BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER HÜCRE MEMBRANI KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE SİTOTOKSİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buse SANCAKLI

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan DAĞ

TEMMUZ 2024

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER HÜCRE MEMBRANI KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE SİTOTOKSİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buse SANCAKLI

(225309001)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan DAĞ

TEMMUZ 2024

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 225309001 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Buse SANCAKLI, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı ''Kanser Hücre Membranı Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Sentezi ve Glioblastoma Tedavisinde Sitotoksik Etkinliğinin İncelenmesi'' başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Aydan DAĞ** .....

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üye. Zeynep ÇAĞMAN** .....

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üye. P. Sinem O. ÖZGEN ……

Marmara Üniversitesi

İzole edilebilenlere;

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Buse SANCAKLI

ÖNSÖZ

Yüksek lisans serüvenimin başladığı andan itibaren her zaman bir adım ileri gitmemi sağlayan, bilime olan inancımın, heyecanımın günden güne artmasına destek olan, karşılaştığım her zorlukta desteğini benden esirgemeyen ve tüm bilgi birikimi ile bize ışık olan sevgili danışmanım Prof. Dr. Aydan DAĞ hocama teşekkürü borç bilirim. Kendimizi görsel anlamda geliştirmemizi sağlayan, sahip olduğu vizyonu ile bize yön gösteren Dr. Öğr. Üye. Pınar Sinem OMURTAG ÖZGEN hocama içtenlikle teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında her zaman destek aldığım Arş. Gör. Dr. Sezen ATASOY ve Dr. Öğr. Üye. Zeynep ÇAĞMAN hocalarıma teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda ilk adımlarımı beraber attığım, hiçbir zaman desteklerini benden esirgemeyen, kahkahalarıma, üzüntülerime bu süreçte ortak olan ve aynı soruları birden fazla kez sorduğumda bile içtenlikle cevaplayan Büşra Çetin ERSEN ve Tuğba Gençoğlu KATMERLİKAYA'ya bu yolda yanımda oldukları için çok teşekkür ederim.

Kaderimizin kesiştiği yol arkadaşlarım Buse AVCI ve Işınsu MUTLU'nun yüksek lisans serüvenimde hafızalardan silinmeyecek anılar bıraktıkları için ayrıca teşekkür ederim. Bu süreç boyunca sabırla yanımda olan anneme, babama ve bütün aileme sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Attığım her adımda bana inanan, her zaman yanımda olan ve beni ben yapan değerleri kazanmamı sağlayan Doğukan ÖZARSLAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması süresince 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında destek aldığım TÜBİTAK Bilim İnsanları Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) (Başvuru No: 1649B022315552) birimine teşekkür ederim. Ayrıca bu tez çalışması 20230619 proje numarası ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiştir. Ayrıca tez çalışmam sırasında 122Z731 No'lu 'Melanom Kombinasyon Terapisine Yönelik Çok Fonksiyonlu Fototerapötik Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Etkinliklerinin in vitro Değerlendirilmesi' başlıklı TÜBİTAK 1001 projesinde bursiyer olarak görev aldım. Desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2024 **Buse SANCAKLI**

(Biyomühendis)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BEYAN ..... **v**
ÖNSÖZ ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
KISALTMALAR ..... **x**
SEMBOLLER ..... **xi**
TABLO LİSTESİ ..... **xii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xv**
SUMMARY ..... **xvii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1 Kanser; Tanı ve Tedavi 3
2.2 Tümör Mikroçevresi ve EPR Etkisi 6
2.3 Glioblastoma Multiform (GBM) 9
2.4 Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler 11
2.4.1 Nanopartikül tabanlı ilaç dağıtım sistemleri: 11
2.5 Hücre Membranı kaplı Nanopartiküller: Doğadan esinlenilen nanoteknolojik yaklaşımlar 20
2.5.1 Eritrosit hücre membranları 23
2.5.2 Lökosit hücre membranları 24
2.5.2.1 Makrofaj membranları 24
2.5.2.2 Dendritik hücre (DH) membranları 25
2.5.2.3 Doğal katil (DK) hücre membranları 25
2.5.3 Trombosit membranları 25
2.5.4 Kanser hücre (KH) membranları 25
2.5.5 Kaynak hücrelerden membran izolasyon yöntemleri 26
3. GEREÇ ve YÖNTEM **29**
3.1 Kullanılan Kimyasallar 29
3.2 Kullanılan Cihazlar 29

3.3 Yöntem 31
3.3.1 Monomerlerin sentezi 31
3.3.1.1. *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin Metakrilat Monomerinin Sentezi (*tBoc*$_2$LzMA) 31
3.3.1.2. 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilik asit (TMZ-COOH) sentezi 31
3.3.1.3. 2-(metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerinin sentezi 32
3.3.2 RAFT Polimerizasyon Yöntemiyle Polimer Sentezi 32
3.3.2.1 P(*tBoc*$_2$LzMA) Homo polimer sentezi 32
3.3.2.2 P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) 33
3.3.3 Sentezlenen Polimerin Hidrolizi 33
3.3.3.1. P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerinin hidrolizi 33
3.3.4 Nanoplarform Sentezi ve Karakterizasyonu 34
3.3.4.1 Manyetik nanoparçacık sentezi 34
3.3.4.2 U87-MG Hücre membran proteinlerinin izolasyonu 34
3.3.4.3 BSA Analizi ile protein miktarının belirlenmesi 34
3.3.4.4 Western Blot deneyi 35
3.3.4.5 Fe_3O_4@HM'nin Sentezi 36
3.3.4.5 Fe_3O_4@HM@P'nin Sentezi 36
3.3.5 Sitotoksisite çalışmaları 36
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 38
4.1. Monomer Sentezi 38
4.1.1. *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin Metakrilat Monomerinin Sentezi (*tBoc*$_2$LzMA) 38
4.1.2. 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilik asit (TMZ-COOH) sentezi 40
4.1.3. 2-(metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerinin sentezi 42
4.2. RAFT Polimerizasyon Yöntemiyle Polimer Sentezi 45
4.2.1. P(*tBoc*$_2$LzMA) Homoblok polimer sentezi 45
4.2.2 P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer sentezi 47
4.2.3 P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer hidrolozi 49
4.3 Nanoplarform Sentezi ve Karakterizasyonu 51
4.3.1 Manyetik Nanoparçacık Sentezi 52
4.3.1.2 Manyetik Nanoparçacığın Termal Davranış Analizi 52
4.3.2 U87-MG Hücre membran proteinlerinin izolasyonu 53
4.3.2.1 BSA Protein Miktar Analizi 53

4.3.2.2 Western Blot 54
4.3.3 Fe_3O_4@U87HM Sentezi 55
4.3.4 Fe_3O_4@U87HM@P'nin Sentezi 56
4.3.4.1 Fe_3O_4@U87HM@P'nin Termal Davranış Analizleri 58
4.3.4.2 Fe_3O_4@HM@P'nin Protein Profili 59
4.4 Sitotoksisite Testi 60
5.SONUÇ 62
KAYNAKÇA 64
ÖZGEÇMİŞ 69

KISALTMALAR

GBM : Glioblastoma Multiform
BSA : Bovin Serum Albumin
KBB : Kan-Beyin Bariyeri
KBTB : Kan-Beyin Tümör Bariyeri
TMZ : Temozolomid
TMZMA : Temozolomid Metakrilat
PDI : Polidispersite İndeksi
^{1}H NMR : Proton Nükleer Manyetik Rezonans
***tBoc*$_2$LzMA** : Tersiyer Butoksit Korumalı Lizin Metakrilat
PTT : Fototermal Terapi
PDT : Fotodinamik Terapi
HEMA : 2-Hidroksi-etil Metakrilat
AIBN : 2,2′-Azobis(2-methylpropionitrile)
$CDCl_3$: Dötero kloroform
CD_3OD : Dötero metanol
DKM : Diklorometan
dH_2O : Distile su
DLS : Dinamik Işık Saçılımı
D-MEM : Dulbecco Modifiye Besin Ortamı
EPR : Arttırılmış Geçirgenlik Ve Alıkonma
RES : Retikuloendoteliyal Sistem
MTT : 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GPC : Jel Geçirgenlik Kromotografisi
RAFT : Tersinir Eklemeli-Parçalanma Zincir Reaksiyonu
NP : Nanopartikül
dk : Dakika

SEMBOLLER

^{o}C : Derece Santigrat

h : Saat

µL : Mikrolitre

µg : Mikrogram

g : Gram

kDa : Kilodalton

M : Molar

mmol : Milimol

mL : Mililitre

L : Litre

h/h : Hacimce yüzde

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Bazı nanoparçacıkların kanser tedavisinde kullanımının Avantajları ve dezavantajları 13

Tablo 2: Polimer sentezlerine ait reaksiyon koşulları ve moleküler ağırlık değerleri 51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Sağlıklı ve Kanser hücresi arasındaki morfolojik farklılıklar..... 3

Şekil 2.2: Tümör mikro ortamının farklı bileşenleri: (A) bağışıklık sistemi, (B) stroma ve (C) dış faktörler 6

Şekil 2.3: Nanoteknolojik yaklaşımlar: ilaç taşıyıcı sistemler..... 12

Şekil 2.4: IR780 ile konjuge edilmiş ve PTX (MCB(S)-IR@PTX) ile yüklenmiş süper küçük zwitteriyonik miselin (MCB(S)) şematik gösterimi. [46] 19

Şekil 2.5: Glioblastoma karşı kemoterapötik ilaçlar doksorubisinin (DOX) programlı salınımı için çoklu uyaranlara yanıt veren altın keseciklerin (GVND) oluşumunun ve etki mekanizmasının şematik gösterimi. 20

Şekil 2.6: Hücre membranının yapısı 21

Şekil 2.7: Hücre membran izolasyonunda kaynak hücreler ve hücre membranı kaplı nanopartiküllerin çeşitleri..... 23

Şekil 2.8:KKH membran kaplı PLGA nanopartiküllerinin (NP'ler) hazırlanma sürecinin şematik gösterimi..... 24

Şekil 2.9: A) CMNP oluşumunun şematik gösterimi ve B) CMNP'ye ait TEM ve DLS görüntüleri 27

Şekil 2.10: ICNP'lerin hazırlanma prosedürünün şematik gösterimi 28

Şekil 4.1: *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin Metakrilat Monomerinin Sentezi.. 38

Şekil 4.2: *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı lizin metakrilat monomerine (*tBoc*$_2$LzMA) ait A)^{1}H NMR ve B)^{13}C NMR spektrumu 39

Şekil 4.3: *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin ve *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı lizin metakrilat monomerine (*tBoc*$_2$LzMA) ait FTIR spektrumu..... 39

Şekil 4.4: TMZ-COOH bileşiğinin sentezini şematik gösterimi. 40

Şekil 4.5: 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilik asit (TMZ-COOH) bileşiğine ait A)^{1}H NMR ve B)^{13}C NMR spektrumu..... 41

Şekil 4.6: 2-(Metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerinin sentezinin şematik gösterimi..... 42

Şekil 4.7: 2-(Metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerine ait A) ^{1}H NMR ve B)^{13}C NMR spektrumu..... 43

Şekil 4.8: Temozolomid, temozolomid asit ve temozolomid metakrilat monomerine ait FTIR spektrumu 44

Şekil 4.9: Temozolomid monomerine (TMZMA) ait kütle spektrometresi, iç resim Temozolomid asit (TMZ-COOH) bileşiğine ait kütle spektrometresi. 45

Şekil 4.10: P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimer sentezinin şematik gösterimi 46

Şekil 4.11: P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimerine ait ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$). 46

Şekil 4.12: P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimerine ait A) THF- GPC kromatogramı B) FTIR spektrumu 47

Şekil 4.13: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer sentezinin şematik gösterimi 47

Şekil 4.14: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)))) kopolimerine ait ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$). 48

Şekil 4.15: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerine ait A) THF- GPC kromatogramı B) FTIR spektrumu 49

Şekil 4.16: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer hidrolozinin şematik gösterimi 49

Şekil 4.17: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)))) kopolimerine ait ^{1}H NMR spektrumu (CD_3OD) 50

Şekil 4.18: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerine ait DMF-GPC kromatogramı 50

Şekil 4.19: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA))) kopolimerine ve öncü bileşiklere ait A) UV-Vis spektrumu (MeOH) ve B) FTIR spektrumu. 51

Şekil 4.20: Fe_3O_4 'e ait A) boyut dağılım grafiği ve B) TEM görüntüsü 52

Şekil 4.21: Fe_3O_4 manyetik nanoparçacığın 808nm NIR lazer ışıması altında sıcaklık değişim grafiği 53

Şekil 4.22: Sığır serum albümini (BSA) kalibrasyon grafiği 54

Şekil 4.23: Membran-spesifik protein TFR-1'e ait western blot analizi. Kanser hücresi lizatı, kanser hücresi sitozolik protein fraksiyonu ve kanser hücresi membran protein fraksiyonu. 55

Şekil 4.24: Fe_3O_4, U87HM, Fe_3O_4@U87HM'ye ait A) boyut dağılım grafiği ve 56

Şekil 4.25: Fe_3O_4, U87HM, Fe_3O_4@U87HM ve Fe_3O_4@U87HM@P'ye ait 57

Şekil 4.26: Fe_3O_4@U87HM@P'ye ait termal davranış analizleri A) 10 dk boyunca farklı şiddetlerde 808 nm NIR lazer ışınına maruz bırakılan biyomimetik nanoplatformun ΔT grafiği. B) 1.25 W/cm^2 şiddetinde 10 dakika boyunca farklı konsantrasyonlardaki nanoplatformun ΔT grafiği 58

Şekil 4.27: U87HM membran proteinlerinin, Fe_3O_4@U87HM'nin ve Fe_3O_4@U87HM@P'nin SDS-PAGE protein analizi. 60

Şekil 4.28: A) U87-MG hücrelerinin % canlılığı ve B) CCD-1079Sk hücrelerinin % hücre canlılığı 61

ÖZET

KANSER HÜCRE MEMBRANI KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE SİTOTOKSİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Glioblastoma (GBM), yetişkinlerde en sık görülen ve en ölümcül primer beyin kanseridir. GBM'de cerrahi rezeksiyondan sonra hastalığın tedavisinde kemoterapi en yaygın yöntemdir. Ancak GBM'de ilaç tedavisinin klinik etkinliği çok tatmin edici değildir. GBM için etkili ilaç dağıtımı, zayıf fizikokimyasal özellikler, terapötik moleküllerin düşük hedefleme yeteneği ve hem kan-beyin bariyerinin (KBB) em de kan-beyin tümör bariyerinin (KBTB) varlığı nedeniyle büyük ölçüde sınırlıdır. Bu nedenle GBM tedavisinde fizyolojik ve patolojik engelleri aşan yeni terapötik platformların geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Bilim insanları, nanotaşıyıcı sistemlerin biyouyumluluğunu ve aktif hedefleme yeteneğini artırmak için hücre membranı (HM) kamuflajı gibi yeni tedavi yaklaşımları geliştirmeye odaklanmaktadır. Hücre membranı nanopartiküllerin kullanımı, geleneksel uygulamalara geniş bir işlevsellik yelpazesi sunmak için etkili bir yaklaşım haline gelmektedir. Hücre membranlarını nanopartikül yapılarla birleştirerek doğal biyomimetik nanoyapılar elde etmek gelişen bir araştırma alanıdır. Hücre membranlarının nanopartiküller üzerine kaplanması etkili bir biyo-arayüz sağlamaktadır. Bu nanotaşıyıcıların karmaşık biyolojik aktiviteleri doğrudan kopyalayan yüzeylere sahip olarak tasarlanmasıyla, esas olarak hücre zarından türetilen ve ana hücrenin özelliklerini taklit eden yapıların oluşumu sağlanarak vücutta uzun süreli dolaşım ve aktif hedefleme sağlanabilmektedir. Bu çalışmada sentezlenen biyomimetik nanoplatformun GBM tedavisindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. İlk olarak manyetik demir oksit parçacıkları birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenmiştir. Manyetik demir oksit parçacıklarının boyut dağılımı ve zeta potansiyeli dinamik ışık saçılımı (DLS) aracılığıyla analiz edilmiştir. İnsan beyninden izole edilmiş glioblastoma astrositomalarından U87-MG hücre hattından membran fragmentleri izole edilmiş ve zar proteinlerinin tespiti western blot yoluyla gerçekleştirilmiştir. Daha sonra koekstrüzyon yöntemiyle biyomimetik nano platform (Fe_3O_4@U87HM) birleştirilmiştir. Tersiyer butoksit korumalı lizin metakrilat (*tBoc*$_2$LzMA), temozolomid metakrilat (TMZMA) ve 2-hidroksi-etil metakrilat (HEMA) ünitelerini içeren kopolimerler RAFT polimerizasyonuyla sentezlenmiştir. Daha sonra *tBoc* koruma grupları asidik hidroliz reaksiyonu yoluyla uzaklaştırılmıştır. Polimerler Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, jel geçirgenlik kromatografisi ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (^{1}H NMR, GPC ve FTIR) analizleri ile karakterize edilmiştir. GPC analizinde polimerler monomodal dağılım sergilemiştir. Elektrostatik etkileşimlerden yararlanılarak nihai biyomimetik nanoplatform (Fe_3O_4@U87HM@P) hazırlanmıştır. Biyomimetik nanoplatformların boyutu ve morfolojisi TEM analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen nanoplatformun U87-MG glioblastoma kanser hücre ve kontrol hücre hattı olarak CCD-1079Sk sağlıklı insan fibroblast hücre

hattına karşı tedavi edici etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile sitotoksisite açısından değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multiform, Temozolomid, biyomimetik nanoplatform

SUMMARY

SYNTHESIS OF CANCER CELL MEMBRANE COATED MAGNETIC NANOPARTICLES AND INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFİCACY IN GLIOBLASTOMA TREATMENT

The most prevalent and deadly primary brain cancer in adults is called glioblastoma (GBM), In cases of GBM, chemotherapy is the most often used treatment after surgical resection. However, the clinical effectiveness of drug therapy in GBM is not very satisfactory. Efficient drug delivery for GBM is largely restricted by poor physicochemical properties, low targeting ability of therapeutic molecules, and the presence of both the BBB and the blood-brain tumor barrier (BBTB). Therefore, there is an urgent need to develop new therapeutic platform that overcome physiological and pathological barriers in the treatment of GBM. Scientists are focused on developing new therapeutic approaches such as cell membrane (CM) camouflage to increase the biocompatibility and active targeting ability of nanocarrier systems. The use of cell membrane-based nanoparticles is becoming an effective approach to deliver a wide range of functionality to conventional applications. Obtaining natural biomimetic nanostructures by combining cell membranes with nanoparticle structures is a developing field of research. Coating cell membranes on nanoparticles provides an effective biointerface. Long-term circulation and active targeting in the body can be accomplished by creating these nanocarriers with surfaces that accurately mimic complicated biological functions. These surfaces mostly originate from the cell membrane and copy the characteristics of the parent cell. In this study, it was aimed to investigate the effect of the synthesized biomimetic nanoplatform in the treatment of GBM. First, magnetic iron oxide particles were synthesized by co-precipitation method. Size distribution and zeta potential of magnetic iron oxide particles were analyzed via DLS. Membrane fragments were isolated from the U87-MG cell line from glioblastoma astrocytomas isolated from human brain, and membrane proteins were detected by western blotting. Afterwards, the biomimetic nano platform (Fe_3O_4@CM) were assembled by coextrusion method. The copolymers containing tertiary butoxide-protected lysine methacrylate (t*Boc*$_2$LysMA) temozolomide methacrylate (TMZMA) and 2-hydroxy-ethyl methacrylate (HEMA) units were synthesized via RAFT polymerization. Then, *tBoc* protecting groups were removed via acidic hydrolysis reaction. Polymers were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy, gel permeation chromatography and Fourier transform infrared spectroscopy (^{1}H NMR, GPC and FTIR) analyses. The size and morphology of the biomimetic nanoplarforms were characterized using TEM analysis. Therapeutic effect of the obtained nanoplatforms against U87-MG glioblastoma cancer cell and CCD-1079Sk healthy human fibroblast cell line as a control cell line 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test was evaluated forcytotoxicity.

