biyolojik sistemler için uygun olduğunu göstermektedir (237).

Nanoparçacıkların hücre içerisine alımının ve tutulumunun genel olarak 24 saat içerisinde tamamlandığı bilinmektedir (238). HeLa hücre hattında yapılan bir çalışmada, yaklaşık 75 nm çapındaki AuNP'lerin HeLA hücrelerinde reseptör hedefli hücre içine alım yarı ömrünün ilk 2 saat içerisinde gerçekleştiği görülmüştür (134). Bir başka çalışmada, MDA-MB-468 ve MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde reseptör hedefli NP'lerin hücre içine alımının 15, 30 ve 45 dakikalık inkübasyon zamanına bağlı değişimi incelenmiş ve çok sayıda NP içeren nanokeseciklerin yaklaşık %75'inde lizozom içerisinde dağılım gerçekleştiği görülmüştür (239). Bu noktada FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin hücre içerisine alımının ve ilaç salınımının gerçekleştiği zaman diliminde farklı pH değerlerine karşı gösterdiği stabilite ile ideal olarak değerlendirilebilir.

Geliştirilen sistemin MDA-MB-231^{GEM} hücre hattı üzerindeki antikanser etkisi fenotipik profilleme analizi ile belirlenmiştir. Fenotipik profilleme analizinde her bir parametreden alınan floresan sinyal sayısal değerlere dönüştüğünden görüntü analizinden kantitatif de bir sonuç çıkarılabilmektedir (240). Böylelikle, ilaç etkileşimi

çalışmalarında, bir maddenin hücre üzerinde moleküler ve fenotipik olarak oluşturduğu değişiklikler ile ilaç yanıtı hakkında fikir edinilmektedir (241). DAPI ve PI floresan boyaları ile gerçekleştirilen hücre boyama deneyinde DAPI, DNA'nın minör oluklarındaki adenin ve timin bazları bakımından zengin bölgelere bağlanarak çekirdek boyaması gerçekleştiren floresan bir boya kompleksidir (242). DAPI boyası genellikle fikse edilmiş hücrelerin çekirdek boyamasında kullanılmaktadır. Fakat boyama sırasında yüksek derişim kullanıldığı takdirde canlı hücrelerdeki çekirdekleri de boyadığı bilinmektedir (243). Bu sebeple hücre boyama deneyinde DAPI boyası canlı hücrelerin belirlenmesi için kullanılmıştır. PI ise ölü hücreleri canlı hücrelerden ayırmak için kullanılan floresan bir boyadır. PI hücre ölümü sonrasında görülen membran bozulumundan yararlanarak hücre içerisine girmekte ve DNA'ya bağlanarak çekirdek boyaması gerçekleştirmektir (244). PI boyası, yapısı gereği canlı hücreleri sağlam membranlarında geçememesi ile yalnızca ölü hücrelerin çekirdek boyamasını gerçekleştirmektedir. Bu sebeple hücre boyama deneyinde DAPI boyası ölü hücrelerin belirlenmesi için kullanılmıştır.

Çıplak AuNP, FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerde her grup için artan derişime bağlı olarak PI kanalından alınan sinyal yoğunluğunda artışı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda sinyal yoğunluğunun sistem içerisindeki N_3- PEG-SH zincir derişimine bağlı olarak da artması, ilaç konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini kanıtlamakta ve TGA'dan elde edilen sonuçları doğrulamaktadır.

Kontrol grubuna oranla çıplak AuNP'lerin de hücre canlılığını derişime bağlı olarak düşürdüğü görülmüştür. Bu toksisite, çıplak AuNP'lerin yüzeyinde stabilizasyon ajanı olarak bulunan sitrat iyonlarından kaynaklanmaktadır (245,246). Fakat FA/BEZ@PEG-AuNP ve BEZ@PEG-AuNP'lerde PI kanalından alınan sinyal yoğunluğunun çıplak AuNP'ler ve serbest ilaçtan fazla olması geliştirilen ilaç taşıma sisteminin başarısını göstermektedir. Hedefli ilaç taşıma sistemine ait ürünler karşılaştırıldığında yapısındaki hedefleme ajanı sayesinde FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin MDA-MB-231^{GEM} hücre hattı üzerinde daha etkili olması beklenirken BEZ@PEG-AuNP'lerin FA/BEZ@PEG-AuNP'lere kıyasla 25 nM derişime kadar tüm N_3- PEG-SH zincir derişimlerinde daha etkili olduğu görülmüştür. Bu durum, BEZ@PEG-AuNP'lerin hücre içerisine endositoz ile alındığını göstermektedir. Fakat PI kanalından alınan sinyal yoğunluğuna bakıldığında 50 nM derişimde, FA/BEZ@PEG-AuNP'lerin

BEZ@PEG-AuNP'lere kıyasla hücre ölüm oranını daha fazla artırdığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda geliştirilen sistemin serbest ilaca oranla antikanser etkisinin daha fazla olduğu ve böylece ilaç etkinliğinin arttığı görülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Geliştirilen hedefli ilaç taşıma sisteminin gemsitabine dirençli MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde serbest ilaca kıyasla daha yüksek oranda toksik etki oluşturduğu ve böylece hücre canlılığını azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Geliştirilen sistemde ilaç konjugasyonu klik kimya ile gerçekleştirilmiştir. Fakat FTIR ve Raman spektroskopi ile TGA sonuçları değerlendirildiğinde daktolisibin kimyasal yapısı sonucu AuNP yüzeyine özgün olmayan etkileşimler ile adsorplandığı düşünülmektedir.

Bulgular doğrultusunda, ilaç konjugasyonu sonrasında yüzeye adsorplanan ilaç moleküllerinin uzaklaştırılması için AuNP yüzeyinin tekrardan PEG-SH zincirleri ile kaplanması önerilmektedir. PEG-SH zincirleri yapısındaki tiyol grubunun altına karşı gösterdiği yüksek afinite sayesinde yüzeye hızlıca bağlanacağı ve böylelikle yüzeye daha zayıf bir şekilde adsorplanan daktolisibin yüzeyden ligand değişimi ile ayrılacağı öngörülmektedir.

Yapılan hücre kültürü deneyinde hedefleme ajanı olarak kullanılan FA'nın hedefleme etkisinin yeterli oranda gözlemlenemediği görülmüştür. İleriki moleküler deneylerde aynı etkinin gözlemlenmesi durumunda AuNP yüzeyine konjuge edilen FA-PEG-SH miktarının tekrardan optimize edilerek artırılması önerilmektedir.

Geliştirilen sistemin MDA-MB-231^{GEM} hücre hattı üzerinde oluşturduğu toksik etkinliğinin daha iyi anlaşılabilmesi için moleküler düzeydeki çalışmalara yer verilmesi önerilmektedir. Akış sitometresi ile hücrelerin apoptotik ve nekrotik eğilimleri değerlendirilebilir. Parçalanmış kaspaz 3, BCL-2 gibi apoptoz yolakları ile ilişkili genlerin ifade seviyelerine bakılarak moleküler düzeydeki değişimler doğrulanabilir. Ayrıca geliştirilen sistemin hangi sinyal yolağı üzerinde hücre ölümüne sebep olduğunu belirlemek için RNA dizileme yöntemine başvurulabilir.

KAYNAKLAR

1. Turashvili G, Brogi E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. Front Med [Internet]. 08 Aralık 2017 [a.yer 27 Haziran 2024];4. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2017.00227/full
2. Fumagalli C, Barberis M. Breast Cancer Heterogeneity. Diagnostics. Eylül 2021;11(9):1555.
3. Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. Advances in Anatomic Pathology. Ocak 2020;27(1):27.
4. Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. Pathology. 01 Şubat 2017;49(2):111-9.
5. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. J Cancer. 2016;7(10):1281-94.
6. Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in Breast Cancer: A Review and Update. Advances in Anatomic Pathology. Mart 2014;21(2):100.
7. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol. Şubat 2001;2(2):127-37.
8. Schlam I, Swain SM. HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. npj Breast Cancer. 20 Mayıs 2021;7(1):1-12.
9. Moasser MM. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene. 04 Ekim 2007;26(45):6469-87.
10. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, vd. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 12 Mayıs 1989;244(4905):707-12.
11. Tavčar Kunstič T, Debeljak N, Fon Tacer K. Heterogeneity in hormone-dependent breast cancer and therapy: Steroid hormones, HER2, melanoma antigens, and cannabinoid receptors. Advances in Cancer Biology - Metastasis. 01 Temmuz 2023;7:100086.
12. Daniel AR, Hagan CR, Lange CA. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer. Expert Rev Endocrinol Metab. 01 Mayıs 2011;6(3):359-69.
13. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, vd. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. Ağustos 2000;406(6797):747-52.
14. Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, vd. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. The Breast. 01 Kasım 2015;24:S26-35.
15. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. World J Clin Oncol. 10 Ağustos 2014;5(3):412-24.
16. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, vd. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 11 Eylül 2001;98(19):10869-74.
17. Hon JDC, Singh B, Sahin A, Du G, Wang J, Wang VY, vd. Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. Am J Cancer Res. 01 Eylül 2016;6(9):1864-72.
18. Zagami P, Carey LA. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. npj Breast Cancer. 20 Ağustos 2022;8(1):1-10.
19. Alluri P, Newman L. Basal-like and Triple Negative Breast Cancers: Searching For Positives Among Many Negatives. Surg Oncol Clin N Am. Temmuz 2014;23(3):567-77.
20. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, vd. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res. 01 Ağustos 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
21. Pogoda K, Niwińska A, Murawska M, Pieńkowski T. Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. Med Oncol. 05 Ocak 2013;30(1):388.
22. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer—current status and future directions. Annals of Oncology. 01 Aralık 2009;20(12):1913-27.
23. King TD, Suto MJ, Li Y. The Wnt/β-catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. J Cell Biochem. Ocak 2012;113(1):13-8.
24. Edwards A, Brennan K. Notch Signalling in Breast Development and Cancer. Frontiers in Cell and Developmental Biology [İnternet]. 2021 [a.yer 15 Haziran 2023];9. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.692173
25. Pohl SG, Brook N, Agostino M, Arfuso F, Kumar AP, Dharmarajan A. Wnt signaling in triple-negative breast cancer. Oncogenesis. Nisan 2017;6(4):e310-e310.

26. Zhu H, Bhaijee F, Ishaq N, Pepper DJ, Backus K, Brown AS, vd. Correlation of Notch1, pAKT and nuclear NF-κB expression in triple negative breast cancer. Am J Cancer Res. 03 Nisan 2013;3(2):230-9.
27. Abdin SM, Tolba MF, Zaher DM, Omar HA. Nuclear factor-κB signaling inhibitors revert multidrug-resistance in breast cancer cells. Chemico-Biological Interactions. 01 Mayıs 2021;340:109450.
28. Bhateja P, Cherian M, Majumder S, Ramaswamy B. The Hedgehog Signaling Pathway: A Viable Target in Breast Cancer? Cancers (Basel). 07 Ağustos 2019;11(8):1126.
29. Hu Q, Bian Q, Rong D, Wang L, Song J, Huang HS, vd. JAK/STAT pathway: Extracellular signals, diseases, immunity, and therapeutic regimens. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 23 Şubat 2023 [a.yer 27 Haziran 2024];11. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2023.1110765/full
30. Hosford SR, Miller TW. Clinical potential of novel therapeutic targets in breast cancer: CDK4/6, Src, JAK/STAT, PARP, HDAC, and PI3K/AKT/mTOR pathways. Pharmacogenomics and Personalized Medicine. 06 Ağustos 2014;7(null):203-15.
31. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 01 Haziran 2010;15(2):117-34.
32. Uddin F, Hoque M. Non-flavonoids Targeting Cancer Stem Cells: A Promising Therapeutic Avenue for Cancer Treatment. Içinde: Tabrez S, Imran Khan M, editörler. Polyphenols-based Nanotherapeutics for Cancer Management [Internet]. Singapore: Springer; 2021 [a.yer 15 Haziran 2023]. s. 289-334. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-981-16-4935-6_8
33. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Breast Cancer: From Molecular Landscape to Clinical Aspects. International Journal of Molecular Sciences. Ocak 2021;22(1):173.
34. López-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM, Millar EKA, Qiu MR, Crea P, vd. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. International Journal of Cancer. 2010;126(5):1121-31.
35. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo WL, Davies M, vd. An Integrative Genomic and Proteomic Analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT Mutations in Breast Cancer. Cancer Res. 01 Ağustos 2008;68(15):6084-91.
36. Kriegsmann M, Endris V, Wolf T, Pfarr N, Stenzinger A, Loibl S, vd. Mutational profiles in triple-negative breast cancer defined by ultradeep multigene sequencing show high rates of PI3K pathway alterations and clinically relevant entity subgroup specific differences. Oncotarget. 16 Eylül 2014;5(20):9952-65.
37. Cossu-Rocca P, Orrù S, Muroni MR, Sanges F, Sotgiu G, Ena S, vd. Analysis of PIK3CA Mutations and Activation Pathways in Triple Negative Breast Cancer. PLOS ONE. Kas 2015;10(11):e0141763.
38. Yagata H, Kajiura Y, Yamauchi H. Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. Breast Cancer. 01 Temmuz 2011;18(3):165-73.
39. Baranova A, Krasnoselskyi M, Starikov V, Kartashov S, Zhulkevych I, Vlasenko V, vd. Triple-negative breast cancer: current treatment strategies and factors of negative prognosis. J Med Life. Şubat 2022;15(2):153-61.
40. Freedman GM, Anderson PR, Li T, Nicolaou N. Locoregional recurrence of triple-negative breast cancer after breast-conserving surgery and radiation. Cancer. 2009;115(5):946-51.
41. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. Arch Gynecol Obstet. 01 Şubat 2016;293(2):247-69.
42. Amos KD, Adamo B, Anders CK. Triple-negative breast cancer: an update on neoadjuvant clinical trials. Int J Breast Cancer. 2012;2012:385978.
43. Poggio F, Bruzzone M, Ceppi M, Pondé NF, Valle GL, Mastro LD, vd. Platinum-based neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Annals of Oncology. 01 Temmuz 2018;29(7):1497-508.
44. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu S cang. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. Breast Cancer Research. 09 Haziran 2020;22(1):61.
45. Marinello J, Delcuratolo M, Capranico G. Anthracyclines as Topoisomerase II Poisons: From Early Studies to New Perspectives. International Journal of Molecular Sciences. Kasım 2018;19(11):3480.
46. Lim PT, Goh BH, Lee WL. 3 - Taxol: Mechanisms of action against cancer, an update with current research. Içinde: Swamy MK, Pullaiah T, Chen ZS, editörler. Paclitaxel [Internet]. Academic Press; 2022 [a.yer 15 Haziran 2023]. s. 47-71. Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323909518000072
47. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nat Rev Clin Oncol. Kasım 2009;6(11):638-47.

48. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. European Journal of Pharmacology. 05 Ekim 2014;740:364-78.
49. Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. Molecules. Ağustos 2008;13(8):1551-69.
50. Hui YF, Reitz J. Gemcitabine: A cytidine analogue active against solid tumors. American Journal of Health-System Pharmacy. 15 Ocak 1997;54(2):162-70.
51. Guchelaar HJ, Richel DJ, van Knapen A. Clinical, toxicological and pharmacological aspects of gemcitabine. Cancer Treatment Reviews. 01 Ocak 1996;22(1):15-31.
52. Gesto DS, Cerqueira NMFSA, Fernandes PA, Ramos MJ. Gemcitabine: a critical nucleoside for cancer therapy. Curr Med Chem. 2012;19(7):1076-87.
53. Moysan E, Bastiat G, Benoit JP. Gemcitabine versus Modified Gemcitabine: A Review of Several Promising Chemical Modifications. Mol Pharmaceutics. 04 Şubat 2013;10(2):430-44.
54. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I, Mazzei T. Cellular pharmacology of gemcitabine. Annals of Oncology. 01 Mayıs 2006;17:v7-12.
55. Heinemann V. Gemcitabine in metastatic breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther. Haziran 2005;5(3):429-43.
56. Hamed SS, Straubinger RM, Jusko WJ. Pharmacodynamic modeling of cell cycle and apoptotic effects of gemcitabine on pancreatic adenocarcinoma cells. Cancer Chemother Pharmacol. 01 Eylül 2013;72(3):553-63.
57. Cappella P, Tomasoni D, Faretta M, Lupi M, Montalenti F, Viale F, vd. Cell cycle effects of gemcitabine. International Journal of Cancer. 2001;93(3):401-8.
58. Barton-Burke M. Gemcitabine: A pharmacologic and clinical overview. Cancer Nursing. Nisan 1999;22(2):176.
59. Blackstein M, Vogel CL, Ambinder R, Cowan J, Pearce P, Iglesias J. Phase II study of gemcitabine in patients with metastatic breast cancer. European Journal of Cancer [Internet]. 1997 [a.yer 15 Haziran 2023];33(S8). Erişim adresi: https://www.elibrary.ru/item.asp?id=420447
60. Possinger K, Kaufmann M, Coleman R, Stuart NS, Helsing M, Ohnmacht U, vd. Phase II study of gemcitabine as first-line chemotherapy in patients with advanced or metastatic breast cancer. Anticancer Drugs. 01 Şubat 1999;10(2):155-62.
61. Spielmann M, Llombart-Cussac A, Kalla S, Espié M, Namer M, Ferrero JM, vd. Single-Agent Gemcitabine Is Active in Previously Treated Metastatic Breast Cancer. Oncology. 20 Haziran 2001;60(4):303-7.
62. Sebastiani V, Ricci F, Rubio-Viquiera B, Kulesza P, Yeo CJ, Hidalgo M, vd. Immunohistochemical and Genetic Evaluation of Deoxycytidine Kinase in Pancreatic Cancer: Relationship to Molecular Mechanisms of Gemcitabine Resistance and Survival. Clinical Cancer Research. 25 Nisan 2006;12(8):2492-7.
63. Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ. Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). Drug Resist Updat. Şubat 2002;5(1):19-33.
64. Bouffard DY, Laliberté J, Momparler RL. Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. Biochemical Pharmacology. 05 Mayıs 1993;45(9):1857-61.
65. Arlt A, Gehrz A, Müerköster S, Vorndamm J, Kruse ML, Fölsch UR, vd. Role of NF-κB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. Oncogene. Mayıs 2003;22(21):3243-51.
66. Nedeljković M, Damjanović A. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer—How We Can Rise to the Challenge. Cells. Eylül 2019;8(9):957.
67. Yang XL, Lin FJ, Guo YJ, Shao ZM, Ou ZL. Gemcitabine resistance in breast cancer cells regulated by PI3K/AKT-mediated cellular proliferation exerts negative feedback via the MEK/MAPK and mTOR pathways. OncoTargets and Therapy. 31 Aralık 2014;7:1033-42.
68. Zheng Q, Yao D, Cai Y, Zhou T. NLRP3 augmented resistance to gemcitabine in triple-negative breast cancer cells via EMT/IL-1β/Wnt/β-catenin signaling pathway. Bioscience Reports. 03 Temmuz 2020;40(7):BSR20200730.
69. Qin SY, Cheng YJ, Lei Q, Zhang AQ, Zhang XZ. Combinational strategy for high-performance cancer chemotherapy. Biomaterials. 01 Temmuz 2018;171:178-97.
70. Xie X, Lee J, Liu H, Pearson T, Lu AY, Tripathy D, vd. Birinapant Enhances Gemcitabine's Antitumor Efficacy in Triple-Negative Breast Cancer by Inducing Intrinsic Pathway-Dependent Apoptosis. Mol Cancer Ther. Şubat 2021;20(2):296-306.