Keywords: Glioblastoma Multiforme, Temozolomide, biomimetic nanoplatform

1. GİRİŞ

Kanser, kontrolsüz ve rastgele hücre bölünmesi ile karakterize edilen bir dizi hastalık için kullanılan genel bir terimdir. Dünya çapında en yaygın halk sağlığı sorunlarından biri olan kanser, dünya çapında ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve hormon tedavisi, kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemler arasındadır [1, 2]. Ancak istenmeyen yan etkiler sebebiyle yeni tedavi yöntemlerinin bulunmasına ihtiyaç vardır. Nanoteknoloji, kanser araştırma ve tedavisinde erken teşhis, teşhis ve tedavi için yenilikçi çözümler sunan umut verici bir alan olarak ortaya çıkmıştır. Hedefe yönelik tedavinin ortaya çıkışı hassas tedavide büyüme sağlamıştır [3]. Bununla birlikte, çoklu ilaç direnci gibi terapötik etkinliği sınırlayan birçok kaçınılmazyan etki hala mevcuttur. [4] Nanopartiküllerin kullanıldığı mevcut terapötik yaklaşımların sınırlamalarını gidermek için son zamanlarda çaba sarf edilmektedir. Nanopartikül bazlı ilaç dağıtım sistemleri, iyi farmakokinetik, hassas hedefleme, azaltılmış yan etkiler ve ilaç direnci göstererek kanser tedavisi ve yönetiminde faydaları yansıtmıştır [5, 6]. Kanserin tedavisinde nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmalar arasında son zamanlarda hedefe yönelik ilaç dağıtım sistemleri, fototermal(FTT) ve fotodinamik terapi (FDT) sistemleri ve gen terapi sistemleri giderek ivme kazanmıştır. Fototermal terapinin kanser tedavisinde uygulanması, bir FTT ajanının yakın kızılötesi ışığı absorblayarak ve ısıya dönüştürülmesi temeline dayanarak, çevredeki sağlıklı dokuya zarar vermeden kanser hücrelerini seçici olarak yok etmesidir. [7] Bu tez çalışması kapsamında PTT ajanı olarak Fe_3O_4 manyetik demir oksit nanoparçacık sentezlenmiştir. Nanoteknoloji önemli vaatler sunsa da aşılması gereken zorluklar da bulunmaktadır. Bu sebeple bilim insanları yenilikçi yaklaşımlar üzerine çalışmalarını genişleterek hücre membranı kaplı nanoplatformların oluşturulmasına yoğunlaşmıştır. Hücre zarı kaplı nanopartiküller, nanotıp alanında, özellikle kanser tedavisinde yenilikçi bir yaklaşımdır. Bu nanopartiküller, sentetik nanopartiküllerin kırmızı kan hücreleri, kanser hücreleri veya bağışıklık hücreleri gibi hücrelerin zarlarıyla kaplanmasıyla tasarlanmıştır. Bu kaplama, nanopartiküllere benzersiz özellikler kazandırarak kanser tedavisindeki işlevselliklerini ve etkinliklerini

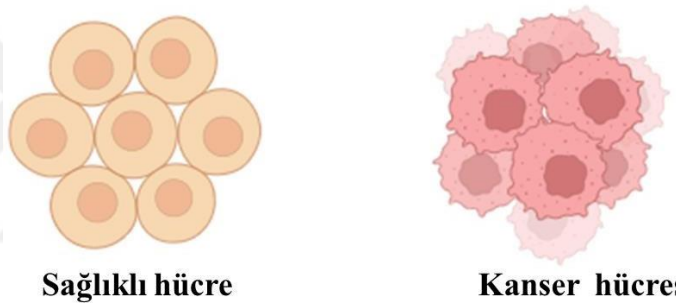
arttırmaktadır. Nanopartiküllerin hücre zarlarıyla kaplanması kaynak hücrelerin yüzey proteinleri ve lipitleri gibi doğal özelliklerini kazanmasını sağlamaktadır. Membran kaplı nanopartiküller bağışıklık sisteminden kaçabilir ve kan dolaşımında daha uzun dolaşım sürelerine yol açabilir. Bu, nanopartiküllerin tümör bölgelerine ulaşma ve orada birikme şansını arttırmaktadır. Kaynak hücreler kanser hücreleriyse, membran kaplı nanopartiküller, tercihen aynı türdeki diğer kanser hücrelerine bağlandıkları homotipik hedeflemeyi kullanabilmektedir [8].

Bu gibi avantajlardan yola çıkılarak tez çalışmasında sentezlenen inorganik parçacığın biyouyumluluğunu arttırmak, sistemik toksisiteye neden olmasını azaltmak ve homotipik hedeflemeyi sağlamak amacıyla bir protein kılıf U87-MG hücre membranı izole edilerek hücre membranı kaplı manyetik nanoyapılar (Fe_3O_4@U87HM) oluşturulmuştur. Ardından GBM tedavisinde birincil kemoterapötik ajan olan Temozolomid (TMZ) yan üniteleri içeren biyopolimer RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Elektrostatik etkileşimlerden yararlanılarak elde edilen polimeri Fe_3O_4@U87HM ile etkileştirilerek nihai biyomimetik nanoplatform (Fe_3O_4@U87HM@P) hazırlanmıştır. Biyomimetik nanoplarformların boyut ve zeta potansiyel değerleri DLS ile yüzey morfolojisi ise TEM analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen nanoplatformun U87-MG glioblastoma kanserhücre hattına karşı tedavi edici etkisi MTT testi ile sitotoksisite açısından değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser; Tanı ve Tedavi

Yaşamın devamı için hücreler sürekli bölünerek çoğalır. Yaşam süresini dolduran hücreler ise vücuttan atılırken genlerin hassas bir şekilde düzenlediği denge sayesinde yerlerine yeni hücreler bölünerek gelmektedir. Bazı genler hücre bölünmesini sağlarken bazı genler ise hücrelerin kontrolsüz bölünmesini önler. Hücrelerin çevresel veya kalıtsal faktörler sebebiyle kontrolsüz bölünmesinden kaynaklı gelişen bir grup hastalığa kanser adı verilmiştir. Kanser, halk sağlığını tehdit eden birincil hastalıklardan biridir. Kanser hücreleri, normal hücre davranışını düzenleyen sinyallere yanıt vermek yerine kontrolsüz bir şekilde büyür ve bölünür, normal dokuları ve organları istila eder ve sonunda tüm vücudun her yerine yayılır [9].



Şekil 2.1. Sağlıklı ve Kanser hücresi arasındaki morfolojik farklılıklar

Vücuttaki farklı hücre türlerinden herhangi birinin anormal çoğalmasının kansere yol açması günümüzde yüzden farklı kanser türünün tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Her bir kanser türünün ise hasta üzerindeki etkileri ve tedaviye yanıtları önemli ölçüde farklıdır. Kanser patolojisinde iyi huylu (bening) ve kötü huylu (malign) tümörlerin ayrımı en önemli konudur. İyi huylu bir tümör dokusu normal dokuyu istila etmez ve vücuda yayılmaz. Bunu yanı sıra kötü huylu bir tümör, hem çevresindeki normal dokuyu istila etme yeteneğine sahiptir hem de kendisine damar ağı (anjiyogenez) oluşturarak metastaz yolu ile tüm vücuda yayılma eğilimi sergilemektedir. Bilim insanları kanserli hücre ile sağlıklı hücre arasındaki morfolojik değişimleri inceleyen araştırmalar sonucunda; sağlıklı hücrelere kıyasla hücre çekirdeğinin kanser hücresinde daha büyük ve koyu olduğunu, sitoplazmanın ise küçük olduğunu

bildirmiştir (Şekil 2.1) [10]. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri 2018 raporuna göre tüm yaş gruplarında en sık rastlanan kanser türleri arasında akciğer (%21) ve meme (%25) kanseri bulunmaktadır. ABD istatistiklerine göre ise tüm kanser vakalarının yarısından fazlasını oluşturan en yaygın dört kanser türü meme, prostat, akciğer ve kolon/rektum kanserleridir. Ayrıca uluslararası çalışmalar, yıllık yaklaşık 100.000 kişi başına 0,59 ile 5 arasında bir görülme oranı bulunduğu bildirilmiştir.[11] Ancak, en ölümcül olan akciğer kanseri, tüm kanser ölümlerinin yaklaşık %30'undan sorumludur [12].

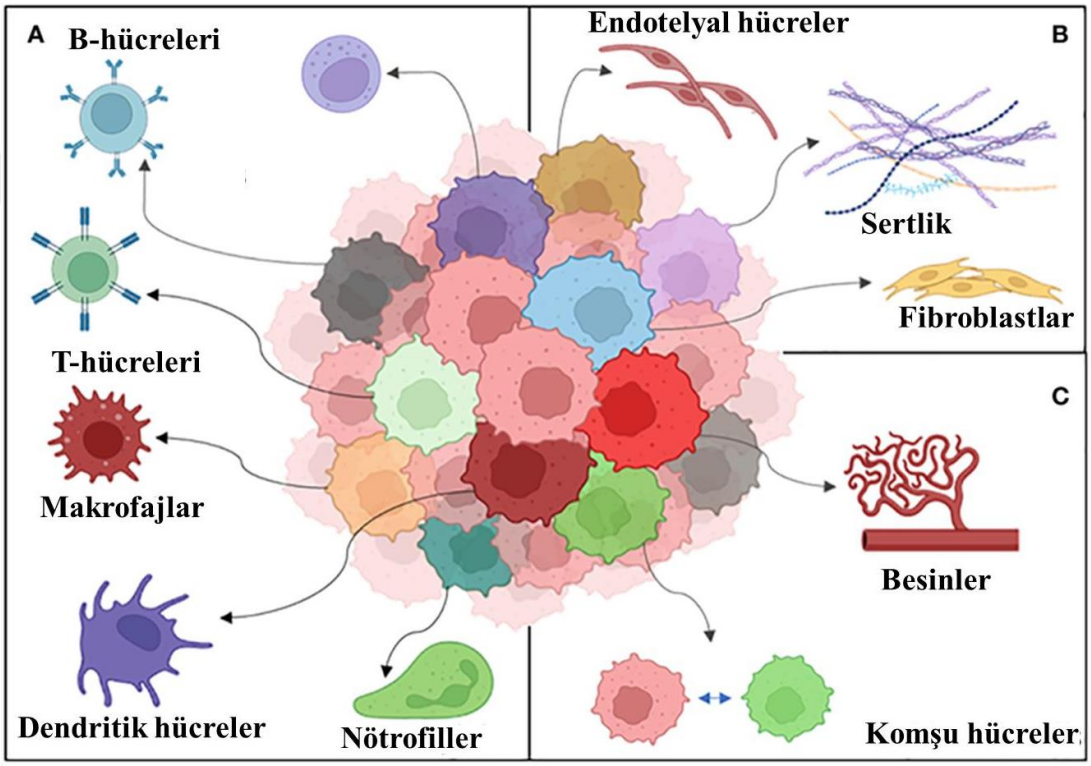
Kanser hastalığının tek sebebi kalıtsal etmenler değildir. Deney hayvanları üzerinde yapılan birçok araştırma sonucu radyasyon, kimyasallar ve birçok faktör karsinojen olarak adlandırılmıştır ve kansere sebep olduğu bildirilmiştir. Karsinojenik ajanlar fiziksel, kimyasal ve biyolojik kökenli olabilmektedir. Birden çok etmenin kanser hastalığına sebep olması, hastalığın tedavisini zorlaştıran parametrelerden biridir. Günümüzde kanser hastalığının tedavisi için kullanılan geleneksel yöntemler arasında kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi rezeksiyon yer almaktadır. Gelişen teknolojinin sunduğu faydalar sayesinde alternatif tedavi yöntemleri ortaya çıkmaktadır. Bunlar; immün terapi, hipertermi, hormon terapisi, fotodinamik terapi, kök hücre transplantı ve hedefe yönelik terapidir. Yeni tedavi yöntemlerinin son on yılda artmasına rağmen, kemoterapi hala kanser tedavisi için ana yöntemdir.

Kemoterapi, ilaçla tedavi anlamına gelmektedir ve kanser hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlara antikanser ilaçlar denir. Antikanser ilaçlar kökenlerine bağlı olarak bitkisel veya sentetik kökenli olabilmektedir. Etki mekanizmasına bağlı olarak ise alkile edici ajanlar, anti metabolitler, topoizomeraz inhibitörleri ve diğerleri olarak ayrılabilmektedir. Kanser hastalığının ilaçla tedavisinde ilaca bağlı direnç gelişimi ve yan etkiler hastanın yaşam kalitesinin günden güne azalmasına sebep olmaktadır. İlaca bağlı çoklu direnç gelişiminden kaynaklı oluşan ölüm oranlarının %90 olduğu istatistiksel verilerle bildirilmiştir. İlaca bağlı çoklu direnç gelişimi, artan ilaç dozu, genetik faktörler gen (mutasyonları, amplifikasyonlar ve epigenetik değişiklikler) dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla ilişkilendirilebilir. Bu mekanizmaların her biri, uygulanan ilaçların terapötik etkinliğinin azalmasına yol açarak tümör tedavisinde daha fazla zorluğa neden olmaktadır [13]. İyonlaştırıcı ışın kullanılarak kanser hastalığının tedavisi ise radyoterapi olarak bilinir. Hastaya X ve gama (γ) ışınları gibi

yüksek enerjili foton radyasyonu uygulanarak kanser hücrelerini öldürmeyi hedefleyen bir tedavi yöntemidir. Radyoterapide ışınlar, doğrudan DNA'da tek sarmallı kırılmalara ve çift sarmallı kırılmalara neden olur, bu da hücre bölünmesinin ve çoğalmasının, hatta hücre nekrozu ve apoptozun sona ermesiyle sonuçlanır. Klinik bulgular kanser hastalarının %70'inin radyoterapi alması gerektiğini savunmuştur. Ancak hastada istenmeyen yan etki şiddetleri çok fazladır [14]. Kanser tedavisinde bağışıklık sistemini elemanlarını aktif hale getirilmesiyle kanser hücrelerinin apoptoz yolağına girmesi kanser immünoterapisi olarak bilinir. Bir biyolojik tedavidir ve canlı organizmalardan yapılan maddelerin kullanıldığı bir tedavi türüdür. Kanseri tedavi etmek için birden çok immünoterapi türleri kullanılabilmektedir. Bunlar: bağışıklık kontrol noktalarını bloke eden ilaçlar olan bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, T hücrelerinizin kanserle savaşma konusundaki doğal yeteneğini artıran bir tedavi olan T hücresi transfer tedavisi, monoklonal antikorlar, kanser aşıları ve immün sistem modülatörleri olarak sıralanabilir. İmmünoterapi uygulamalarında aşılması gereken en büyük zorluk, otoimmün yanıttır [15]. Hipertermi, normal dokuya çok az zarar vererek veya hiç zarar vermeden kanser hücrelerine zarar verip öldürmeye yardımcı olmak için vücut dokusunun 45 ºC'ye kadar ısıtıldığı bir tedavi türüdür. Kanseri tedavi etmek için yapılan hipertermiye termal tedavi, termal ablasyon, termoterapi veya fototermal terapi de (PDT) denmektedir. Geniş bir kullanım alanı bulunmamaktadır [16]. Kanser hücrelerini öldürmek için ışığa duyarlılaştırıcı ışıkla etkinleştirilen tedavi yöntemine Fotodinamik terapi denilmektedir. Işık bir lazerden veya LED'ler gibi başka bir kaynaktan gelebilir. Fotodinamik tedaviye PDT de denir. Fotodinamik terapi çoğunlukla lokal tedavi olarak kullanılır; bu, vücudun belirli bir bölümünü tedavi ettiği anlamına gelir. Işığa duyarlılaştırıcıları absorplayan hücreler belirli bir dalga boyundaki ışığa maruz bırakıldığında, ışığa duyarlılaştırıcı onları öldüren, oksijen radikali adı verilen bir oksijen formu üretir. Fotodinamik tedavi aynı zamanda tümördeki kan damarlarına da zarar verebilir, bu da tümörün büyümeye devam etmesi için ihtiyaç duyduğu kanı almasını engeller ve bağışıklık sisteminin vücudun diğer bölgelerindeki tümör hücrelerine saldırmasını tetikleyebilir. Son on yılda bu alanda yapılan çalışmalar umut verici olmuştur. Ancak hastalığın tedavisi için aydınlatılması gereken birçok parametre hala bulunmaktadır [17].