71. Jiang C, Zhang Y, Xu X, Su S, Pan H, Jiang A. The inhibitory effects of lobaplatin, or in combination with gemcitabine on triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. Oncologie. 01 Ocak 2023;25(1):81-91.
72. Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Colomer R, De Llorens R, Brunet J, Menendez JA. Sequence-dependent synergism and antagonism between paclitaxel and gemcitabine in breast cancer cells: The importance of scheduling. International Journal of Oncology. 01 Ocak 2008;32(1):113-20.
73. Mortlock A, Foote K, Kettle J, Aquila B. Kinase Inhibitors in Cancer. İçinde: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering [İnternet]. Elsevier; 2014 [a.yer 28 Haziran 2024]. Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095472110339
74. Kong D, Zhang Z. Chapter 12 - PI3K/AKT Inhibitors as Sensitizing Agents for Cancer Chemotherapy. Içinde: Chen ZS, Yang DH, editörler. Protein Kinase Inhibitors as Sensitizing Agents for Chemotherapy [Internet]. Academic Press; 2019 [a.yer 15 Haziran 2023]. s. 187-205. (Cancer Sensitizing Agents for Chemotherapy; c. 4). Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128164358000122
75. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, vd. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. Molecular Cancer Therapeutics. 21 Temmuz 2008;7(7):1851-63.
76. Wang Y, Tortorella M. Molecular design of dual inhibitors of PI3K and potential molecular target of cancer for its treatment: A review. European Journal of Medicinal Chemistry. 15 Ocak 2022;228:114039.
77. Brachmann SM, Hofmann I, Schnell C, Fritsch C, Wee S, Lane H, vd. Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 29 Aralık 2009;106(52):22299-304.
78. Awasthi N, Yen PL, Schwarz MA, Schwarz RE. The efficacy of a novel, dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 to enhance chemotherapy and antiangiogenic response in pancreatic cancer. Journal of Cellular Biochemistry. 2012;113(3):784-91.
79. Wu YY, Wu HC, Wu JE, Huang KY, Yang SC, Chen SX, vd. The dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 restricts the growth of lung cancer tumors regardless of EGFR status, as a potent accompanist in combined therapeutic regimens. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 01 Temmuz 2019;38(1):282.
80. Blaser B, Waselle L, Dormond-Meuwly A, Dufour M, Roulin D, Demartines N, vd. Antitumor activities of ATP-competitive inhibitors of mTOR in colon cancer cells. BMC Cancer. 08 Mart 2012;12(1):86.
81. Xie G, Wang Z, Chen Y, Zhang S, Feng L, Meng F, vd. Dual blocking of PI3K and mTOR signaling by NVP-BEZ235 inhibits proliferation in cervical carcinoma cells and enhances therapeutic response. Cancer Letters. 01 Mart 2017;388:12-20.
82. Li B, Zhang X, Ren Q, Gao L, Tian J. NVP-BEZ235 Inhibits Renal Cell Carcinoma by Targeting TAK1 and PI3K/Akt/mTOR Pathways. Front Pharmacol [Internet]. 10 Ocak 2022 [a.yer 28 Haziran 2024];12. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.781623/full
83. Carlo MI, Molina AM, Lakhman Y, Patil S, Woo K, DeLuca J, vd. A Phase Ib Study of BEZ235, a Dual Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. The Oncologist. 01 Temmuz 2016;21(7):787-788d.
84. Salazar R, Garcia-Carbonero R, Libutti SK, Hendifar AE, Custodio A, Guimbaud R, vd. Phase II Study of BEZ235 versus Everolimus in Patients with Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor-Naïve Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors. Oncologist. Temmuz 2018;23(7):766-e90.
85. Wise-Draper TM, Moorthy G, Salkeni MA, Karim NA, Thomas HE, Mercer CA, vd. A Phase Ib Study of the Dual PI3K/mTOR Inhibitor Dactolisib (BEZ235) Combined with Everolimus in Patients with Advanced Solid Malignancies. Targ Oncol. 01 Haziran 2017;12(3):323-32.
86. Bendell JC, Kurkjian C, Infante JR, Bauer TM, Burris HA, Greco FA, vd. A phase 1 study of the sachet formulation of the oral dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 given twice daily (BID) in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs. 01 Nisan 2015;33(2):463-71.
87. Fazio N, Buzzoni R, Baudin E, Antonuzzo L, Hubner RA, Lahner H, vd. A Phase II Study of BEZ235 in Patients with Everolimus-resistant, Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumours. Anticancer Research. 01 Şubat 2016;36(2):713-9.
88. Yu Z, Xie G, Zhou G, Cheng Y, Zhang G, Yao G, vd. NVP-BEZ235, a novel dual PI3K–mTOR inhibitor displays anti-glioma activity and reduces chemoresistance to temozolomide in human glioma cells. Cancer Letters. 10 Ekim 2015;367(1):58-68.

89. Manara MC, Nicoletti G, Zambelli D, Ventura S, Guerzoni C, Landuzzi L, vd. NVP-BEZ235 as a New Therapeutic Option for Sarcomas. Clinical Cancer Research. 14 Ocak 2010;16(2):530-40.
90. Schult C, Dahlhaus M, Glass A, Fischer K, Lange S, Freund M, vd. The Dual Kinase Inhibitor NVP-BEZ235 in Combination with Cytotoxic Drugs Exerts Anti-proliferative Activity towards Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. Anticancer Research. 01 Şubat 2012;32(2):463-74.
91. Gohr K, Hamacher A, Engelke LH, Kassack MU. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR overcomes cisplatin resistance in the triple negative breast cancer cell line HCC38. BMC Cancer. 03 Kasım 2017;17(1):711.
92. Hulla J, Sahu S, Hayes A. Nanotechnology: History and future. Hum Exp Toxicol. 01 Aralık 2015;34(12):1318-21.
93. Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom. Engineering and Science. 01 Şubat 1960;23(5):22-36.
94. N T. On the Basic Concept of "Nano-Technology". Proc Intl Conf Prod Eng Tokyo, Part II, 1974 [İnternet]. 1974 [a.yer 28 Haziran 2024]; Erişim adresi: https://cir.nii.ac.jp/crid/1572261550373135488
95. Fanfair D, Desai S, Kelty C. The early history of nanotechnology. Connexions. 2007;6:1-15.
96. Ealia SAM, Saravanakumar MP. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP Conf Ser: Mater Sci Eng. Kasım 2017;263(3):032019.
97. Li C, Wang J, Wang Y, Gao H, Wei G, Huang Y, vd. Recent progress in drug delivery. Acta Pharmaceutica Sinica B. 01 Kasım 2019;9(6):1145-62.
98. Singh S, Pandey VK, Agarwal RPT and V. Nanoparticle based drug delivery system: Advantages and applications. INDJST. 03 Mart 2011;4(3):177-84.
99. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. International Journal of Nanomedicine. 02 Şubat 2015;10:975-99.
100. Nsairat H, Khater D, Sayed U, Odeh F, Al Bawab A, Alshaer W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. Heliyon. 01 Mayıs 2022;8(5):e09394.
101. Maherani B, Arab-Tehrany E, R. Mozafari M, Gaiani C, Linder M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. Current Nanoscience. 01 Haziran 2011;7(3):436-52.
102. Guimarães D, Cavaco-Paulo A, Nogueira E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. International Journal of Pharmaceutics. 15 Mayıs 2021;601:120571.
103. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. International Journal of Pharmaceutics. 26 Ağustos 1997;154(2):123-40.
104. Caminade AM, Turrin CO. Dendrimers for drug delivery. J Mater Chem B. 11 Haziran 2014;2(26):4055-66.
105. Dykes GM. Dendrimers: a review of their appeal and applications. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2001;76(9):903-18.
106. Chis AA, Dobrea C, Morgovan C, Arseniu AM, Rus LL, Butuca A, vd. Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine. Molecules. Ocak 2020;25(17):3982.
107. Thiagarajan G, Greish K, Ghandehari H. Charge affects the oral toxicity of poly(amidoamine) dendrimers. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 01 Haziran 2013;84(2):330-4.
108. Palmerston Mendes L, Pan J, Torchilin VP. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. Molecules. Eylül 2017;22(9):1401.
109. Sowinska M, Urbanczyk-Lipkowska Z. Advances in the chemistry of dendrimers. New J Chem. 19 Mayıs 2014;38(6):2168-203.
110. Singh J, Jain K, Mehra NK, Jain NK. Dendrimers in anticancer drug delivery: mechanism of interaction of drug and dendrimers. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 02 Ekim 2016;44(7):1626-34.
111. Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, vd. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. Molecules. Ocak 2020;25(16):3731.
112. El-Say KM, El-Sawy HS. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. Int J Pharm. 07 Ağustos 2017;528(1-2):675-91.
113. Sardoiwala MN, Kaundal B, Roy Choudhury S. Chapter 37 - Development of Engineered Nanoparticles Expediting Diagnostic and Therapeutic Applications Across Blood–Brain Barrier. İçinde: Mustansar Hussain C, editör. Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications [İnternet]. Elsevier; 2018 [a.yer 28 Haziran 2024]. s. 696-709. (Micro and Nano Technologies). Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128133514000389
114. Vauthier C, Bouchemal K. Processing and Scale-up of Polymeric Nanoparticles. Içinde: Prokop A, editör. Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011 [a.yer 28 Haziran 2024]. s. 433-56. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-1248-5_16

115. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. Nature. Kasım 1991;354(6348):56-8.
116. Beg S, Rizwan M, Sheikh AM, Hasnain MS, Anwer K, Kohli K. Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 01 Şubat 2011;63(2):141-63.
117. Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. Current Opinion in Chemical Biology. 01 Aralık 2005;9(6):674-9.
118. Ahmad MZ, Akhter S, Jain GK, Rahman M, Pathan SA, Ahmad FJ, vd. Metallic nanoparticles: technology overview & drug delivery applications in oncology. Expert Opinion on Drug Delivery. 01 Ağustos 2010;7(8):927-42.
119. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. Acc Chem Res. 16 Aralık 2008;41(12):1578-86.
120. Khan S, Hossain MK. 2 - Classification and properties of nanoparticles. Içinde: Mavinkere Rangappa S, Parameswaranpillai J, Yashas Gowda TG, Siengchin S, Seydibeyoglu MO, editörler. Nanoparticle-Based Polymer Composites [Internet]. Woodhead Publishing; 2022 [a.yer 02 Ocak 2023]. s. 15-54. (Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering). Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128242728000099
121. Doria G, Conde J, Veigas B, Giestas L, Almeida C, Assunção M, vd. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. Sensors. Şubat 2012;12(2):1657-87.
122. Kim M, Lee JH, Nam JM. Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications. Advanced Science. 2019;6(17):1900471.
123. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. Lasers Med Sci. 01 Temmuz 2008;23(3):217-28.
124. Yang W, Liang H, Ma S, Wang D, Huang J. Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment. Sustainable Materials and Technologies. 01 Aralık 2019;22:e00109.
125. Thota S, Crans DC. Metal Nanoparticles: Synthesis and Applications in Pharmaceutical Sciences. John Wiley & Sons; 2018. 314 s.
126. Liu JF, Jang B, Issadore D, Tsourkas A. Use of magnetic fields and nanoparticles to trigger drug release and improve tumor targeting. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2019;11(6):e1571.
127. Ferdous Z, Nemmar A. Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. International Journal of Molecular Sciences. Ocak 2020;21(7):2375.
128. Jamkhande PG, Ghule NW, Bamer AH, Kalaskar MG. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 01 Ekim 2019;53:101174.
129. Burlec AF, Corciova A, Boev M, Batir-Marin D, Mircea C, Cioanca O, vd. Current Overview of Metal Nanoparticles' Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications, with a Focus on Silver and Gold Nanoparticles. Pharmaceuticals. Ekim 2023;16(10):1410.
130. Ajnai G, Chiu A, Kan T, Cheng CC, Tsai TH, Chang J. Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. Journal of Experimental & Clinical Medicine. 01 Aralık 2014;6(6):172-8.
131. Klębowski B, Depciuch J, Parlińska-Wojtan M, Baran J. Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. International Journal of Molecular Sciences. Aralık 2018;19(12):4031.
132. Kong FY, Zhang JW, Li RF, Wang ZX, Wang WJ, Wang W. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. Molecules. Eylül 2017;22(9):1445.
133. Kumar A, Zhang X, Liang XJ. Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system. Biotechnology Advances. 01 Eylül 2013;31(5):593-606.
134. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WCW. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. Nano Lett. 01 Nisan 2006;6(4):662-8.
135. Bergen JM, von Recum HA, Goodman TT, Massey AP, Pun SH. Gold Nanoparticles as a Versatile Platform for Optimizing Physicochemical Parameters for Targeted Drug Delivery. Macromolecular Bioscience. 2006;6(7):506-16.
136. Kettler K, Veltman K, van de Meent D, van Wezel A, Hendriks AJ. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. Environmental Toxicology and Chemistry. 2014;33(3):481-92.
137. Mugaka BP, Hu Y, Ma Y, Ding Y. Surface Modification of Gold Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. Içinde: Pathak YV, editör. Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery

[Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [a.yer 28 Haziran 2024]. s. 391-403. Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-06115-9_20
138. Khodashenas B, Ardjmand M, Rad AS, Esfahani MR. Gelatin-coated gold nanoparticles as an effective pH-sensitive methotrexate drug delivery system for breast cancer treatment. Materials Today Chemistry. 01 Haziran 2021;20:100474.
139. Dreaden EC, Mwakwari SC, Sodji QH, Oyelere AK, El-Sayed MA. Tamoxifen−Poly(ethylene glycol)−Thiol Gold Nanoparticle Conjugates: Enhanced Potency and Selective Delivery for Breast Cancer Treatment. Bioconjugate Chem. 16 Aralık 2009;20(12):2247-53.
140. Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. Journal of Drug Targeting. 15 Mart 2016;24(3):179-91.
141. Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. Theranostics. 07 Haziran 2016;6(9):1306-23.
142. Tewabe A, Abate A, Tamrie M, Seyfu A, Abdela Siraj E. Targeted Drug Delivery — From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. Journal of Multidisciplinary Healthcare. 31 Aralık 2021;14:1711-24.
143. Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. Journal of Controlled Release. 10 Ağustos 2011;153(3):198-205.
144. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. Aralık 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
145. Sharifi M, Cho WC, Ansariesfahani A, Tarharoudi R, Malekisarvar H, Sari S, vd. An Updated Review on EPR-Based Solid Tumor Targeting Nanocarriers for Cancer Treatment. Cancers. Ocak 2022;14(12):2868.
146. Subhan MA, Yalamarty SSK, Filipczak N, Parveen F, Torchilin VP. Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. Journal of Personalized Medicine. Haziran 2021;11(6):571.
147. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nature Nanotech. Aralık 2007;2(12):751-60.
148. Cheng X, Xie Q, Sun Y. Advances in nanomaterial-based targeted drug delivery systems. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 13 Nisan 2023 [a.yer 28 Haziran 2024];11. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2023.1177151/full
149. Jahan S, Karim ME, Chowdhury EH. Nanoparticles Targeting Receptors on Breast Cancer for Efficient Delivery of Chemotherapeutics. Biomedicines. Şubat 2021;9(2):114.
150. Rizwanullah M, Ahmad MZ, Ghoneim MM, Alshehri S, Imam SS, Md S, vd. Receptor-Mediated Targeted Delivery of Surface-ModifiedNanomedicine in Breast Cancer: Recent Update and Challenges. Pharmaceutics. Aralık 2021;13(12):2039.
151. Singh SK, Singh S, Lillard JW, Singh R. Drug delivery approaches for breast cancer. Int J Nanomedicine. 24 Ağustos 2017;12:6205-18.
152. Massaro E, Rogers J. Folate and human development. Scandinavian Journal of Nutrition. 01 Ocak 2002;46(3):148-50.
153. Chen C, Ke J, Zhou XE, Yi W, Brunzelle JS, Li J, vd. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. Nature. 22 Ağustos 2013;500(7463):486-9.
154. Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. Advanced Drug Delivery Reviews. 29 Nisan 2004;56(8):1067-84.
155. Low PS, Henne WA, Doorneweerd DD. Discovery and Development of Folic-Acid-Based Receptor Targeting for Imaging and Therapy of Cancer and Inflammatory Diseases. Acc Chem Res. 01 Ocak 2008;41(1):120-9.
156. Kalli KR, Oberg AL, Keeney GL, Christianson TJH, Low PS, Knutson KL, vd. Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer. Gynecologic Oncology. 01 Mart 2008;108(3):619-26.
157. Necela BM, Crozier JA, Andorfer CA, Lewis-Tuffin L, Kachergus JM, Geiger XJ, vd. Correction: Folate Receptor-α (FOLR1) Expression and Function in Triple Negative Tumors. PLOS ONE. Nis 2015;10(4):e0127133.
158. O'Shannessy DJ, Yu G, Smale R, Fu YS, Singhal S, Thiel RP, vd. Folate Receptor Alpha Expression in Lung Cancer: Diagnostic and Prognostic Significance. Oncotarget. 29 Nisan 2012;3(4):414-25.
159. Zhang Z, Wang J, Tacha DE, Li P, Bremer RE, Chen H, vd. Folate receptor α associated with triple-negative breast cancer and poor prognosis. Arch Pathol Lab Med. Temmuz 2014;138(7):890-5.

160. O'Shannessy DJ, Somers EB, Maltzman J, Smale R, Fu YS. Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. SpringerPlus. 28 Eylül 2012;1(1):22.
161. Sperling RA, Parak WJ. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. 28 Mart 2010;368(1915):1333-83.
162. Austin LA, Mackey MA, Dreaden EC, El-Sayed MA. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. Arch Toxicol. 01 Temmuz 2014;88(7):1391-417.
163. Jazayeri MH, Amani H, Pourfatollah AA, Pazoki-Toroudi H, Sedighimoghaddam B. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. Sensing and Bio-Sensing Research. 01 Temmuz 2016;9:17-22.
164. D. Friedman A, E. Claypool S, Liu R. The Smart Targeting of Nanoparticles. Current Pharmaceutical Design. 01 Ekim 2013;19(35):6315-29.
165. Pacchioni G. A not-so-strong bond. Nat Rev Mater. Nisan 2019;4(4):226-226.
166. Bürgi T. Properties of the gold–sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters. Nanoscale. 2015;7(38):15553-67.
167. Wang C, Yan Q, Liu HB, Zhou XH, Xiao SJ. Different EDC/NHS Activation Mechanisms between PAA and PMAA Brushes and the Following Amidation Reactions. Langmuir. 04 Ekim 2011;27(19):12058-68.
168. Lee H. Molecular Simulations of PEGylated Biomolecules, Liposomes, and Nanoparticles for Drug Delivery Applications. Pharmaceutics. Haziran 2020;12(6):533.
169. Harrison E, Coulter JA, Dixon D. Gold nanoparticle surface functionalization: mixed monolayer versus hetero bifunctional peg linker. Nanomedicine. Nisan 2016;11(7):851-65.
170. Karakoti AS, Das S, Thevuthasan S, Seal S. PEGylated Inorganic Nanoparticles. Angewandte Chemie International Edition. 2011;50(9):1980-94.
171. Shi L, Zhang J, Zhao M, Tang S, Cheng X, Zhang W, vd. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. Nanoscale. 24 Haziran 2021;13(24):10748-64.
172. Larson TA, Joshi PP, Sokolov K. Preventing Protein Adsorption and Macrophage Uptake of Gold Nanoparticles via a Hydrophobic Shield. ACS Nano. 23 Ekim 2012;6(10):9182-90.
173. Liu Z, Fu R, Yuying Y. Chapter 2 - Preparation and evaluation of stable nanofluids for heat transfer application. İçinde: Ali HM, editör. Advances in Nanofluid Heat Transfer [İnternet]. Elsevier; 2022 [a.yer 19 Ağustos 2023]. s. 25-57. Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323886567000131
174. D'souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. Expert Opin Drug Deliv. Eylül 2016;13(9):1257-75.
175. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. Advanced Drug Delivery Reviews. 01 Nisan 2016;99:28-51.
176. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angewandte Chemie International Edition. 2001;40(11):2004-21.
177. Hein CD, Liu XM, Wang D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. Pharm Res. 01 Ekim 2008;25(10):2216-30.
178. Hein JE, Fokin VV. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. Chem Soc Rev. 22 Mart 2010;39(4):1302-15.
179. Bock VD, Hiemstra H, van Maarseveen JH. CuI-Catalyzed Alkyne–Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective. European Journal of Organic Chemistry. 2006;2006(1):51-68.
180. Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, vd. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. J Am Chem Soc. 01 Ocak 2005;127(1):210-6.
181. Ramkumar R, Anbarasan P. Cu-Catalyzed Click Reactions. Içinde: Copper Catalysis in Organic Synthesis [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2020 [a.yer 15 Haziran 2023]. s. 177-207. Erişim adresi: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9783527826445.ch9
182. Brennan JL, Hatzakis NS, Tshikhudo TR, Nijole Dirvianskyte, Razumas V, Patkar S, vd. Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles. Bioconjugate Chem. 01 Kasım 2006;17(6):1373-5.
183. Cryer AM, Chan C, Eftychidou A, Maksoudian C, Mahesh M, Tetley TD, vd. Tyrosine Kinase Inhibitor Gold Nanoconjugates for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. ACS Appl Mater Interfaces. 08 Mayıs 2019;11(18):16336-46.