2.2 Tümör Mikroçevresi ve EPR Etkisi

Bir tümörü çevreleyen hücresel ortam tümör mikroçevresi (TME) olarak ifade edilir. Tümör mikroçevresi bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, kan damarları, hücre dışı matris ve sinyal molekülleri bileşenlerini içermektedir. Tümör mikro ortamı, tümörün büyümesinde, ilerlemesinde ve tedaviye yanıtta kritik bir rol oynar. Tümör mikro ortamına yönelik araştırmalar kanserin hücresel ve moleküler mekanizmasını hedef alan yeni tedaviler geliştirmeyi amaçlamaktadır [18].



Şekil 2.2: Tümör mikro ortamının farklı bileşenleri: (A) bağışıklık sistemi, (B) stroma ve (C) dış faktörler.

Hücrelerin bölünüp çoğalmaları için gereken besinlere ulaşmaları için tümör anjiyogenezi çok önemlidir. Kanser hücreleri için anjiyogenez çok önemlidir çünkü kan akışından gelen besinleri kullanarak bölünmeleri için gerekli enerjiyi sağlar ve istenmeyen kontrolsüz büyümenin gerçekleşmesine yol açar. Kanserli hücreler hızlı bir şekilde enerji elde etmek zorunda kaldığından, karbonhidratlar hücreler için önemli bir enerji kaynağı olarak hizmet eder [19]. Arttırılırmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi ilk olarak 1986 yılında Maeda ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır. Bu etki antikanser ajanın dağıtımı ve kanser nano tıbbı için bir model olarak kabul edilmiştir.

Sağlıklı dokularla lenfatik sistem sıkı bir şekilde istiflenmiş halde bulunur fakat tümör dokularının bozulmuş lenfatik drenajı sebebiyle antikanser ajanı taşıyan nano sistemlerin veya nanopartiküllerin damar ağ yapılarının arasından geçerek tümörlü dokuda biriktiği varsayılır. EPR fenomeninin ortaya çıkışından itibaren kanser nano tıbbında yapılan çalışmalar sürekli bir artış eğilimi göstermiştir.

EPR etkisinin nanopartikül bazlı ilaç dağıtım sistemleri kapsamında kanserin tedavisi için önemli etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir. EPR etkisinden yararlanmak amacıyla tümör mikroçevresini anlamaya yönelik yapılan araştırmalar nanopartikül temelli ilaç dağıtım stratejilerinin gelişmesine yol açmıştır. EPR etkisi, terapötik ajanların GBM tümör bölgesine iletilmesini iyileştirme konusunda umut vaat etmektedir, ancak KBB ve tümör heterojenliği ile ilgili zorlukların ele alınması gerekmektedir. Nanoparçacık tasarımı ve kombinasyon terapilerindeki ilerlemeler, GBM tedavisinde EPR etkisinin kullanımını optimize etmek için çok önemlidir ve bu zorlu beyin tümörü için potansiyel olarak daha etkili ve hedefe yönelik tedavilere yol açabilir. İlacın dağıtımını ve etkinliğini arttırmak amacıyla nanopartiküller sistemler, antikanser ajanları enkapsüle ederek ajanı tümör bölgesine hedeflenmesini sağlamak amacıyla tasarlanabilmektedir. Böylece tümör dokusunda antikanser ajan bozulmuş damaryapısı içerisinde birikebilmektedir. Aynı zamanda tasarlanan sistemlerin bir diğer ortakamacı sistemik toksisiteyi en aza indirmeyi hedefler. Meme kanseri üzerine araştırmalarını gerçekleştiren bir diğer araştırmacı grup Miele ve ark. 130 nm boyut dağılımına sahip albümine bağlı paklitaksel (PTX) (Abraxene) nano formülasyonunun önceki PTX formülasyonu Taxol'e göre daha düşük toksisite ve üstün etkinlik gösterdiğini bildirmiştir [20]. Bulgulardan bazıları, nanopartiküller tabanlı sistemlerin tümör dokusuna erişiminin gerçekleşmesi için dolaşım sisteminde elimine edilmeden uzun süre dolaşması gerektiği düşüncesidir. Ancak antikanser etkiye sahip olduğu düşünülen sistemin intravenöz veya oral yolla dolaşım sistemine karışmasından itibaren vücudun bağışıklık sistemi komplementerinden mononükleer fagositik sistem (MFS) tarafından ‘’yabancı madde’’ olarak algılanır ve hızlı bir şekilde elimine edilebilir. Bu bulgudan yola çıkarak bilim insanları, nanopartikül temelli sistemlerin insan vücudunda elimine edilmeden kanserli bölgeye antikanser ajanı, bir diğer deyim ile ‘’kargolarını’’, hedeflemek üzere yeni stratejiler geliştirmeye odaklanmıştır. Bu amaçla bilim insanları nanopartikül temelli ilaç dağıtımının etkinliğinin artması amacıyla kanda uzun süreli dolaşımı sağlayan polietilen glikol ile kaplama

(PEGilasyon) denilen strateji ile nanopartikül yüzeyinde modifikasyon gerçekleştirmiştir. Nanopartiküller sistemler üzerinde PEG kaplama immünojenik etkiyi aza indirdiği ve MFS'ye karşı dolaşımda elimine edilme süresini uzatması gibi avantajlar sayesinde bilim insanları tarafından tercih edilen bir strateji olmuştur. FDA tarafından 1995 yılında ilk onaylanan PEGlenmiş nanopartikül ürünü Doxil®-Stealth® lipozomları, doksorubisin biyoyararlanımını enjeksiyondan 1 hafta sonra serbest ilaca kıyasla yaklaşık 90 kat arttırdığı bildirilmiştir [21]. Yapılan başka bir çalışmada Klibanov ve arkadaşları, posfatidilkolin:kolesterolden (1:1) oluşan büyük tek katmanlı lipozomların yüzeyini, dioleoil p-(monometoksi polietilenglikol supinil)fosfotidiletanolin (PEG-PE) ile modifiye etmiştir. Araştırmanın sonucunda PEGilasyon stratejisinin uygulanması ile lipozomların kan dolaşımı yarı ömrünü 30 dakikadan 5 saate kadar arttırdığını bildirmiştir [22].

Vücuda uygulanan NP'lerin sistemik toksisitesi de çok önemlidir. Dolaşımdaki eritrositler NP'lerle doğrudan etkileşime girebilir, bu da eritrosit agregasyonuna ve/veya hemoglobin salınımına yol açabilir [23]. MFS hücrelerine göre eritrositler kan dolaşımında çok daha büyük bir hacim oluşturduğundan, NP'ler eritrositlerle karşılaşma olasılıkları daha yüksektir. Mekanizma tam olarak anlaşılmamasına rağmen, NP yüzey özelliklerinin NP-eritrosit etkileşimlerinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Katyonik NP'lerde eritrositler genellikle elektrostatik etkileşimler yoluyla negatif yüklü hücre yüzeyleri ile etkileşime girer. Örneğin, polietilenimin (PEI), poli-L-lisin ve poli (amido amin) (PAMAM) dendrimerleri dahil olmak üzere sentetik NP'leri oluşturmak için yaygın olarak kullanılan katyonik polimerlerin, eritrosit zarlarına zarar verdiği gösterilmiştir [24]. Qi ve diğerleri., ayrıca PEG'in, özellikle PEG içeriği arttıkça PAMAM bazlı NP'lerin neden olduğu hemolizi önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir [25]. PEGilasyon ile NP yüzey modifikasyonları gerçekleştirmenin başarılı sonuçları olduğu bilinse de son bildiriler immün stresi tetikleyerek istenmeyen yan etkilere yol açtığı yönündedir. Bu sebeple bilim insanları Tümör kan damarı ve mikro ortamın fiziksel veya farmakolojik olarak yeniden şekillendirilmesi ve tümör tutulması için ilaç yüklü nano formülasyonların TME'ye özgü hedefleme grupları ile modifikasyonu için farklı stratejilerin uygulanmasına yönelmiştir. Nano ilaçların tümör bölgelerinde tutulmalarını artırmanın bir yolu, TME'ye özgü bağlanan ligandların fibronektin, kollajen, laminin, integrin ve proteoglikan gibi hedefleme kısımlarına sahip NP formülasyonlarının geliştirilmesidir.

Bu spesifik biyobelirteçlere özgü bir terapötik sistem geliştirmek için bir dizi ligandla modifiye edilmiş araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Örneğin Fan ve diğerleri., epirubisin içeren nanoparçacıkları, özofagus kanseri için avb3 integrini bağlayan RGD peptidi ArgGly-Asp tripeptitleriyle modifiye ettiler. Bu tripeptidlerin tedavi etkinliğini artırdığı ve tümör birikimini azalttığı bildirilmiştir [26].

2.3 Glioblastoma Multiform (GBM)

Dünya sağlık örgütü tarafından açıklanan verilere göre Glioblastoma Multiform (GBM), en ölümcül insan kanserlerinden birini temsil eden dördüncü derece beyin tümörüdür. Görülme sıklığı erkeklerde daha yüksektir. Hastalığın semptomları sıklıkla baş ağrısı, fokal nörolojik defisitler, hafıza kaybı, konfüzyon, kişilik değişiklikleri veya nöbetler olarak rapor edilmiştir. Farelerde GBM'nin gen profili analizi ve genetik modellemesine göre, GBM'nin nöral kök hücrelerden (NSC'ler), NSC'den türetilmiş astrositlerden ve oligodendrosit öncü hücrelerinden (OPC'ler) türetildiğine dair kanıtlar vardır. Farklı hücresel kökenlerden türetilen GBM tümörleri, hayvan modellerinde farklı davranışlar gösterir. GBM'nin standart tedavisi, cerrahi rezeksiyonu ve ardından temozolomid (TMZ) kullanılarak kemo radyoterapiyi içerir. Ancak 2020 yılı verilerine göre ABD'de 5 yıllık sağkalım yalnızca %7,2 olarak kaydedilmiştir [27]. Beyin tümörlerinin cerrahi rezeksiyonu, 1980'lerin sonu ve 1990'ların başında gelişmeye başlayan görüntüleme sistemleri ile tıp alanında bir devrim yaratmıştır. "Beyin haritalaması", olarak isimlendirilen bu teknik büyük işlevsel öneme sahip ve yaşam kalitesinden sorumlu olan alanlardaki tümörün çıkarılması için anatomi veya doku yeniden organizasyonundaki bireysel farklılıkları hesaba katar. Tümör rezeksiyonunun kapsamı hayatta kalma süresiyle pozitif olarak ilişkilidir; mümkün olduğunda büyük total rezeksiyon (GTR) tercih edilir. GBM mikroskobik düzeyde parmak benzeri çıkıntılar ile büyüdüğünden dolayı cerrahi rezeksiyon sırasında tümörün tamamen çıkarımı gerçekleştirilememektedir [28].

Görüntüleme GBM rezeksiyonu için önemli bir araçtır. Şu an için altın standart manyetik rezonans görüntülemedir (MRI). MRI yüksek anatomik çözünürlük ve daha yüksek yumuşak doku kontrastı nedeniyle beyin tümörü görüntülemede sıklıkla tercih edilir. Kullanılan MRI kontrastı ve nabız dizisine bağlı olarak, kan damarları, tümör nekrozu ve kanama (kontrastlı T1 ağırlıklı), beyin omurilik sıvısı (T2 ağırlıklı), kan

perfüzyonu (dinamik) dahil olmak üzere tümör ve beyin dokusunun önemli özellikleri aydınlatılabilir. MRI'ın yanı sıra floresan görüntüleme ve hedefe yönelik görüntüleme teknikleri gelişmektedir [29].

Cerrahi rezeksiyon ve ardından kemo radyoterapiye rağmen GBM tümörlerinin neredeyse tamamı tedaviden sonra tekrarlamaktadır. GBM tedavisinde süregelen zorluklar arasında eksik rezeksiyonu, yüksek derecede genetik heterojenliği, özel kan KBB ve immünosupresif mikro ortamı bulunmaktadır. GBM'nin hücrelerinin yüksek derecede istilacı davranışı, hücresel düzeyde tam rezeksiyonu neredeyse imkânsız hale getirir. Ayrıca bol miktarda hipoksik bölge, glioma başlatan hücreler (GIC'ler) için perivasküler nişler sağlar. Kendi kendini yenileyen bu hücreler, potansiyel olarak daha agresif, radyo dirençli ve kemo-dirençli olan tekrarlayan tümörler üretebilir. Büyük tümörler arası ve tümör içi heterojenite, hedefe yönelik tedavi gelişimini karmaşık hale getirir [30].

GBM tedavisinin bir başka zorluğu da kemoterapötik ilaçların KBB üzerinden iletilmesidir. KBB, dolaşım sistemi ile merkezi sinir sisteminin hücre dışı alanı arasında koruyucu bir sınırdır. KBB esas olarak kan damarlarının duvarı boyunca sıkı bir bariyer oluşturan ve parankime geçebilecek bileşikleri seçici olarak sınırlayan endotel hücrelerinden oluşur. Sıkı bağlantıların boyutu 1 nm'den küçüktür ve küçük moleküllerin %98'inin nüfuz etmesini engeller. Sağlıklı beyin dokusunun aksine, GBM'deki KBB, zayıf biçimde oluşmuş, sızdıran kan damarları, yukarı regüle edilmiş taşıyıcı proteinler ve aşağı regüle edilmiş sıkı bağlantı proteinleri nedeniyle gelişmiş geçirgenlik sergiler. Bununla birlikte, KBB'nin bozulması belirli bir tümör boyunca tek tip değildir; bazı alanlar daha yüksek geçirgenliğe sahip kan damarları sergilerken diğer tümör alanları daha sağlam damarlara ve/veya vasküler geçiş noktalarına sahiptir. Kemoterapötik bir ilaç tümör dokusuna sızmayı başarsa bile, glioblastoma hücreleri tarafından akış pompalarının yukarı regülasyonu nedeniyle sıklıkla tümör hücrelerinde tedavi edici etki için yeterli olmamaktadır [31]. Tüm bu dezavantajlar sebebiyle tedavide kullanılmak için yeni platformların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

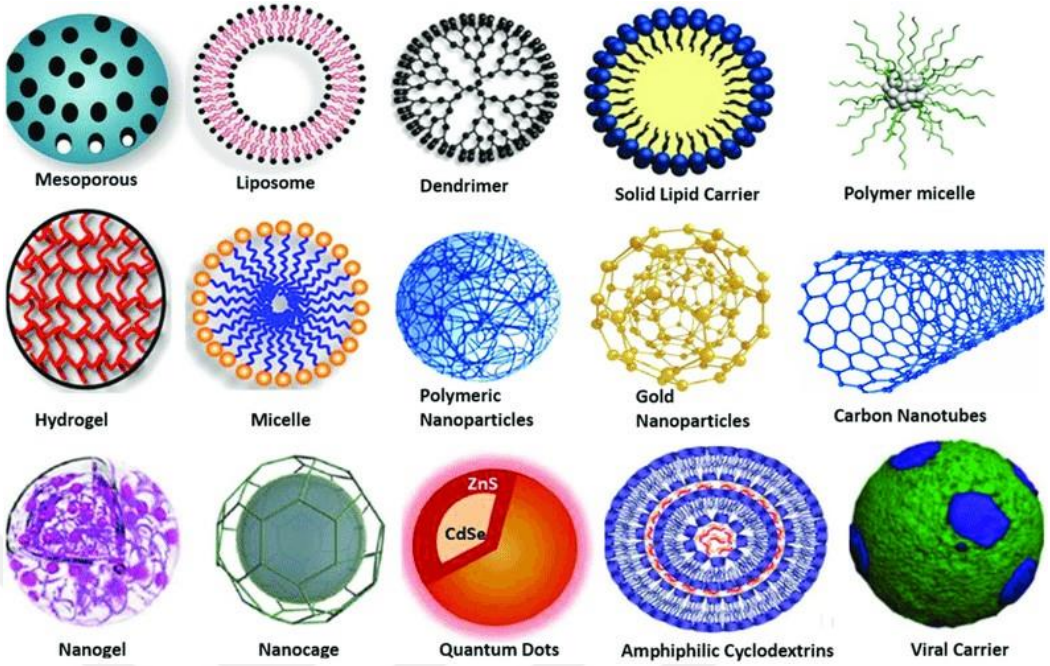
2.4 Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kanser teşhisini takiben geleneksel tedavi, tümörün mümkün olan en geniş ölçüde cerrahi olarak çıkarılmasını, antikanser ajan bazlı kemoterapi müdahalelerini ve radyasyon tedavisini (RT) içerir. GBM özelinde bakıldığında cerrahi görüntüleme teknolojisinin daha büyük cerrahi rezeksiyonların gerçekleştirilmesini kolaylaştırmasına rağmen, invaziv tümörün çıkarılması ile hastaların beyin fonksiyonu ve yaşam kalitesi arasında doğru dengeyi bulmaya her zaman ihtiyaç vardır. Odaklanmış radyasyonun eklenmesiyle artık GBM hastaları için ortalama 12,1 aylık sağkalım oranına ulaşılabilir. Ancak radyoterapi bilişsel bozukluk, DNA hasarı ve çok çeşitli diğer önemli fizyolojik ve sistemik olumsuz sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. FDA tarafından yayımlanan bilgiye göre bevacizumab anti-anjiyojenik bir ilaç olarak GBM tedavisi için onaylanmıştır. GBM tanısı konan kişiler, kemoterapi ve radyasyon tedavisiyle birlikte bevacizumab ilacının kullanımıyla daha uzun süre sağkalım bildirilmiştir, ancak genel sağkalımları (OS) iyileştirilmesi adına aşılması gereken engeller bulunmaktadır. Yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine rağmen birçok kemoterapötik ilacın etkinliği doza göre şiddeti değişen toksisiteler nedeniyle azalmaktadır. Bu sebeple hastalığın tedavisinde yeni stratejilerin bulunması gerekmektedir [32].