184. Bastús NG, Comenge J, Puntes V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. Langmuir. 06 Eylül 2011;27(17):11098-105.
185. Wang W, Wei QQ, Wang J, Wang BC, Zhang S hui, Yuan Z. Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant? Journal of Colloid and Interface Science. 15 Ağustos 2013;404:223-9.
186. Litti L, Ramundo A, Biscaglia F, Toffoli G, Gobbo M, Meneghetti M. A surface enhanced Raman scattering based colloid nanosensor for developing therapeutic drug monitoring. Journal of Colloid and Interface Science. 01 Ocak 2019;533:621-6.
187. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV−Vis Spectra. Anal Chem. 01 Haziran 2007;79(11):4215-21.
188. Rahme K, Chen L, Hobbs RG, Morris MA, O'Driscoll C, Holmes JD. PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. RSC Adv. 02 Nisan 2013;3(17):6085-94.
189. Priya MRK, Iyer PR. Biosynthesis and optimization of highly stable gold nanoparticles, nanoconjugates, nanodrug conjugates and chitosan nanoconjugates using medicinal plants. Bulletin of the National Research Centre. 12 Mayıs 2022;46(1):134.
190. Masse F, Desjardins P, Ouellette M, Couture C, Omar MM, Pernet V, vd. Synthesis of Ultrastable Gold Nanoparticles as a New Drug Delivery System. Molecules. Ocak 2019;24(16):2929.
191. Yokota H, Kadowaki M, Matsuura T, Imanaka H, Ishida N, Imamura K. The Use of a Combination of a Sugar and Surfactant to Stabilize Au Nanoparticle Dispersion against Aggregation during Freeze-Drying. Langmuir. 23 Haziran 2020;36(24):6698-705.
192. Barbero F, Michelini S, Moriones OH, Patarroyo J, Rosell J, F. Gusta M, vd. Role of Common Cell Culture Media Supplements on Citrate-Stabilized Gold Nanoparticle Protein Corona Formation, Aggregation State, and the Consequent Impact on Cellular Uptake. Bioconjugate Chem. 17 Ağustos 2022;33(8):1505-14.
193. Vrandečić NS, Erceg M, Jakić M, Klarić I. Kinetic analysis of thermal degradation of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene oxide)s of different molecular weight. Thermochimica Acta. 20 Ocak 2010;498(1):71-80.
194. Kofen M, Harter AG, Klapötke TM, Stierstorfer J. 1,5-Dimethyltetrazole as a ligand in energetic 3*d*5 to 3*d*10-metal coordination compounds. Energetic Materials Frontiers. 01 Eylül 2022;3(3):111-21.
195. E. Ghodsinia SS, Akhlaghinia B. A rapid metal free synthesis of 5-substituted-1 H -tetrazoles using cuttlebone as a natural high effective and low cost heterogeneous catalyst. RSC Advances. 2015;5(62):49849-60.
196. Stierstorfer J, Tarantik KR, Klapötke TM. New Energetic Materials: Functionalized 1-Ethyl-5-aminotetrazoles and 1-Ethyl-5-nitriminotetrazoles. Chemistry – A European Journal. 2009;15(23):5775-92.
197. Charmi J, Nosrati H, Amjad JM, Mohammadkhani R, Danafar H. Polyethylene glycol (PEG) decorated graphene oxide nanosheets for controlled release curcumin delivery. Heliyon [Internet]. 01 Nisan 2019 [a.yer 28 Haziran 2024];5(4). Erişim adresi: https://www.cell.com/heliyon/abstract/S2405-8440(18)38817-0
198. Leopold LF, Tódor IS, Diaconeasa Z, Rugină D, Ştefancu A, Leopold N, vd. Assessment of PEG and BSA-PEG gold nanoparticles cellular interaction. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 05 Kasım 2017;532:70-6.
199. Piazza RD, Viali WR, Santos CC dos, Nunes ES, Marques RFC, Morais PC, vd. PEGlatyon-SPION surface functionalization with folic acid for magnetic hyperthermia applications. Mater Res Express. Ocak 2020;7(1):015078.
200. Venkatasubbu GD, Ramasamy S, Avadhani GS, Ramakrishnan V, Kumar J. Surface modification and paclitaxel drug delivery of folic acid modified polyethylene glycol functionalized hydroxyapatite nanoparticles. Powder Technology. 01 Şubat 2013;235:437-42.
201. Parin FN, Ullah S, Yildirim K, Hashmi M, Kim IS. Fabrication and Characterization of Electrospun Folic Acid/Hybrid Fibers: In Vitro Controlled Release Study and Cytocompatibility Assays. Polymers. Ocak 2021;13(20):3594.
202. Sun C, Sze R, Zhang M. Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2006;78A(3):550-7.
203. Sahu M, Reddy VRM, Kim B, Patro B, Park C, Kim WK, vd. Fabrication of Cu2ZnSnS4 Light Absorber Using a Cost-Effective Mechanochemical Method for Photovoltaic Applications. Materials. Ocak 2022;15(5):1708.

204. Ravichandran V, Kesavan V, Cojean S, Loiseau PM, Jayakrishnan A. Polysorbate Surfactants as Drug Carriers: Tween 20-Amphotericin B Conjugates as Anti-Fungal and Anti-Leishmanial Agents. Current Drug Delivery. 01 Ağustos 2018;15(7):1028-37.
205. Maher DM, Nagane SS, Jadhav UA, Salunkhe PH, Tawade BV, Wadgaonkar PP. A new cardo bisphenol monomer containing pendant azido group and the resulting aromatic polyesters. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. 2019;57(14):1516-26.
206. Su X, Bu L, Dong H, Fu S, Zhuo R, Zhong Z. An injectable PEG-based hydrogel synthesized by strain-promoted alkyne–azide cycloaddition for use as an embolic agent. RSC Adv. 04 Ocak 2016;6(4):2904-9.
207. Zheng S, Li X, Zhang Y, Xie Q, Wong YS, Zheng W, vd. PEG-nanolized ultrasmall selenium nanoparticles overcome drug resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through induction of mitochondria dysfunction. Int J Nanomedicine. 2012;7:3939-49.
208. El Hadri M, Achahbar A, El Khamkhami J, Khelifa B, Faivre V, Cong TT, vd. Raman spectroscopy investigation of mono- and diacyl-polyoxyethylene glycols. Vibrational Spectroscopy. 01 Ocak 2013;64:78-88.
209. Yamini D, Devanand Venkatasubbu G, Kumar J, Ramakrishnan V. Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 03 Ocak 2014;117:299-303.
210. Ramanauskaite L, Snitka V. The synthesis of controlled shape nanoplasmonic silver-silica structures by combining sol-gel technique and direct silver reduction. Nanoscale Res Lett. 19 Mart 2015;10(1):133.
211. Castillo JJ, Rindzevicius T, Rozo CE, Boisen A. Adsorption and Vibrational Study of Folic Acid on Gold Nanopillar Structures Using Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy. Nanomaterials and Nanotechnology. 01 Ocak 2015;5:29.
212. Yea K hae, Lee S, Kyong JB, Choo J, Lee EK, Joo SW, vd. Ultra-sensitive trace analysis of cyanide water pollutant in a PDMS microfluidic channel using surface-enhanced Raman spectroscopy. Analyst. 16 Haziran 2005;130(7):1009-11.
213. Bowmaker GA, Lim KC, Skelton BW, White AH. Syntheses, Structures and Vibrational Spectroscopy of Some Adducts of Copper(I) Cyanide with Pyridine Bases. Zeitschrift für Naturforschung B. 01 Aralık 2004;59(11-12):1264-76.
214. Murray CA, Bodoff S. Cyanide adsorption on silver and gold overlayers on island films as determined by surface enhanced Raman scattering. The Journal of Chemical Physics. 01 Temmuz 1986;85(1):573-84.
215. Mudalige T, Qu H, Van Haute D, Ansar SM, Paredes A, Ingle T. Chapter 11 - Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. İçinde: López Rubio A, Fabra Rovira MJ, martínez Sanz M, Gómez-Mascaraque LG, editörler. Nanomaterials for Food Applications [İnternet]. Elsevier; 2019 [a.yer 28 Haziran 2024]. s. 313-53. (Micro and Nano Technologies). Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128141304000117
216. Mahbubul I. Introduction to nanofluid. Prep Charact Prop Appl Nanofluid. 2019;1-13.
217. Yeo Y. Nanoparticulate drug delivery systems: strategies, technologies, and applications. John Wiley & Sons; 2013.
218. Selvamani V. Chapter 15 - Stability Studies on Nanomaterials Used in Drugs. İçinde: Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Mishra RK, Thomas S, editörler. Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery [İnternet]. Elsevier; 2019 [a.yer 28 Haziran 2024]. s. 425-44. (Micro and Nano Technologies). Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128140314000155
219. Link S, El-Sayed MA. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. J Phys Chem B. 01 Mayıs 1999;103(21):4212-7.
220. Chen H, Paholak H, Ito M, Sansanaphongpricha K, Qian W, Che Y, vd. 'Living' PEGylation on gold nanoparticles to optimize cancer cell uptake by controlling targeting ligand and charge densities. Nanotechnology. Ağustos 2013;24(35):355101.
221. Qian W, Murakami M, Ichikawa Y, Che Y. Highly Efficient and Controllable PEGylation of Gold Nanoparticles Prepared by Femtosecond Laser Ablation in Water. J Phys Chem C. 01 Aralık 2011;115(47):23293-8.
222. Cruje C, Chithrani DB. Polyethylene Glycol Functionalized Nanoparticles for Improved Cancer Treatment. Reviews in Nanoscience and Nanotechnology. 01 Mart 2014;3(1):20-30.
223. Padín-González E, Lancaster P, Bottini M, Gasco P, Tran L, Fadeel B, vd. Understanding the Role and Impact of Poly (Ethylene Glycol) (PEG) on Nanoparticle Formulation: Implications for COVID-19 Vaccines. Front Bioeng Biotechnol [Internet]. 07 Haziran 2022 [a.yer 28 Haziran 2024];10. Erişim adresi: https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2022.882363/full