GBM için polimerik ilaç taşıyıcı sistemler, sistemik toksisiteyi en aza indirirken terapötik ajanların beyne dağıtımını iyileştirmeyi amaçlayan bir araştırma alanı olmuştur.

2.4.1 Nanopartikül tabanlı ilaç dağıtım sistemleri:

Nanopartiküller, fizikokimyasal özellikleri yüzey ligandlarının yardımıyla BBB boyunca dağıtımlarını kolaylaştırmak, kanser hücrelerini daha spesifik olarak hedeflemek ve gelişmiş antikanser etkinliği için TME ile etkileşime girmek için araştırmacılar tarafından istenilen stratejiye bağlı olarak tasarlanabildiğinden bu tür sınırlamalara umut verici bir çözüm sunar. Dağıtım verimliliği nanopartiküller kullanılarak daha da arttırılabilir çünkü bunların küçük boyutları, KBB'nin tümöre kolayca ulaşmasını sağlar [33]. Bu alanda araştırmacıların sıklıkla yöneldiği konular arasında polimerik ilaç taşıyıcı sistemler, metal parçacıkların kullanıldığı nano platformlar, hidrojeller, dendrimerler, karbon nanotüpler, miseller bulunmaktadır.



Şekil 2.3: Nanoteknolojik yaklaşımlar: ilaç taşıyıcı sistemler

Bu sistemlerin kanser tedavisindeki uygulamalarında birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

Tablo.1: Bazı nanoparçacıkların kanser tedavisinde kullanımının avantajları ve dezavantajları

Nanoparçacık Türü	Avantajlar	Dezavantajlar
Lipozomlar	Sentez kolaylığı, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, biyouyumluluk	Düşük stabilite
PLGA	Yüksek ilaç yükleme kapasitesi, biyouyumluluk	Düşük hedefleme yeteneği
Karbon Temelli NPs	Çok yüksek yüzey alanı, yüksek stabilite	Düşük ilaç yükleme kapasitesi, sitotoksik etki
Manyetik NPs	Yüksek hedefleme yeteneği, kontrollü ilaç salımı, fototermal etki	Düşük biyouyumluluk, potansiyel organ toksisitesi

Bu alanda yapılan çalışmalardan Ruan ve diğerleri, Ala-Ala-Asn-Cys-Lys (AuNPsAK) ve 2-siyano-6-aminobenzotiazol (AuNPs-CABT) olmak üzere farklı fonksiyonel ligandlara sahip iki grup altın nanopartikül (AuNP) sentezlemiştir. Burada kullanılan fonksiyonel ligandlar peptitlerdir ve KBB geçirgenliğini arttırmak amacıyla sisteme dahil edilmiştir. Ardından (AuNPsAK) ve (AuNPs-CABT) peptidlerde yer alan fonksiyonel gruplar varlığında AuNPs-A&C sentezlenmiştir. Bu sisteme antikanser ajan DOX enkapsüle edilmiş ve in vitro sonuçlar, DOX'un azaltılmış sistemik toksisitesi ile gliomanın terapötik sonucunun iyileştirilmesinde pozitif bir klinik öncesi önem gösterdiği bildirilmiştir [34].

Bir diğer grup, Kretovski ve diğerleri, silika nanopartikülleri (SiNP'ler), kullanmışlardır. Literatürde SiNP'lerin neden olduğu toksisitenin olası mekanizmaları halen aydınlatılamamıştır. Sunulan çalışma, SiNP'lerin glioblastoma LBC3 ve LN-18 hücrelerindeki moleküler ve hücresel etkileri hakkında yeni bilgiler sağlamaktadır.

Araştırmacılar 7 nm, 5-15 nm ve 10-20 nm'lik üç farklı boyutta SiNP sentezlemiştir. İn vitro sonuçlar sağlıklı hücre hattına kıyasla GBM hücre hattında SiNP'lerin sitotoksisteyi indüklediğini göstermiştir. Ayrıca, 5-15 nm SiNP'lerle tedavi edilen LBC3 hücrelerinde apoptoz ve nekrozun indüklendiğini, LN-18 hücrelerinde ise yalnızca nekrozun indüklendiği belirtilmiştir. 5-15 nm SiNP'lerin ayrıca oksidatif strese, mitokondriyal membran potansiyelinde kayba ve LBC3 hücrelerinde mitokondrinin üst yapısında değişikliklere neden olduğu literatüre kaydedilmiştir [35].

2.4.1.1 Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler

Polimerler, çok sayıda monomerin kovalent bağlarla birleştiği makromoleküllerdir. Hermann Staudinger, 1920'li yıllarda yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin ilk olarak polistiren (PS), polivinilklorür (PVC) ve kauçuk gibi maddelerin kovalent bağlar ile bir araya gelen polimer zincirlerinden oluştuğunu keşfetmiştir. Polimerler, sahip oldukları avantajlar sayesinde literatürde birçok farklı uygulama alanındaki araştırmaların konusu olmuştur. Bu avantajlardan bazıları, korozyona karşı yüksek stabilite, düşük yoğunluk ve kolay işlenebilirliği olarak sıralanabilmektedir [36].

Kontrollü Yaşayan Serbest Radikalik Polimerizasyon (CLRP)

Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon (CLRP), polimer kimyası alanında, iyi tanımlanmış yapılara, dar moleküler ağırlık dağılımlarına ve karmaşık ünitelere sahip polimerlerin sentezine olanak sağlayan önemli gelişmelere yol açmıştır. CLRP teknikleri, polimer zincir uzunluğu kontrolünü ve polimer özelliklerinin belirli uygulamalara göre ayarlanmasını mümkün kılmaktadır [37].

Son yıllarda en çok kullanılan CLRP yöntemleri;

- Nitroksit Aracılı Polimerizasyon (NMP),

- Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP),

- Tersinir Katılma-Parçalanma Zincir Transfer Polimerizasyon (RAFT)

olarak sınıflandırılmaktadır.

Çeşitli polimerizasyon koşullarına ve geniş bir monomer çeşitliliğine sahip olan RAFT tekniği, literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır. RAFT tekniği ile diğer CLRP

yöntemleri ile karşılaştırıldığında düşük molekül dağılımına (polidispersite) sahip polimerlerin sentezlenebilmesine olanak tanıması ve toksisiteye neden olan katalizlerin kullanılmaması RAFT polimerizasyonun önemli avantajları arasındadır.[37]

İlaçların polimerik sistemlere entegre edilmesi, onların farmakokinetik özelliklerini geliştirebilmekte, çözünürlüklerini arttırabilmekte ve kan dolaşımındaki dolaşım sürelerini uzatabilmektedir. Beyne ilaç verilmesiyle ilgili zorlukların üstesinden gelmek amacıyla GBM tedavisinde polimerik sistemler araştırılmıştır. Bu sistemler, GBM hücrelerine ilaç dağıtımını kolaylaştırmak için endojen taşıma mekanizmalarından veya reseptör aracılı alımdan yararlanabilmektedir. Ayrıca polimerik nanopartiküller GBM tedavisi için potansiyel ilaç taşıyıcıları olarak dikkat çekmiştir. Bu nanopartiküller, ilaçları kapsüllemek, onları bozunmaya karşı korumak ve KBB geçmelerini kolaylaştırmak için tasarlanabilmektedir. Ek olarak, bu nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları, hedef dışı etkileri azaltırken GBM hücrelerine hedeflemelerini artırabilmektedir.

Kemoterapötik bir ajan olan PTX, poli(laktit-ko-glikolit) (PLGA)'den oluşan bir NP içerisinde kapsüllenmiştir. GBM dokusunda az miktarda NP girebildiği için kemoterapötik ajanın hedefli iletimini arttırmak amacıyla araştırmacılar konveksiyonla güçlendirilmiş dağıtım (CED) sistemini kullanmıştır. Bu sistemin uygulanması pozitif bir basınç gradyanı altında hedeflenen bölgede kemoterapötik ajanın birikiminin artmasını sağlamak olarak bildirilmiştir. PLGA NP'ler, U87MG ksenograflı bir sıçan modelinde CED kullanılarak iletilmiştir ve CED kullanılmadan iletilen serbest PTX veya PTX yüklü PGLA NP'lerle yapılan tedavilerle karşılaştırıldığında daha uzun bir ortalama sağkalımla sonuçlanmıştır [38].

Nazokapin, mikrotübül destabilizasyonu yoluyla hücre döngülerini durduran bir merkezi sinir sistemi (MSS) kemoterapötik ajanıdır. Bu ajanın kullanıldığı bir çalışmada Ramesh ve ark. noskapin yüklü polikaprolakton (PCL) NP'lerin GBM hücrelerine etkisini araştırmıştır. NP'ler çift emülsiyon tekniği ile hazırlanmıştır. MTT analizleriyle hücresel toksisiteden elde edilen sonuçlar, U87-MG hücrelerinin canlılığının serbest nazokapine kıyasla azaldığını göstermiştir. IC_{50} konsantrasyonları 24, 48 ve 96 saat sonra NP'ler için sırasıyla 270 μM, 228 μM ve 176 μM olarak bildirilmiştir [39].

Yarı sentetik polimerler arasında kitosan en sık araştırılanlardan biridir. Liu ve diğerleri., retinoik asit ile yüklenmiş ve kitosan ile yüzeyi modifiye edilmiş katı lipit nanopartikülleri (SLN'ler) sentezlemişlerdir. Retinoik asit, iyi bilinen bir etki mekanizmasıyla güçlü bir antikanser ajandır ancak suda çözünürlüğünün zayıf olması kullanımını kısıtlamaktadır. Etki mekanizması, tümör hücrelerinin çekirdek membranında yüksek oranda eksprese edilen retinoik asit reseptörlerine bağlıdır. Sentezlenen nanoparçacığın pozitif yüklü olduğu bildirilmiştir. Negatif yüklü bir hücre zarı ile elektrostatik etkileşimler nedeniyle bu NP'lerin U87-MG hüre hattında hücresel alımı arttırdığı bildirilmiştir. NP'lerle tedavi edilen hücreler, serbest retinoik asit karşılaştırıldığında daha yüksek bir apoptoz yüzdesi göstermiştir. 10 μg/mL NP konsantrasyonunda %11,91'i erken apoptozda ve %16,57'si geç apoptozda olduğu bildirilmiştir. Bir diğer sonuç NP'lerin, 0.01 μg/mL'den 25 μg/mL'ye kadar çeşitli konsantrasyonlarda serbest retinoik asit ve yüzeyi kitosan ile modifiye edilmemiş katı lipit NP'lerle karşılaştırıldığında U87-MG hücrelerine karşı daha toksik olduğu belirtilmiştir [40].

2.4.1.2 Polimerik miseller

Amfifilik blok kopolimerlerin oluşturduğu kendiliğinden birleşen yapılar polimerik miseller olarak tanımlanmaktadır. Bu miseller, hidrofobik ilaçları çekirdekleri içinde enkapsüle edebilmekte ve GBM hücrelerine hedeflenen ilaç dağıtımı için bir araç sağlayabilmektedir. Hedefleyici ligandlar veya antikorlarla yapılan yüzey modifikasyonları bunların özgüllüğünü ve etkinliğini daha da artırabilmektedir.

Xu ve diğerleri, glioblastomayı tedavi etmek için kullanılan birinci basamak kemoterapi ilacı olan, normal fizyolojik koşullar altında hızla temizlenen ve zayıf stabiliteye sahip olan Temozolomidin (TMZ), etkinliğini arttırmak amacıyla poli(2-etil-2-oksazolin) (PEtOz) konjuge TMZ (PEtOz-TMZ) sentezlemiştir. Miselleri doğrudan PBS içerisinde elde edilmiştir. PEtOz-TMZ konjugasyonu, TMZ'nin DNA alkilasyonunu etkilemediği ve TMZ'nin stabilitesini arttırdığı, in vivo dolaşım süresini uzattığı ve glioblastomada TMZ birikimini arttırdığı bildirilmiştir. İn vivo çalışmalar, miselin, TMZ'nin glioblastoma büyümesini engelleme etkinliğini önemli ölçüde arttırdığı yönündedir [41].

Literatüre farklı bir bakış açısı kazandırmak amacıyla Li ve arkadaşları, kolesterol-konjuge polioksietilen sorbitol oleat (CPSO) temelinde yeni bir beyin dağıtım sistemi

sentezlenmiştir. Bu çalışmada, kendi kendine birleşen CPSO misellerinin KBB boyunca taşınmasını kolaylaştırabilecek bir beyin dağıtım sistemi tasarlamayı amaçlamışlardır. CPSO misellerinin, yaklaşık 170 nm'de ortalama parçacık boyutuna ve ~%20 ilaç yükleme oranına sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca MTT testi, CPSO'nun intravenöz enjeksiyon için yeterince güvenli olduğu kanıtlamıştır. Floresan çalışması, CPSO'nun U87 hücrelerinde önemli ölçüde göstermiştir. Farmakodinamik çalışma, PTX yüklü CPSO misellerinin, salin ve Taxol® gruplarına kıyasla anlamlı tümör inhibisyonu sağlayabildiğini ve ortalama hayatta kalma sürelerini uzatabildiğini göstermiştir [42].

Hidrofilik bir parça ile konjuge PCL polimer zincirleri, polimerik miseller oluşturmak üzere sulu ortamda kendiliğinden birleşebilir. Marslin ve ark. bir halka açma polimerizasyon yöntemiyle metoksi poli(etilen glikol)-poli(ε-kaprolakton)'un bir kopolimerini sentezledi. Sentezlenen polimer zincirleri, su ortamında yüzen misellerin hidrofobik iç çekirdeğinde kurkumini enkapsüle etmiştir. NP'lerin fizyokimyasal özellikleri ve U251 hücreleri üzerindeki sitotoksisite araştırılmıştır. Ayrıca zebra balığı embriyolarında oksidatif hasar, hücresel alım ve NP'lerin in vivo dağılımı kontrol edilmiştir. Floresan görüntüler, PEG-PCL NP'lerin zebra balıklarının beyinlerinde kurkumini harekete geçirdiğini göstermiştir. Pasif ilaç dağıtım sistemlerine ek olarak, hedeflenen taşıyıcılar ilacın beyne nüfuzunu artırdığı bildirilmiştir. [43].

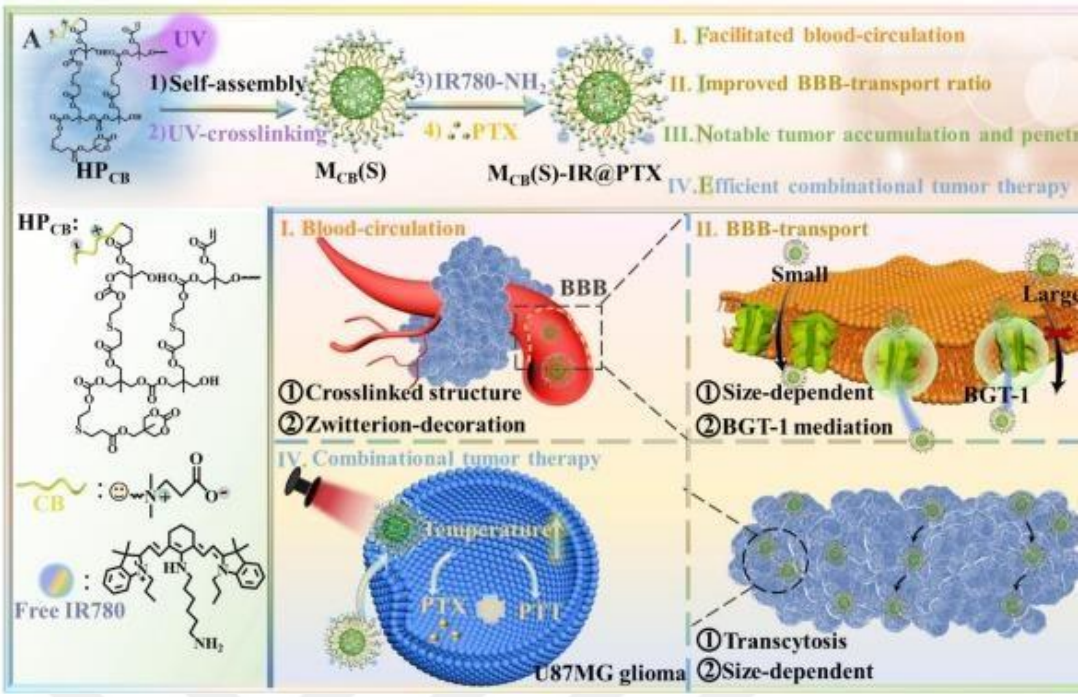
Dendrimerler: İyi tanımlanmış bir yapıya sahip, oldukça dallanmış polimerler olarak tanımlanmaktadır. Boyut ve moleküler ağırlık üzerinde hassas kontrolün yanı sıra ilaçları içlerinde kapsülleme veya yüzeylerine bağlama yeteneği gibi avantajlar sunarlar. Dendrimerler, KBB'ye nüfuz etme ve tümör hücrelerini seçici olarak hedefleme yeteneklerinden dolayı GBM tedavisi için ilaç taşıyıcıları olarak kullanılabilmektedir [44].

Hidrojeller: Biyouyumlu polimerlerden oluşan hidrojeller, GBM tümörlerine lokal ilaç dağıtımı açısından araştırılmıştır. Bu hidrojeller terapötik ajanlarla yüklenebilir ve tümör bölgesine implante edilebilir, böylece sistemik maruz kalma en aza indirilirken ilaçların sürekli salınımı sağlanır. Ayrıca, tümör mikroçevresinde bulunan pH veya enzimler gibi uyaranlara yanıt verecek şekilde tasarlanarak kontrollü ilaç salınımına olanak tanıyabilimektedir [45].

2.4.1.3 Çoklu uyaranlara yanıt veren platformlar

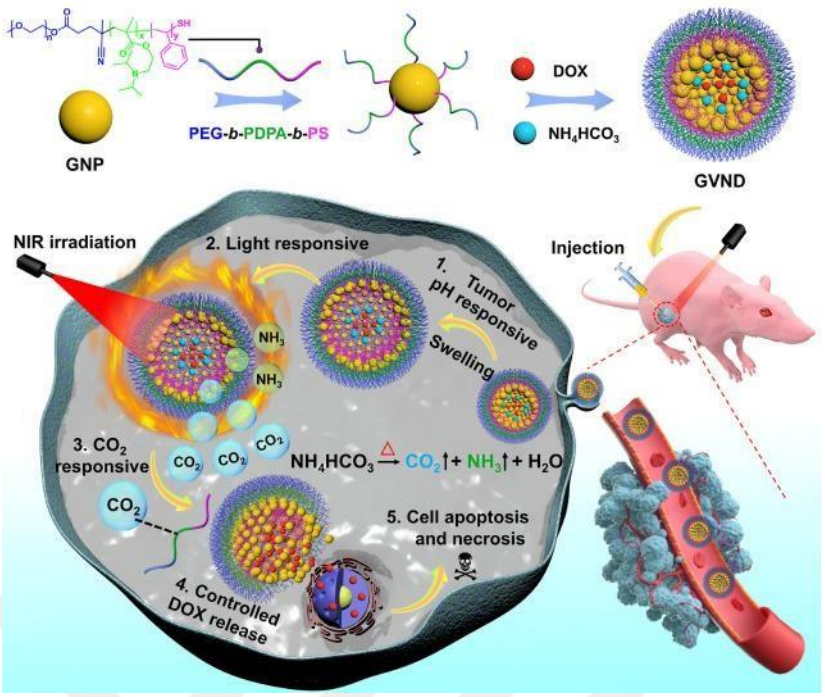
Araştırmacılar, ilaç dağıtımını tanısal görüntüleme veya fototermal veya fotodinamik terapi gibi tedavi yöntemleriyle birleştiren çok işlevli polimerik platformlar geliştirmektedir. Bu platformlar, GBM tedavisine yönelik birden fazla terapötik stratejiyi birleştirerek sinerjistik etkiler elde etmeyi amaçlamaktadır. Genel olarak polimerik ilaç taşıyıcı sistemler, sistemik yan etkileri en aza indirirken beyne ve tümör bölgesine ilaç dağıtımını artırarak GBM tedavisinin etkinliğini ve güvenliğini artırma konusunda ilerleme kat etmiştir. Bu alanda devam eden araştırmalar, GBM tedavisiyle ilgili zorlukların üstesinden gelmek için yeni polimerik malzemeleri, formülasyon stratejilerini ve hedefleme yaklaşımlarını araştırmayı amaçlamaktadır [46].

Wang ve arkadaşları, bu araştırmada beyne iletim zorluklarının üstesinden gelmek için karboksibetain (CB) zwitteriyonik monomer ile işlevselleştirilmiş aşırı dallanmış (hyper-branched) polikarbonata (HPCB) dayalı nano sistem (MCB(S)) geliştirilmiştir. Sisteme dahil edilen IR780 kimyasalı amino grubu ile modifiye edilmiştir **(IR780-NH_2).** Sentezlenen platforma PTX enkapsüle edilmiştir. (MCB(S)-IR@PTX). PTX'in salımını arttırmak ve tümör mikroçevresinde hipertermi etkisinden yararlanmak adına sistem NIR ile uyarılmıştır. Nano sistemin MCB(S)-IR@PTX, biyoyararlanım süresini uzattığı ve BGT-1 yoluyla KBB geçişini kolaylaştırıldığı bildirilmiştir. Süper küçük boyutun avantajıyla birlikte MCB(S)-IR@PTX, nano sisteminin tümör bölgelerinde yüksek oranda biriktiği bildirilmiştir. Bu faydalar, U87MG ortotopik GBM taşıyan fare modelinde tümör büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiği ve hayatta kalma süresini arttırdığı literatüre kaydedilmiştir [47].



Şekil 2.4: IR780 ile konjuge edilmiş ve PTX (MCB(S)-IR@PTX) ile yüklenmiş süper küçük zwitteriyonik miselin (MCB(S)) şematik gösterimi. [47]

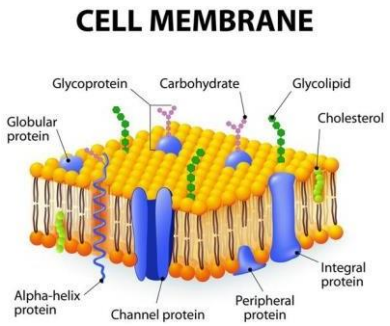
Çoklu uyaranlara yanıt veren sistemler üzerine araştırmasını gerçekleştiren Younis ve arkadaşları, asit/karbon dioksit (H^+/CO_2)-duyarlı bir poli(etilen glikol)-b-poli(2-(diizopropilamino) etil metakrilat)-*b*-polistiren triblok polimer (PEG-*b*-PDPA) sentezlenmiştir. Polimerik yapıya kemoterapötik ajan DOX, altın nanoparçacık ile polimerik yapının kaplanması aşamasında yüklenmiştir. GVND olarak isimlendirilmiştir. GVND'deki yüzey polimerinin kendine özgü ultra duyarlı pH'a duyarlı özelliği nedeniyle, lazer ışınlaması altında tümör dokularında CO_2'ye duyarlı bomba benzeri DOX salınımı sergilemiştir. Bu nedenle GVND, U87MG tümör taşıyan farelerde etkili bir tümör büyümesi inhibisyonuna yol açan iyi bir antitümör etkisi sergilemiştir. Bu çalışma, kemoterapötik ilaçların çoklu uyaranlara yanıt veren programlı salınımı için akıllı bir nanotaşıyıcı olarak literatüre kaydedilmiştir [48].



Şekil 2.5: Glioblastoma karşı kemoterapötik ilaçlar doksorubisinin (DOX) programlı salınımı için çoklu uyaranlara yanıt veren altın keseciklerin (GVND) oluşumunun ve etki mekanizmasının şematik gösterimi.

2.5 Hücre Membranı kaplı Nanopartiküller: Doğadan esinlenilen nanoteknolojik yaklaşımlar

Her biyolojik zar, ayrıntılı yapısı, bileşimi, dinamikleri ve işlevi bakımından benzersizdir, ancak tüm hücre zarları için geçerli olan ve zar yapısının herhangi bir temsilinde bulunması gereken bazı genel yapısal ve organizasyonel ilkeler vardır. Akışkan-Mozaik Zar (FMM) modeli, biyolojik zarların temel organizasyonu ve dinamikleri için basit, genel bir çerçeve sağlamak için 1972'de literatürde tanıtılmıştır [49].



Şekil 2.6: Hücre membranının yapısı

İlke 1: Biyolojik zarlar, van der Walls kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimler tarafından indüklenen kovalent olmayan bağlar tarafından ve çok az derecede iyonik ve diğer etkileşimler tarafından bir arada tutulur [50].

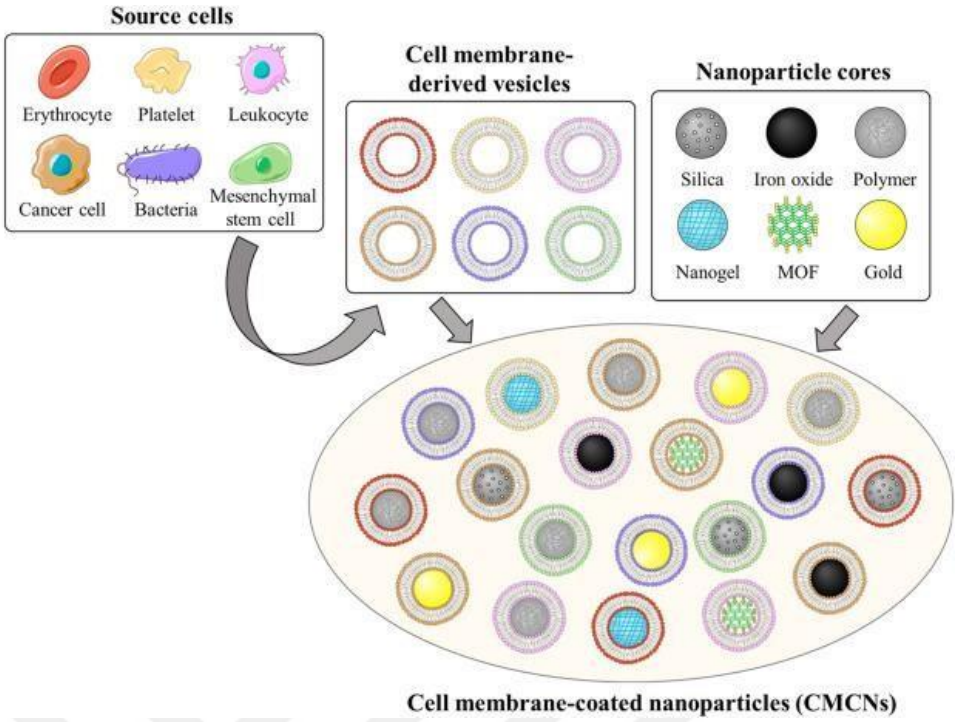
İlke II: Lipit çift katmanları, biyolojik zarların temel matrisini ve sürekliliğini sağlar ve amfipatik bütünleyici zar proteinleri ve glikoproteinler, biyosentezleri sırasında bu lipid çift katmanlı matrise asimetrik olarak eklenir. Biyolojik zarların başlangıç noktası, iki katmanlı bir lipit matrisi, sulu yüzeyler üzerinde yağ katmanları iledeneyler yapan Bilim insanı Langmuir'in sonuçlarıyla açığa çıkmıştır.

İlke III: Membran bileşenleri, en düşük serbest enerji durumuna yaklaşmak için proteinlerin ve lipidlerin hidrofobik eşleşmesi gibi uyumlu moleküler etkileşimleri maksimize etmeye çalışır. Kovalent olmayan hidrofobik kuvvetlerin, entegre membran bileşenlerinin hidrofobik ve hidrofilik bölgelerinin eşleşmesine ve suyun hidrofobik bölgelerden dışlanmasına neden olan temel itici güç olduğu fikri, sulu ortamdaki membran yapılarının stabilitesinin en olası nedenidir

İlke IV: Membranlar genellikle farklı bileşen bileşimlerine, dönme ve yanal hareketliliklere, ömürlere ve işlevlere sahip çeşitli alanlarda veya bölgelerde düzenlenir [51].

Hücre membranlarının kolay izole edilebilir olması, üzerinde bulunan proteinlerin çeşitli fonksiyonel alanlarda kullanılabilirliği bilim insanlarını nanomalzemeler üzerine kaplama teknolojisini araştırma alanında teşvik etmiştir. Nanopartiküller, görüntüleme boyası, polimerler, enzimler ve diğer biyomoleküller gibi yüzey parçaları tarafından işlevselleştirilme yeteneğine sahiptir. Her ne kadar bu nanoparçacıklar,

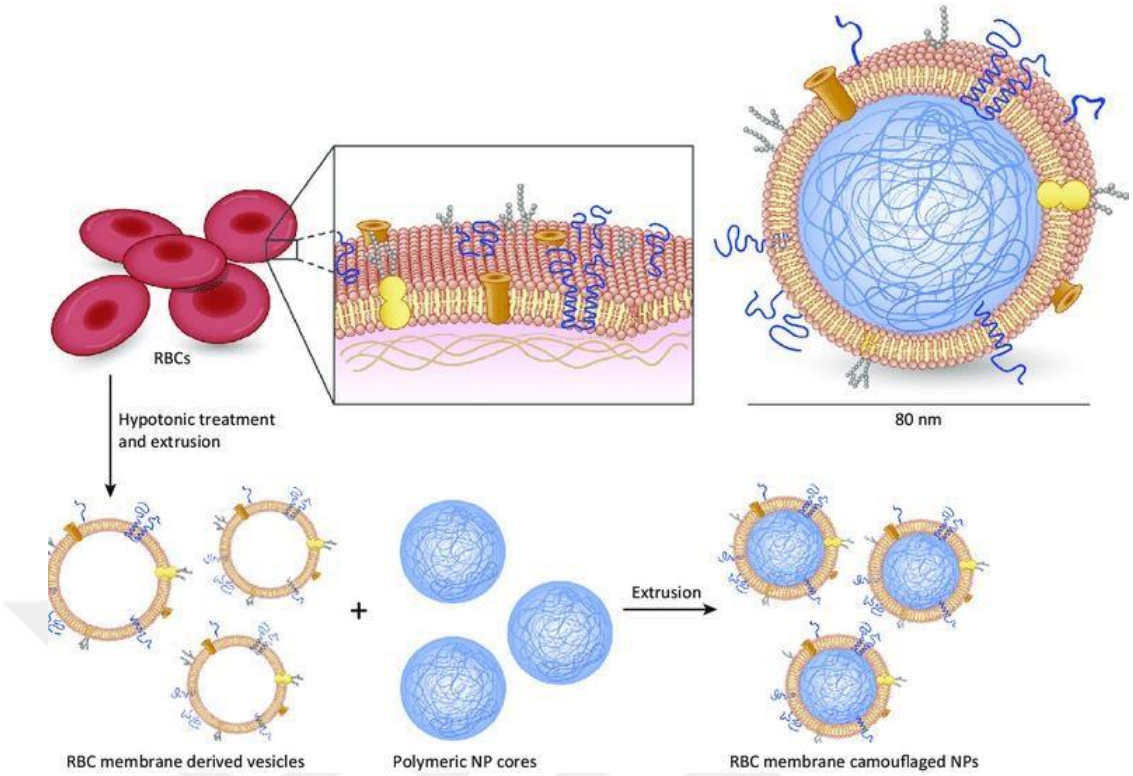
üstünlükleri nedeniyle tıbbi araştırmalarda oldukça yaygın olsalar da hem etkinlik hem de güvenlik açısından, bu nanopartiküller için önemli zorluk, bir kez in vivo uygulandığında yabancı elementler olarak tanınması ve ortadan kaldırılmasıdır. Bu nedenle, doku uyumluluğunu artırmak ve immünolojik davranışı azaltmak için nanoparçacıkların karmaşık iç ortamlarla uyumluluğu için stratejilere ihtiyaç vardır. Nanoterapötiklerdeki daha büyük ilerleme ve keşiflere rağmen, kliniklerde sentetik nanomalzemelerin uygulanması, bağışıklık bariyerleri, sınırlı kan dolaşım süresi, biyolojik dağılım ve toksisite nedeniyle hala zorlu bir görevdir. Bu sorunların üstesinden gelmek için, hücre zarı kaplı nanoparçacıklar, etkili ve hedeflenen teslimat için yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda nanopartiküller üzerinde hücre membranlarının kaplanması, etkili biyo-arayüz için gerekli olan oldukça karmaşık aktiviteleri doğrudan kopyalayan yüzeylere sahip nano-taşıyıcılar tasarlamak için kolay bir yöntem sağlayan bir platform teknolojisidir. Hücre membranıyla kaplanmış nanopartiküller, esas olarak zardan çıkarılan kaynak hücrelerin özelliklerini taklit ederek uzun dolaşım ve hastalıkla ilgili hedefleme sağlar. Literatürde izole edilen hücre membranları arasında kullanılan kaynak hücreler; eritrosit membranları, lökosit membranları, trombosit membranları, kanser hücre membranları ve kök hücre membranları olarak bildirilmiştir. Çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanımları ise literatüre kaydedilmiştir [8].



Şekil 2.7: Hücre membran izolasyonunda kaynak hücreler ve hücre membranı kaplı nanopartiküllerin çeşitleri

2.5.1 Eritrosit hücre membranları

Kırmızı kan hücreleri (RBC'ler veya KKH), mikrolitre başına yaklaşık 5 milyon ile kanda en bol bulunan hücresel içeriktir. Olgun KKH çekirdeği ve karmaşık organelleri olmadığından, KKH'ler membran ekstraksiyonu ve saflaştırma için uygundur. Genel olarak KKH'ler insan vücudunda 120 güne kadar dolaşımda kalabilmektedir. KKH'lerin yapısında bulunan belirteçlerden biri, KKH'leri makrofajlar tarafından fagositozdan korumak için inhibitör reseptör SIRP α üzerinde etki gösteren immünomodülatör bir protein olan CD47'dir. Bütün bunlar göz önüne alındığında, KKH membranı, NP'lere in vivo görünmezlik kazandıracak umut verici bir biyomimetik materyal olarak görülmektedir. Bu özellik, KKH membranı kaplı NPs uygulamalarının literatürde bir hastalık tedavisi için yaygın bir şekilde araştırılmasını sağlamıştır. Hücre membranı kaplı NPs uygulamalarının ilk araştırması KKH'lerin kaynak hücre olarak kullanıldığı bir uygulamadır. Hu ve arkadaşları tarafından ilk olarak 2014 yılında geliştirilen bu sistemde ilk önce hücresel membranlar izole edilmiştir ve daha sonra membranlar, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) NPs'nin üzerine kaplanmıştır [52].



Şekil 2.8:KKH membran kaplı PLGA nanopartiküllerinin (NP'ler) hazırlanma sürecinin şematik gösterimi.

2.5.2 Lökosit hücre membranları

Lökositler biyolojik engelleri aşabilir ve makrofajlar, dentritik hücreler (DC'ler), doğal katil (NK) hücreleri vb. dahil olmak üzere hedef dokulara ulaşabilir. Tümör dokusu, kronik bir inflamasyon dokusudur ve lökositleri çekmek ve toplamak için birçok sitokin ve kemokin salgılar. Bu sebeple bu kaynak hücrelerden izole edilen hücre membranları çeşitli faydalar sağlamaktadır.