224. Koushki E. Effect of conjugation with organic molecules on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles and application in optical biosensing. RSC Adv. 01 Temmuz 2021;11(38):23390-9.
225. Bhattacharya R, Patra CR, Earl A, Wang S, Katarya A, Lu L, vd. Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 01 Eylül 2007;3(3):224-38.
226. Wang R, Bowling I, Liu W. Cost effective surface functionalization of gold nanoparticles with a mixed DNA and PEG monolayer for nanotechnology applications. RSC Advances. 2017;7(7):3676-9.
227. Zhao Y, Wang Z, Zhang W, Jiang X. Adsorbed Tween 80 is unique in its ability to improve the stability of gold nanoparticles in solutions of biomolecules. Nanoscale. 2010;2(10):2114-9.
228. Minassian G, Ghanem E, Hage RE, Rahme K. Gold Nanoparticles Conjugated with Dendrigraft Poly-L-lysine and Folate-Targeted Poly(ethylene glycol) for siRNA Delivery to Prostate cancer. Nanotheranostics. 09 Ocak 2023;7(2):152-66.
229. Tarchoun AF, Trache D, Klapötke TM, Khimeche K. Tetrazole-functionalized microcrystalline cellulose: A promising biopolymer for advanced energetic materials. Chemical Engineering Journal. 15 Kasım 2020;400:125960.
230. Rivas MV, Musikant D, Díaz Peña R, Álvarez D, Pelazzo L, Rossi E, vd. Carbohydrate-Derived Polytriazole Nanoparticles Enhance the Anti-Inflammatory Activity of Cilostazol. ACS Omega. 13 Aralık 2022;7(49):44631-42.
231. Sukhanov GT, Bosov KK, Filippova YV, Sukhanova AG, Krupnova IA, Pivovarova EV. New 5-Aminotetrazole-Based Energetic Polymers: Synthesis, Structure and Properties. Materials. Ocak 2022;15(19):6936.
232. Billes F, Endrédi H, Keresztury G. Vibrational spectroscopy of triazoles and tetrazole. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. 18 Eylül 2000;530(1):183-200.
233. Ielo I, Rando G, Giacobello F, Sfameni S, Castellano A, Galletta M, vd. Synthesis, Chemical–Physical Characterization, and Biomedical Applications of Functional Gold Nanoparticles: A Review. Molecules. Ocak 2021;26(19):5823.
234. Vora A, Riga A, Dollimore D, Alexander KS. Thermal stability of folic acid. Thermochimica Acta. 15 Eylül 2002;392-393:209-20.
235. Tandiana R, Sicard-Roselli C, Van-Oanh NT, Steinmann S, Clavaguéra C. In-depth theoretical understanding of the chemical interaction of aromatic compounds with a gold nanoparticle. Physical Chemistry Chemical Physics. 2022;24(41):25327-36.
236. Bernal-Chávez SA, Del Prado-Audelo ML, Caballero-Florán IH, Giraldo-Gomez DM, Figueroa-Gonzalez G, Reyes-Hernandez OD, vd. Insights into Terminal Sterilization Processes of Nanoparticles for Biomedical Applications. Molecules. Ocak 2021;26(7):2068.
237. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. Nat Rev Cancer. Eylül 2011;11(9):671-7.
238. Bromma K, Bannister A, Kowalewski A, Cicon L, Chithrani DB. Elucidating the fate of nanoparticles among key cell components of the tumor microenvironment for promoting cancer nanotechnology. Cancer Nanotechnol. 2020;11(1):8.
239. Chithrani BD, Stewart J, Allen C, Jaffray DA. Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells. Nanomedicine. Haziran 2009;5(2):118-27.
240. Cronk D. High-throughput screening. Içinde: Drug Discovery and Development [Internet]. Elsevier; 2013 [a.yer 15 Haziran 2023]. s. 95-117. Erişim adresi: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780702042997000081
241. Smith K, Horvath P. Active Learning Strategies for Phenotypic Profiling of High-Content Screens. SLAS Discovery. 01 Haziran 2014;19(5):685-95.
242. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotech Histochem. Eylül 1995;70(5):220-33.
243. Atale N, Gupta S, Yadav U c. s., Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. Journal of Microscopy. 2014;255(1):7-19.
244. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. Cold Spring Harb Protoc. 01 Temmuz 2016;2016(7):pdb.prot087163.
245. Freese C, Uboldi C, Gibson MI, Unger RE, Weksler BB, Romero IA, vd. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells. Particle and Fibre Toxicology. 03 Temmuz 2012;9(1):23.
246. Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, vd. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. Small. Haziran 2006;2(6):766-73.