2.5.2.1 Makrofaj membranları

Makrofaj membranları üzerindeki C-C kemokin reseptörü 2 (CCR2), vasküler hücre yapışma molekülü-1 (VCAM-1) ve hücreler arası yapışma molekülü-1 (ICAM-1) gibi bazı spesifik reseptörler ve yapışma molekülleri, makrofaj membranı ile kaplanmış nanopartikülleri tümör bölgelerine yönlendirebilir. Ek olarak makrofaj membranlarındaki α4 ve β1 integrinleri, kanser hücresi membranlarındaki VCAM-1 ile etkileşime girerek makrofaj membran kaplı nanopartiküllerin kanser hücrelerini ve kanser metastazını hedeflemesine olanak tanımaktadır [53].

2.5.2.2 Dendritik hücre (DH) membranları

Dendritik hücre membranında geniş spektrumlu peptid/MHC kompleksleri bulunduğundan T hücrelerini spesifik olarak aktive edebilirler. Ayrıca, ICAM-3, CD40, CD44 ve DH membranlarındaki integrinler dahil olmak üzere yapışma molekülleri ve yardımcı uyarıcı moleküller, hücre yapışmasına aracılık edebilmektedir. DH membranı kaplı nanopartiküllerin kanserli bölgede antijen sunma yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir [54].

2.5.2.3 Doğal katil (DK) hücre membranları

DK hücreleri, hücre yüzeyindeki stres proteinleri ve MHC-I'in anormal ekspresyonunu immün olarak izleyerek kanser hücrelerinin öldürülmesinde ve antibakteriyel bir rol oynar. DK hücreleri, tümör antijenine spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine sahip olmadığı bildirilmiştir. Ancak; NKG2D, NKp44, NKp46, NKp30 ve DNAM-1 dahil olmak üzere kanser hücrelerini tanıyabilen birçok alternatif reseptöre sahiptir. Bu nedenle, DK hücre membranı kaplı nanopartiküller iyi bir biyouyumluluğa, tümör hedeflemeye ve tümör hedefleme yeteneğine sahiptir [55].

2.5.3 Trombosit membranları

Trombositler, kanser hücreleri üzerindeki yukarı regüle edilmiş CD44 reseptörüne spesifik olarak bağlanabilen P-selektin'i aşırı eksprese eder. Bu nedenle trombosit membranları, tümörleri aktif olarak hedeflemek ve tümör hücrelerini dolaşımda tutmak için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Ayrıca trombosit membranlarındaki CD59 ve CD55 gibi diğer proteinler de bağışıklık sistemi saldırısını engelleyebilir. Bu proteinler, kan damarlarında trombosit zarı kaplı nanopartiküllerin dolaşımının uzatılmasına katkıda bulunmaktadır [56].

2.5.4 Kanser hücre (KH) membranları

Kanser hücresi membranları üzerindeki bir dizi protein nedeniyle, kanser hücresi zarı kaplı nanopartiküller (KHMKNPs'ler) uzun süreli sistemik dolaşıma sahip olabilir, bağışıklıktan kaçmayı başarabilir ve homotipik tümörleri hedefleyebilir. Kanser hücreleri üzerindeki CD47 molekülleri, özellikle MCF-7, MDA-231 ve 4T113 dahil olmak üzere belirli meme kanseri hücre dizileri için bağışıklıktan kaçış açısından çok önemlidir. Thomsen-Friedenreich antijenleri, Galektin-3, N-kadherin, epitelyal hücre adezyon molekülü (EpCAM) ve kanser hücre membranlarındaki E-kadherin, tümörü, homotipik tümör hücrelerini ve adezyonu hedeflemek için çok önemlidir [57].

2.5.5 Kaynak hücrelerden membran izolasyon yöntemleri

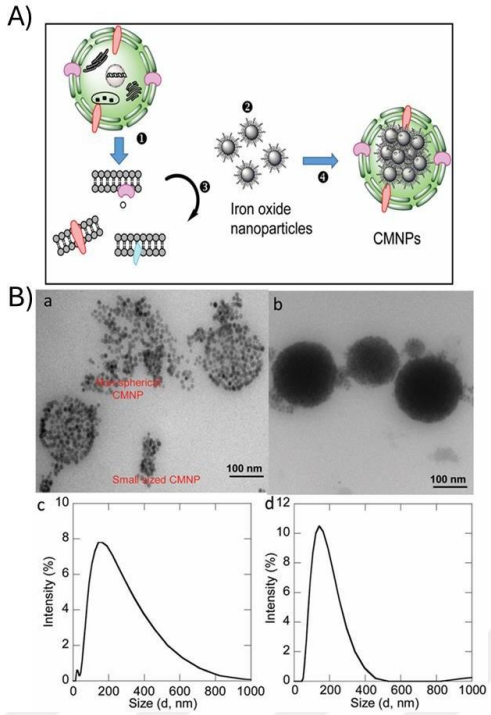
Hücre membranı kaplı nanopartiküller (HMNPs) nanopartiküller ile farklı yöntemlerle birleştirilebilir. Ekstrüzyon, ultrasonik yöntem ve mikroakışkan elektroporasyon literatürde kullanılan üç ana yöntemdir.

Ekstrüzyon, literatürde hücre membran veziküllerini hazırlamak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hücre membran vezikülleri ve nanoparçacık çekirdekleri, kademeli olarak azalan gözenek çaplarına (400 nm'den 100 nm'ye) sahip polikarbonat gözenekli zarlardan ekstrüde edilir. Hücre zarının akışkanlığı nedeniyle, ekstrüzyon, nanoparçacıkların fosfolipit çift tabakasından geçmesine neden olan ve zar vezikül-nanopartikül füzyonuyla sonuçlanan mekanik kuvveti üretir. Elde edilen nano platformun boyutu temel olarak polikarbonat gözenekli membran gözeneklerinin çapına bağlıdır. Bu yöntem, zar proteinlerinin biyolojik aktivitesini büyük ölçüde sağlar. Yöntemin dezavantajı zaman alıcı bir süreç olması olarak bildirilmiştir [58].

Ultrasonikasyon, hücre membranı ve nanoparçacık füzyonunun sağlanması için ekstrüzyona alternatif bir yöntemdir. Bu metotta nanoparçacıklar hücre membran vezikülleri ile inkübe edilir. Ultrasonik ses dalgaları nanoparçacık ile membran veziküllerinin birleşmesini sağlar. Bu yöntemin zaman kazandırdığı bildirilmiştir ancak elde edilen hücre membranı kaplı nanoparçacıkların boyut dağılımı düzensiz olabilmektedir [59].

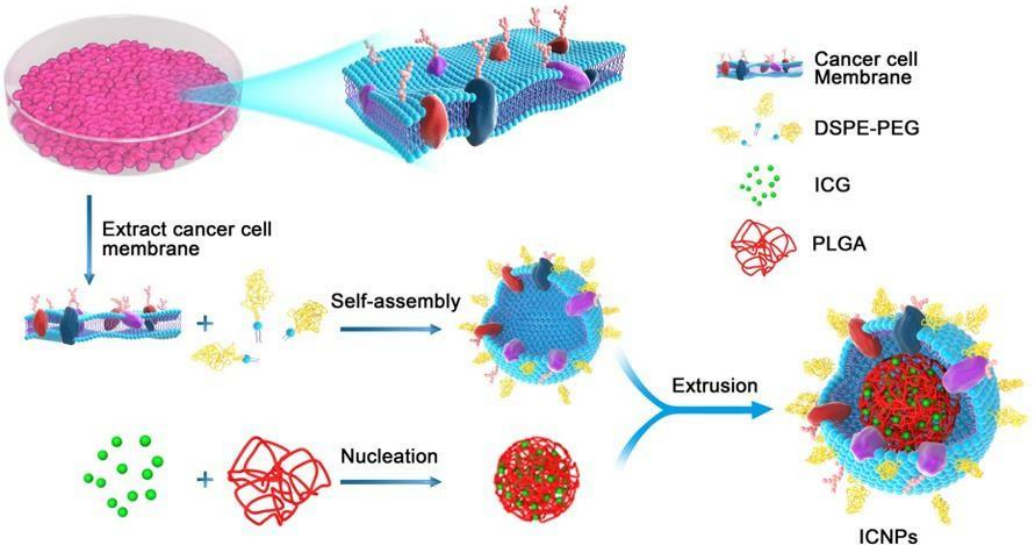
Mikroakışkan elektroporasyon yönteminde, Elektromanyetik enerji, mikroakışkan bir çip tarafından hücre zarlarında delikler oluşturur. Çekirdek nanopartiküller hücre zarı vezikülleri ile karıştırıldığında, bu delikler veziküllerin nanopartikülleri kaplamasına yardımcı olur. Bu yöntemle hazırlanan hücre membranı kaplı nanoparçacıklar tam bir kaplamaya, düzgün dağılıma ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir. Ancak bu teknolojinin maliyeti yüksektir [60].

Yapılan çalışmalardan biri Sherwood ve ark., tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada manyetik demir-oksit nanoparçacıkları insan embriyo kök dokusu HEK293 hücre hattından izole edilen membran ile ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak kaplanmıştır. CMNP olarak isimlendirilmiştir. Bu nanoplatformun karakterizasyonu DLS ve TEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir [61].



Şekil 2.9: A) CMNP oluşumunun şematik gösterimi ve B) CMNP'ye ait TEM ve DLS görüntüleri

Bu alanda yapılan çalışmalardan bir diğeri, Chen ve ark., İndosiyanin yeşili (ICG) yüklü lipid-PLGA NP'lerin kanser hücresi zarı kaplanmasını (ICNP) rapor etmişlerdir. Nanoparçacık ve kanser hücre membranının ekstrüzyon yöntemi ile kaplandığı bilirilmiştir. ICNP'lerin homolog hedefleme, biyolojik dağılım, floresans/fotoakustik görüntüleme ve fototermal verimliliği sistematik olarak in vitro/vivo olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ICNP'lerin yalnızca hücresel düzeyde homolog bir hedefleme etkisine sahip olmadığını, aynı zamanda yüksek uzaysal çözünürlük ve derin penetrasyon ile hayvan düzeyinde spesifik hedefleme yeteneği gösterdiğini göstermiştir [62].



Şekil 2.10: ICNP'lerin hazırlanma prosedürünün şematik gösterimi

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

N^2,N^6-Bis(*tert*-butoksikarbonil)-D-lizin (*tBoc*$_2$-Lysine, ≥%95,0) 1pluschem'den temin edildi. Kloroform (≥%99,4), 4-dimetilaminopiridin (DMAP, ≥%99,0), 2,2′-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, %98,0), N,N-diisopropiletilamin (DIPEA, ≥%99,0) 1h-pirazol-1-karboksamidin hidroklorür (≥%99,0), 2-hidroksi etil metakrilat HEMA, ≥%99,0), dietil eter (≥%99,5), tetrahidrofuran (THF, ≥%99,9), diklorometan (DKM, HPLC için ≥%99,8), tolüen (≥%99,8), (trifloroasetik asit (TFA, Reagentplus® %99,0), kimyasallarının tamamı Sigma Aldrich'den alınarak kullanıldı. Merck Millipore silika jel 60 (0.040-0.063 mm) kullanıldı. Thermo Scientific MEM-Per^{TM} Plus Membrane protein extraction kit kullanıldı. Metanol (MeOH, ≥%99,5. Etil asetat (EtOAc, ≥99,7% LC-MS için), *n*-hekzan (≥%96,0) çözücüleri ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliyum bromür (MTT), Invitrogen'den temin edildi. Temozolomid (TMZ) Abdi İbrahim A.Ş. tarafından temin edildi.

3.2 Kullanılan Cihazlar

Deney setleri süresince IKA ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanıldı ve reaksiyon sonunda BUTCHI Labaroto döner buharlaştırıcı kullanılarak çözücüler uçurulmuştur. Elde edilen malzemelerin kurutulması için VACUCELL vakum inkübatörü kullanılmıştır. ALPHA Bruker spektrometresinde, platin-ATR aksesuarı olan ZnSe kristali ile Fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) spektrumları kaydedilmiştir. ^{1}H NMR ve ^{13}C NMR analizleri için 500 MHz'lik Bruker NMR cihazında $CDCl_3$, DMSO-d_6 ve D_2O çözücüleri kullanıldı. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri için bir pompa ve Viscotek GPCmax ve 2001 Autosampler sistemi kullanıldı. 3580 refraktif indeks (RI) dedektörü de kullanıldı. İki Tosoh Bioscience GPC kolonu (TSKgel G500HXL, 9 um, iç çap 7.8 mm, 300 mm uzunluk ve TSKgel G300HXL, 6 um, iç çap 7.8 mm, 300 mm uzunluk) ve bir Tosoh Bioscience koruma kolonu (TSKgel HXL-H Guard, 13 um, iç çap 6 mm, 40 mm uzunluk) kullanıldı. THF çözücü olarak kullanılmış ve ölçümler 1.0 mL/dakika akış hızında 35 °C'de yapıldı. Dedektör, dar molekül ağırlığı dağılımına sahip PS standartlarıyla kalibre edilmiş ve veriler Viscotek OmniSEC 4.7.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Manyetik demir oksit nanoparçacıkların ve sentezlenen biyomimetik nanoplatformun ortalama partikül

boyutu, partikül boyutu dağılımları ve yüzey yükleri 633 nm dalga boyunda ve 25 ºC'de bir Malvern NanoZSP dinamik ışık saçılım (DLS) spektrometresi cihazı kullanılarak distile su içerisinde 173 º'lik ölçüm açısı ile belirlenmiştir. İzole edilen membran proteinlerinin miktarının belirlenmesinde, BSA kalibrasyon eğrisi kullanılarak BioTek marka Synergy H1 hibrid multi-mod ELISA okuyucu cihazı kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında Faster SafeFAST Premium 218, Biyogüvenlik Kabini (Class IIA2) kullanılmıştır. Hücrelerin kültüre edilmesi aşamasında Memmert ICO150med, %5 karbondioksitli inkübatör kullanılmıştır. Hücre kültürü deneylerinde Isolab Neubauer Improved, Sayım Lamı ve Carl Zeiss Primovert, inverted mikroskop kullanılmıştır. Hücrelerin saklanması aşamasında ise Cryopal Arpege 70, sıvı azot hücre tankı kullanılmıştır. Deneylerde Thermo Scientific Finnpipette F2, Pipet Seti (0.2- 2 µL, 1-10 µL, 2-20 µL, 10-100µL, 100-1000 µL) kullanılmıştır. Western Blot deneylerinde protein örneklerinin doğrusal bir biçimde açılması için Thermo Scientific Drybath, kuru blok ısıtıcı kullanılmıştır. Ayrıca Bio-Rad ChemiDoc, kemilüminesans görüntüleme sistemi, Bio-Rad Trans-Blot Turbo, blotlama sistemi, Bio-Rad PowerPac Basic, elektroforez güç kaynağı ve Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra Cell, dikey elektroforez yürütme sistemi kullanılmıştır.

3.3 Yöntem

3.3.1 Monomerlerin sentezi

3.3.1.1. *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin Metakrilat Monomerinin Sentezi (*tBoc*$_2$LzMA)

tBoc$_2$-Lz.DCHA (5,0 g, 9,47 mmol) ile HEMA (1,38 mL, 11,37 mmol) arasındaki esterleşme tepkimesi WO 2017/137919 numaralı patentte yer alan prosedür modifiye edilerek DCC (2,20 g, 14,20 mmol) ve DMAP (0,57 g, 4,66 mmol) katalizör sisteminde susuz DKM çözücüsü içerisinde (30 mL) azot atmosferinde gerçekleştirildi. Tepkime gece boyunca oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Reaksiyon sonunda oluşan disikloheksilüre yan ürünü filtre kâğıdı ile süzüldü. Organik faz 2 kez 60 mL 0,1 M HCl çözeltisi, 2 kez 60 mL doygun sodyum bikarbonatçözeltisi, 2 kez 60 mL doygun NaCl çözeltisi ve son olarak 2 kez 60 mL saf su ile ekstrakte edildi. Organik faz susuz Na_2SO_4 ile kurutuldu ve döner buharlaştırıcı ile konsantre hale getirildi. Sonrasında kolon kromatografisinden yararlanarak etil asetat:hekzan 1:2 (h/h) çözücü sistemi ile viskoz şeffaf ürün saf bir şekilde elde edildi(verim: 4.0 g, %80). *tBoc*$_2$LzMA monomeri ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ve FTIR spektroskopisiyle karakterize edildi. ^{1}H NMR (500 MHz, *CDCl*$_3$, δ): 6,12 (s, 1H), 5,60(s, 1H), 5,07 (bs, 1H), 4,59 (bs, 1H), 4,47-4,24 (m, 5H), 3,10 (bs, 2H), 1,94 (s, 3H), 1,85-1,32 (m, 24H). ^{13}C NMR (175 MHz, *CDCl*$_3$, δ): 173,01, 167,43, 156,48, 155,84,
136,21, 126,65, 80,33, 79,64, 63,25, 62,59, 53,63, 40,50, 32,70, 29,98, 28,82, 28,45, 22,83, 18,67.

3.3.1.2. 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilik asit (TMZ-COOH) sentezi

Temozolomid (TMZ) etken maddesinin karboksil uç grup fonksiyonelleştirme reaksiyonu literatürde var olan prosedür değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. TMZ (1,5 g, 7,7 mmol) 50 mL'lik tek boyunlu balon içerisine aktarıldı. Azot gazı altında 12 mL H_2SO_4 reaksiyon ortamında damla damla eklendi ve 15 saat boyunca oda sıcaklığında karışmaya bırakıldı. Sonrasında reaksiyon ortamı buz altında alındı ve ortama 7,5 mL saf su içinde çözündürülen $NaNO_2$ (1,95 g, 29 mmol) 10 mL'lik şırınga ile damla damla eklendi ve 12 saat boyunca karışmaya bırakıldı. Bu aşamada turuncu bir gaz çıkışı gözlemlendi. Sonrasında reaksiyon ortamına 30 g buz eklendi ve reaksiyon balonu buz altına alındı ve iki saat boyunca karışmaya bırakıldı. 2 saat sonra reaksiyon

karışımında çökeltiler gözlemlendi ve reaksiyon karışımı vakum filtrasyonu ile saflaştırıldı. Sartorius süzme aparatı ve 0.2 µm gözenek çapına sahip membran filtresi kullanıldı. Membran filtresi üzerinde toplanan malzemeden reaksiyona girmemiş ürünün uzaklaştırılması için 200 mL soğuk su ile yıkandı. Ham ürün, vakum etüvünde kurutuldu ve %50 verim ile beyaz katı ürün elde edildi. TMZ-COOH ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ve FTIR spektroskopisiyle karakterize edildi [63].

3.3.1.3. 2-(metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerinin sentezi

TMZ-COOH (0,9 g, 4,6 mmol, 1ek.) ile HEMA (1,21 mL, 9,22 mmol, 2 ek.) arasındaki esterleşme tepkimesi literatürde yer alan prosedüre göre EDC.HCl (1,77 g, 9,22 mmol, 2ek.) ve DMAP (0,281 g, 4,66 mmol) katalizör sisteminde susuz DKM: DMF çözücü sistemi içerisinde (12:1 oranında 60 mL: 5 mL) azot atmosferinde tüm gece boyunca gerçekleştirildi. Verimi arttırmak için reaksiyona4 Å moleküler sieve eklendi. Turuncu renk gözlemlendi. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra organik faz 5 kez 20 mL 0,1 M HCl çözeltisi ve 2 kez 20 mL saf su ile ekstrakte edildi. Organik faz susuz Na_2SO_4 ile kurutuldu ve döner buharlaştırıcı ile çözücünün uçuruldu. Reaksiyona girmeyen HEMA ve diğer reaktanttların uzaklaştırılması için malzeme 2 kez 25 mL dietil eter ile yıkandı. Ham ürün, açık pembe renkte katı ürün olarak %63 verim ile elde edildi. TMZMA monomeri ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ve FTIR spektroskopisiyle karakterize edildi [64].

3.3.2 RAFT Polimerizasyon Yöntemiyle Polimer Sentezi

Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen polimerler RAFT polimerizasyonu yöntemi kullanılmıştır. *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin Metakrilat (*tBoc$_2$*-LzMA) homoblok polimeri sentezlenmiş ardından temozolomid metakrilat (TMZMA) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomeriyle kopolimer sentezi gerçekleştirilmiştir [65].

3.3.2.1 P(*tBoc$_2$*LzMA) Homopolimer sentezi

Saf olarak elde edilen *tBoc$_2$*-LzMA monomeri (0,8 g, 1,76 mmol) 5 mL hacime sahip bir viale tartıldı ve 1,76 mL toluen ile çözüldü. CPADB (1 mg, 350,0 mmol) viale eklenir. Hemen ardından başlatıcı olarak 2,2′-azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN) (0,72 mg, 4,41 µmol) stok çözeltiden alınarak viale eklendikten sonra vial hızlıca septa

kapatılarak parafilmle hava girişini engellemek için sarıldı. Azot gazı altında buz banyosunda 45 dakika boyunca degaz edildi. Ardından vial 70 °C yağ banyosuna alınarak polimerizasyon başlatıldı. 24 saat sonra polimerizasyon iğne ile delinip buza konularak polimerizasyon sonlandırılır. Döner buharlaştırıcıda toluenin uçuruldu. Ardından 1 mL THF ile çözülüp 30 mL hekzanda iki kez çöktürüldü. Vakum etüvünde kurutuldu 0.,32 g polimer elde edildi. Elde edilen polimer ^{1}H NMR, GPC ve FTIR spektroskopisiyle karakterize edildi.

3.3.2.2 P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA))

Homopolimer P(*tBoc*$_2$LzMA) (0,3 g, 21,35 µmol) tartılıp 5 mL hacime sahip bir viale tartıldı ve 2,4 mL toluen ile çözüldü. Aynı viale HEMA (0,052 mL, 427 µmol) ve TMZMA (0.066 g, 213 µmol) eklendi. Ardından AIBN (0,259 mg, 3,2 µmol) viale eklendikten sonra vial hızlıca septa ve parafilmle kapatılarak buz banyosuna konuldu ve azot gazı altında 45 dakika boyunca karıştırıldı. 18 saat polimerizasyonun ardından iğne ile delinip buza konularak polimerizasyon sonlandırılır. Tolueni döner buharlaştırıcıda uçurulan reaksiyon ortamı 5 mL THF ile çözülüp 40 mL (1/1, h/h) hekzan:dietileter çözücü sisteminde iki kez çöktürülür. 0,25 g kopolimer elde edildi. Saflaştırılan kopolimer GPC, FTIR ve ^{1}H NMR spektroskopisiyle karakterize edildi.

3.3.3 Sentezlenen Polimerin Hidrolizi

P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer yapısındaki *tert*-bütiloksikarbonil koruma gruplarını hidroliz etmek amacıyla asidik ortamda reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda P(LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer metanolde çözülüp dietil eter içerisinde çöktürülerek saflaştırıldı.

3.3.3.1. P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerinin hidrolizi

P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimeri (0,25 g, 12,1 µmol) tartılıp 10 mL'lik cam balona alınır ve 4 mL THF ile çözüldü. Cam balona 0.4 mL dH_2O eklenir ve azot gazı altında 15 dakika boyunca ortamın inert atmosferde karıştırıldı. Ardından trifloroasetik asit (TFA) (1,4 mL, 18,2 mmol) cam şırıngayla damlatıldı. Reaksiyon 24 saat boyunca oda sıcaklığında karanlıkta gerçekleştirildi. Polimer uçuruldu, 1 mL metanolde çözülüp 7 mL soğuk dietil eter içerisine çöktürüldü. Elde edilen 0,2 g polimer FTIR, GPC ve ^{1}H NMR spektroskopisiyle karakterize edildi.

3.3.4 Nanoplarform Sentezi ve Karakterizasyonu

3.3.4.1 Manyetik nanoparçacık sentezi

Demir (III) klorür hekzahidrat (0,213 g, 78,8 mmol) ve Demir (II) sülfat heptahidrat (0,147 g, 52,8 mmol) 50 mL'lik iki boyunlu balona tartıldı ve 5 mL ultra saf su eklendi. Ardından 1.25 mL %25'lik amonyum hidroksit solüsyonu şırıngaya çekilip damla damla eklendi. Azot gazı altında 30 dakika boyunca karıştırıldı. Ardından refluksa alınıp önceden ısıtılmış 80 °C yağ banyosuna alınarak 2 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra alternatif bir manyetik alan altında manyetik nanoparçacıklar toplandı. Reaksiyona girmeyen başlangıç malzemelerinin uzaklaştırılması için su-etanol çözücüleri ile 5 kez yıkandı. Kurutulmak üzere vakum etüvüne bırakıldı. Manyetik parçacığın boyut dağılımı, yüzey yükü ve morfolojisi DLS ve TEM analizleri ile karakterize edilmiştir [66].

3.3.4.2 U87-MG Hücre membran proteinlerinin izolasyonu

HTB-14 kodlu U87-MG 12. pasaja ait hücreler DMEM besiyerinde kültürlendi.$40x10^6$ M hücre sayısına ulaşıldığında 4 mL Tripsin EDTA ile 5 dakika boyunca inkübeedilerek bulundukları yüzey alanından kaldırıldı. Ardından 8 mL DMEM eklenerek 15mL'lik falkona alındı. 4000 rpm'de 10 dakika boyunca çöktürüldü. Pellet bir kere 1XPBS ve 2 kere hücre yıkama solüsyonu ile yıkandı ve süpernatant atıldı. Sonrasında pellete permeabilizasyon tamponu eklendi ve 10 dakika boyunca +4 °C'de inkübe edilip ve 20.000 g'de 20 dkda çöktürüldü. Süpernatant ayrı bir ependorfa alındı bu fraksiyonda sitozolik proteinler bulunmaktadır. Pellete dispersiyon tamponu eklendi ve 30 dk boyunca +4 °C'de inkübe edildi ardından 20.000 g'de 20 dk santrifüjlendi. Süpernatant başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu fraksiyonda bulunan proteinler hücre membranı ve membran ilişkili proteinlerdir. Protein miktarı BSA analizi ile belirlendi. Proteinlerin karakterizasyonu western-blot yöntemi ile belirlendi.Ayrıca proteinlerin boyut dağılımı ve yüzey yükü DLS cihazı ile karakterize edildi [67].

3.3.4.3 BSA Analizi ile protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarının belirlenmesinde Pierce™ BSA Protein kiti kullanıldı. Bovin serum albümini (BSA) ilk konsantrasyon 2 mg/mL olacak şekilde hazırlanır. Ardından seri dilüsyonlar yapılarak 100 µL hacimde konsantrasyonlar (2, 1,75, 1,5, 1,25, 1, 0,75, 0,5, 0,25 mg/mL) hazırlanır. Kite ait tamponlar (A ve B) 50:1 oranında hazırlanır. 96

kuyulu plakaya 190 µL hazırlanan tampon karışımı eklenir ve üzerlerine protein konsantrasyonu bilinen BSA standartları 10 µL eklenir. Protein içeriği belirlenecek numunelerden 2,5 µL alınarak 7,5 µL PBS ile toplam hacim 10 µL olacak şekilde tamamlanarak plaka kuyucuklarına ekilir. Kör örnek olarak PBS kullanılır. 96 kuyucuklu plaka aliminyum folyo ile kapatılır. 45 dk boyunca 37 °C'de inkübe edilir. Ardından plaka okuyucu cihazında 562 nm'de absorbans ölçümü yapılır. BSA standartlarından elde edilen kalibrasyon denklemi kullanılarak protein miktarı belirlenir.

3.3.4.4 Western Blot deneyi

Deneyde kullanılacak jel hazırlanır. Öncelikle %10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) jeli hazırlanır. 5,12 mL distile su içerisine sırasıyla; 4,12 mL akrilamid, 3,12 mL 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 tamponu, %10'luk 0,12 mL sodyum-dodesil sülfat (SDS) solüsyonu, %10'luk 62,5 µL amonyum persülfat (APS) ve 6,25 µL TEMED eklendikten sonra jel dökme apartına aktarılır ve donması için 45 dakika boyunca beklenir. Ardından %4'lük yükleme jeli hazırlanır. 2,3 mL distile su içerisine 0,49 mL akrilamid, 0,95 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 tamponu, %10'luk 37,5 µL SDS solüsyonu, %10'luk 19,0 µL APS solüsyonu ve 3,75 µL TEMED eklenir. Hızlıca donan alt jelinin üzerine eklenir ve taraklar içine yerleştirilir. 30 dakika boyunca donması beklenir. Taraklar çıkarılır ve yürütülmek istenen protein örnekleri eşit miktarda (25 µg) tanka yüklenir. Ayrıca içerisindeki proteinlerin molekül ağırlığı belirli olan protein ağırlık belirteci 7 µL olarak jele yüklenir. 1X elektroforez tamponunda 30 dakika 100V'ta yürütülür ardından 120V'ta 90 dakika yürütülür. Jel tanktan çıkarılır. Cam aparatlar ayrılır. PVDF membran ikişer dakika boyunca metanol-su ve transfer tamponu döngüsüne tabi tutularak aktifleştirilir. Aynı şekilde filtre kâğıdı da transfer tamponu ile ıslatılır. Transblot cihazına sırasıyla filtre kâğıdı, Poli(viniliden florür) (PVDF) membran, jel ve tekrar filtre kağıdı olacak şekilde yerleştirilir ve transfer gerçekleştirilir. Jel atılır, membran istenmeyen etkileşimlerin önlenmesi adına 1 saat boyunca %5'lik 15 mL süt tozu blokaj tamponunda inkübe edilir. Ardından 10'ar dakika 3 kez %1 Tween-20 içeren TBS tamponu ile yıkanır. Ardından 1:2000 oranında %5'lik süt tozu ile seyreltilmiş primer antikor içerisinde +4 °C'de gece boyu hafifçe sallanarak inkübe edilir. Ertesi gün yıkama döngüleri tekrarlanarak 1:2000 oranında %5'lik süt tozu ile seyreltilmiş sekonder antikor

içerisinde 1 saat inkübe edilir. Yıkama döngüsü tekrarlanır. Sonrasında Bio-Rad ChemiDoc, Kemilüminesans Görüntüleme Sisteminde jel görüntüsü alınır.

3.3.4.5 Fe_3O_4@HM'nin Sentezi

Akışta anlaşılabilirliği sağlamak adına manyetik nanoparçacık (Fe_3O_4), U87-MGhücre hattından izole edilen hücre membranları ise (HM) olarak isimlendirilmiştir. Fe_3O_4@HM nanopartikülleri, ekstrüzyon yöntemi kullanılarak Fe_3O_4@HM hazırlanır. HM, 0.75 mL otoklavlanmış, 10 mM bistris tamponu içinde yeniden dağıtılır. Ardından Fe_3O_4 0.25 mL su içerisinde yeniden dağıtılır. Yukarıda belirtilen karışım, 10 mL PBS içinde yeniden dağıtılır ve Fe_3O_4@HM nanoparçacıkları üretmek için 200 nm polikarbonat membranlı bir Avanti mini ekstrüderden 11 kez ekstrüde edilir. Sistemin boyut dağılımı ve yüzey yükü DLS cihazı ile değerlendirilmiştir. Ayrıca TEM analizi ile karakterize edilmiştir [61].

3.3.4.5 Fe_3O_4@HM@P'nin Sentezi

Akışta sadelik sağlanması amacıyla P(LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimeri **(P)** olarak isimlendirilmiştir.

Fe_3O_4@HM'nin P(LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) ile başarılı dekorasyonunu sağlamak için, kütlece 1:1 oranında MNP@HM: P(LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) oda sıcaklığında 1 saat 5 mL PBS içinde inkübe edilir. Solüsyon 2 L deiyonize su içinde 2 gün diyaliz edilir. Elde edilen Fe_3O_4@HM@P dondurularak kurutulur ve sonraki deneyler için -20 °C'lik buzdolabında saklanır. Fe_3O_4@HM@P nanoplatformu TEM ve DLS analizi (DLS, Malvern ZSP) ile karakterize edilir.

3.3.5 Sitotoksisite çalışmaları

Kemoterapötik ilaç taşıyan nano platformun sitotoksik aktiviteleri (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,3-difenil-tetrazolium) MTT analiz kiti (Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit, ThermoFisher Scientific) kullanılarak, hücre proliferasyonlarının değişik konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde test edildi. U87 Glioblastoma insan kanser hücre hattı ve kontrol grubu olarak CCD-1079Sk sağlıklı insan fibroblast hücre hattı 96 kuyucuklu plakaya 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 37 °C'de gece boyu bekletildi. Ertesi gün hücrelere farklı konsantrasyonlardaki örnekler eklendi. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 10 µL MTT

solüsyonu eklendi ve 4 saat sonunda kuyucuklardaki besiyeri boşaltılarak 100 µL DMSO eklenip spektrofotometre ile 540 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. NIR uyarımının nanoplatoform ve öncü bileşiklerin sitotoksisitesi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla hücreler, 200 µL DMEM besiyeri içerisinde kuyu başına 1 x 10^4 hücre yoğunluğunda 96 kuyulu bir plakaya ekildi ve 37 °C'lik bir inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra kuyucuklardaki besiyeri 100 µL taze medyumla değiştirildi ve altı farklı konsantrasyonda hazırlanan 100 µL örnekler üç tekrarlı olarak kuyucuklara eklendi. 4 saat sonra kuyucuklardaki ortam 200 µL FBS'siz DMEM besiyeri ile değiştirildi. Aydınlık sitotoksisite deneyi için plakalar alındı ve 5 dakika boyunca (1.25 W/cm^2) 808 nm NIR ışığına maruz bırakıldı. Daha sonra kuyucuklardaki besiyeri boşaltıldı, kuyucuklara 200 µL taze besiyeri eklendi ve plaklar tekrar %5 içeren 37 °C'lik inkübatörde tutuldu. Ertesi gün kuyucuklara 10 µL MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat sonunda kuyucuklardaki besiyeri boşaltılarak 100 µL DMSO eklenip spektrofotometre ile 540 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Relatif % hücre canlılık hesaplaması yukarıda anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Her bir konsantrasyon için ölçüm en az 3 kere tekrar edildi ve verilere göre konsantrasyona bağlı relatif % hücre canlılığı grafiği çizildi.

Yüzde canlılık değeri uygulama yapılmamış kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek aşağıda verilen formüle göre hesaplandı: [68].

% Canlılık= [100×(Uygulama yapılan hücre absorbans ortalaması-kör ortalama)/(Kontrol hücre absorbans ortalaması-kör ortalama)]

Relatif % hücre canlılığı değerleri kullanılarak IC_{50} değerleri tespit edildi. Elde edilen canlılık verileri Graphpad Prism V10 programı ile nonlineer regresyon analizi kullanılarak hesaplandı.

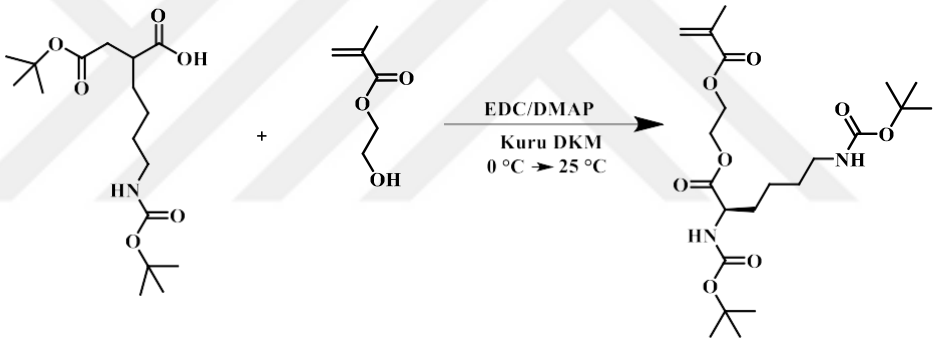
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Monomer Sentezi

Kopolimerlerin sentezlenmesinde kullanılacak monomerlerin(*tBoc*$_2$LzMA ve TMZMA) sentezi gerçekleştirilmiştir.

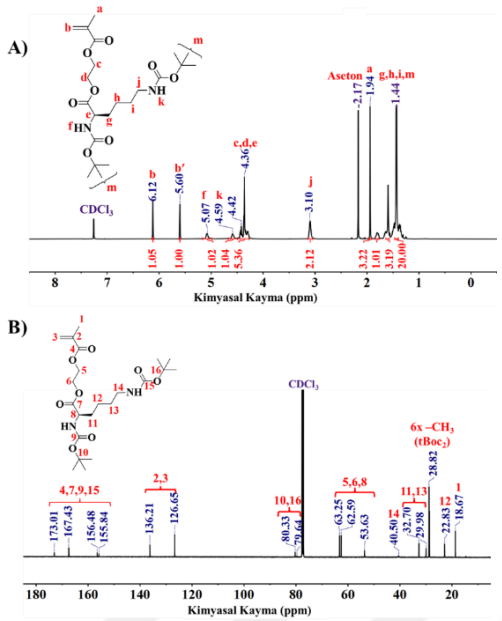
4.1.1. *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin Metakrilat Monomerinin Sentezi (*tBoc*$_2$LzMA)

tert-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin metakrilat sentezi *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin bileşiğinin EDC/DMAP varlığında 2-hidroksietil metakrilat kullanılarak kuru DKM içerisinde metakrilat fonksiyonu kazandırılması ile elde edildi (Şekil 4.1). Reaksiyon sonucunda ham ürün önce ekstraksiyon yapılarak daha sonra ise kolon kromotografisi yöntemi ile saflaştırıldı. %80 verimle saf monomer vizkoz bir yapıda elde edildi.



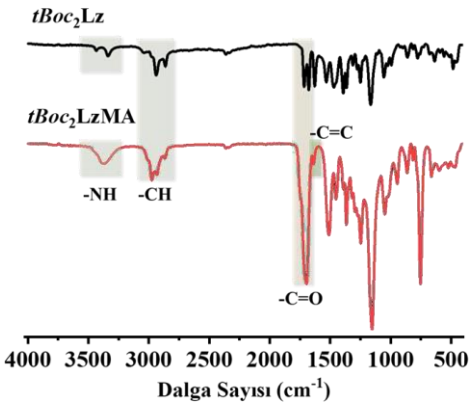
Şekil 11: *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin Metakrilat Monomerinin Sentezi

Sentezlenen *tBoc*$_2$LzMA monomeri ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopisi ve FTIR kullanılarak karakterize edildi. Şekil 4.2'de *tBoc*$_2$LzMA monomerine ait spektrum verilmiştir. Monomerin metakrilat ünitesine ait vinil protonları 6.12-5.60 ppm'de (b,b') ve C*H*$_2$NH protonu ise 3.10 ppm'de (j) görülmektedir. *tBoc*$_2$ grubuna ait metil protonları 1.43 ppm'de görülmektedir. Bileşiğe ait tüm protonların integrasyon değerleri incelendiğinde *tBoc*$_2$LzMA monomerinin başarıyla sentezlendiği kanıtlanmıştır. ^{13}C NMR spektroskopisi incelendiğinde vinil grubuna ait karbonların 136.21-126.95 ppm'de (2 ve 3) görülmektedir.



Şekil 12: *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı lizin metakrilat monomerine (*tBoc*$_2$-LzMA) ait A)^{1}H NMR ve B)^{13}C NMR spektrumu

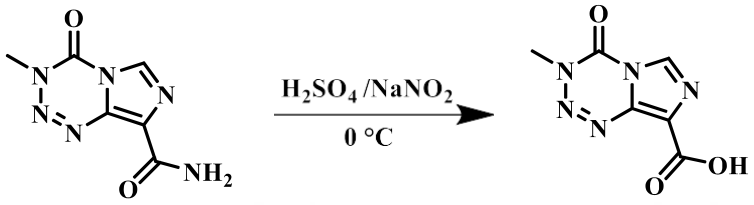
tBoc$_2$LzMA monomerinin ve öncü bileşiklerine ait FTIR spektrumu Şekil 4.3'te gösterilmiştir. *tBoc*$_2$Lz molekülünün yapısına metakrilat fonksiyonu kazandırılması ile -C=O gerilme titreşim bandı 1700 cm^{-1}'de ve -C=C gerilme bantları 1630 cm^{-1}'de gözlemlenmektedir.



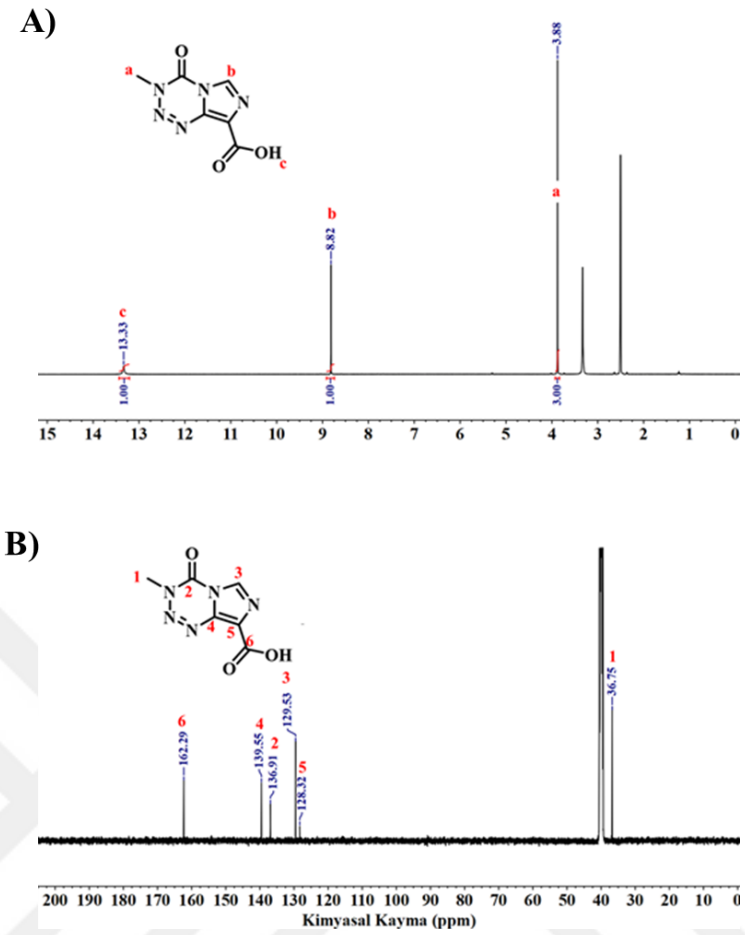
Şekil 13: *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı Lizin ve *tert*-Bütiloksikarbonil korumalı lizin metakrilat monomerine (*tBoc*$_2$LzMA) ait FTIR spektrumu

4.1.2. 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilik asit (TMZ-COOH) sentezi

Karboksilik asit fonksiyonlu TMZ eldesi, (3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilik asit, TMZ-COOH) TMZ bileşiğinin derişik sülfürik asit varlığında sodyum nitrit ile reaksiyonu sonucunda sentezlendi (Şekil 4.4). Reaksiyon ortamına buzlu su eklenerek ortamda çökelti oluşması sağlandı. Vakum filtasyonu işlemi ileürün saflaştırıldı. %50 verim ile beyaz katı ürün elde edildi.



Şekil 14: TMZ-COOH bileşiğinin sentezini şematik gösterimi.

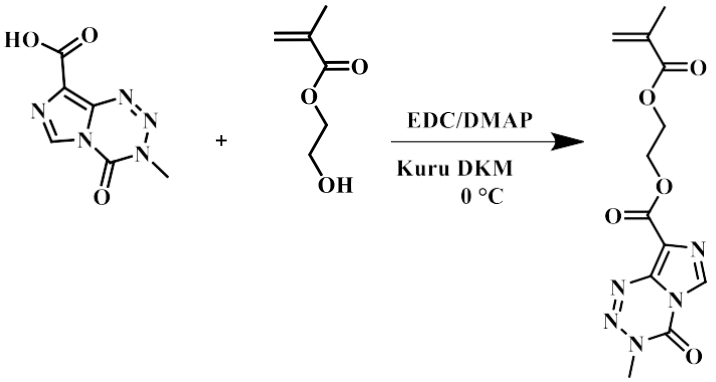


Şekil 15: 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilik asit (TMZ-COOH) bileşiğine ait A)^{1}H NMR ve B)^{13}C NMR spektrumu

Sentezlenen bileşik ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopisi ve FTIR kullanılarak karakterize edildi. Şekil 4.5'te TMZ-COOH bileşiğine ait protonlar açık şekilde görülmektedir. Spekturumda öncü bileşikte bulunan -NH_2 grubunun protonları yerine karboksilik asit grubuna ait proton 13.33 ppm'de (c) singlet pikin varlığı bileşiğin sentezini doğrulamaktadır. Yapıdaki -CH_3 grubuna ait protonlar 3.88 ppm'de (a) görülmektedir. İntegrasyon oranlarının örtüşmesi bileşiğin başarılı bir şekilde sentezlendiğini kanıtlamaktadır.

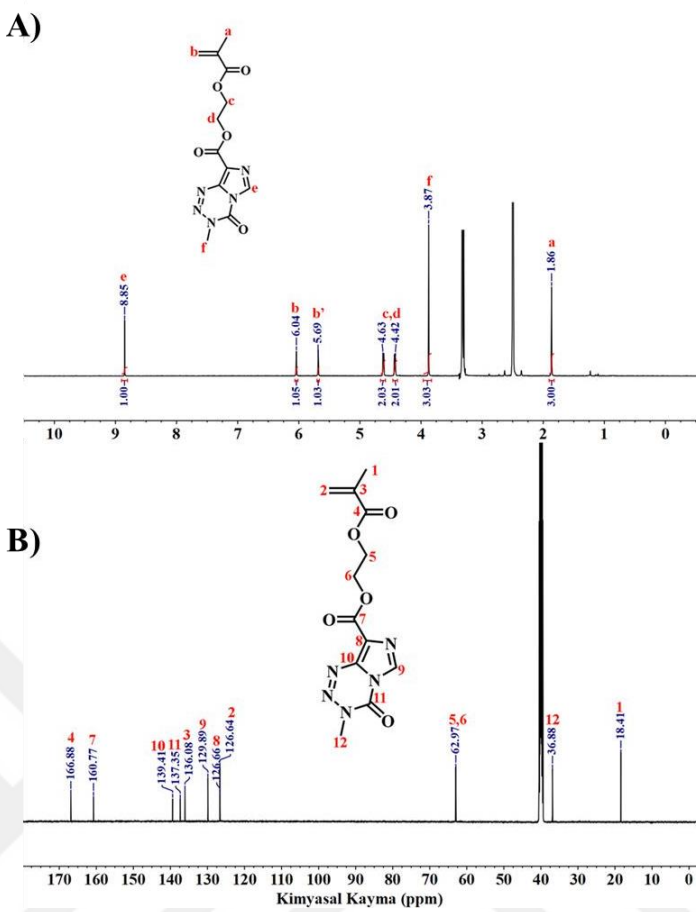
^{13}C NMR spektrumunda TMZ-COOH bileşiğine ait yapıdaki tüm karbonların açıkça görülmektedir.

4.1.3. 2-(metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerinin sentezi



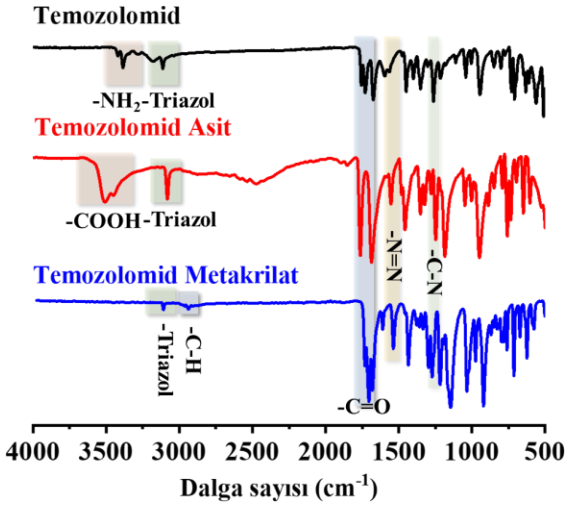
Şekil 16: 2-(Metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerinin sentezinin şematik gösterimi

2-(metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerinin sentezi 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilik asit (TMZ-COOH) bileşiğinin EDC/DMAP varlığında 2-hidroksietil metakrilat kullanılarak kuru DKM içerisinde metakrilat fonksiyonu kazandırılması ile elde edildi (Şekil 4.6). Reaksiyon sonucunda ham ürün önce ekstraksiyon yapılarak daha sonra dietil eter ile yıkanması sonucu %50 verimle katı bir formda saf monomer elde edildi.



Şekil 17: 2-(metakriloiloksi)etil 3-metil-4-okso-3,4-dihidroimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazin-8-karboksilat (TMZMA) monomerine ait A) ^{1}H NMR ve B)^{13}C NMR spektrumu

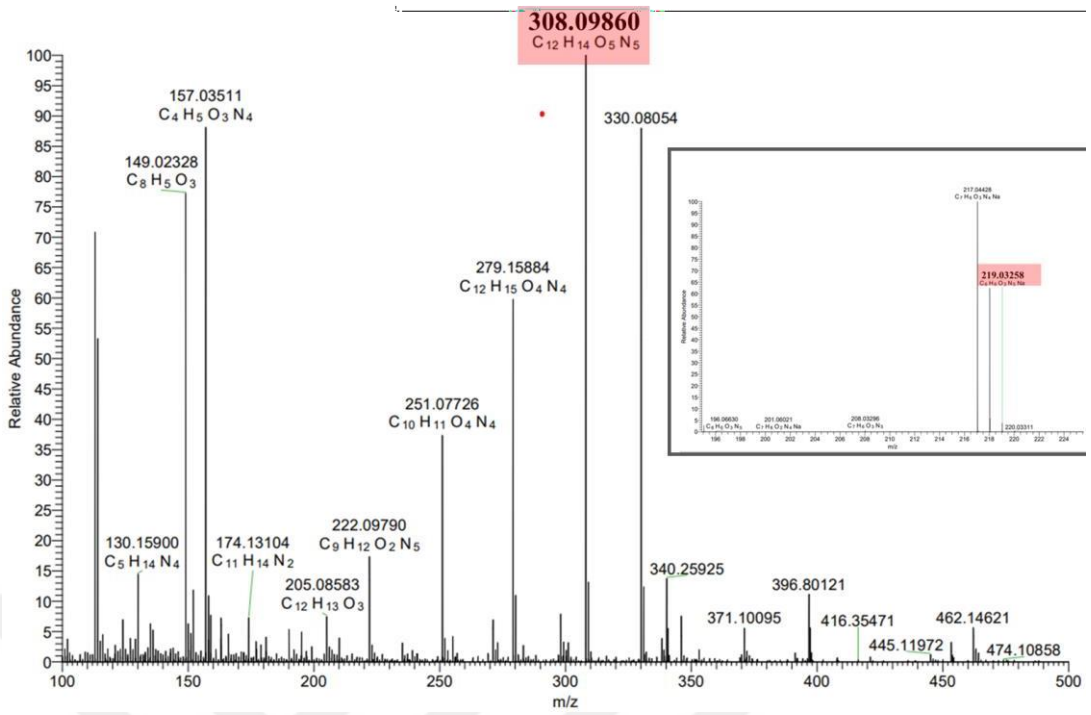
Sentezlenen TMZMA monomeri ^{1}H ve ^{13}C NMR spektroskopisi ve FTIR kullanılarak karakterize edildi. Şekil4.7'de TMZMA monomerine ait spektrum verilmiştir. Spektrumda monomerin metakrilat ünitesine ait vinil protonları 6.12-5,60 ppm'de (b,b') ve metil protonu ise 1.86 ppm'de (a) görülmektedir. -N=C*H*-N- protonu ise (e) 8.85 ppm'de açıkça görülmektedir. Bileşiğe ait tüm protonların integrasyon değerleri incelendiğinde TMZMA monomerinin başarıyla sentezlendiği kanıtlanmıştır. ^{13}C NMR spektroskopisi incelendiğinde vinil grubuna ait karbonların 136.21-126.95 ppm'de (2,3) görülmektedir. ^{13}C NMR spektroskopisinde TMZMA bileşiğine ait yapıdaki tüm karbonların açıkça görülmesi bileşiğin başarılı bir şekilde sentezlendiğinin kanıtıdır.



Şekil 18: Temozolomid, Temozolomid Asit ve Temozolomid metakrilat monomerine ait FTIR spektrumu

Şekil 4.8'de verilen FTIR spektrumunda TMZ, TMZ-COOH ve TMZMA bileşiklerine ait spektrumlar görülmektedir. TMZ-COOH'a ait spektrumda görülen hidroksil grubuna özgü 3283 cm^{-1} dalga sayılı band TMZMA bileşiğine ait spektrumda gözlenmemiştir. Ayrıca yine aynı spektrumdaki 1723 cm^{-1} dalga sayılı band bileşiğe eklenen vinil grubunu kanıtlamaktadır.

Şekil 4.9'da TMZ-COOH ve TMZMA bileşiklerine ait kütle spektrometresine ait sonuçlar gösterilmiştir. [TMZ-COOH, $M]^+$ = 219.03 ve [TMZMA, $M]^+$ = 308.09 olarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bileşiklerin yapısını doğrulamaktadır.

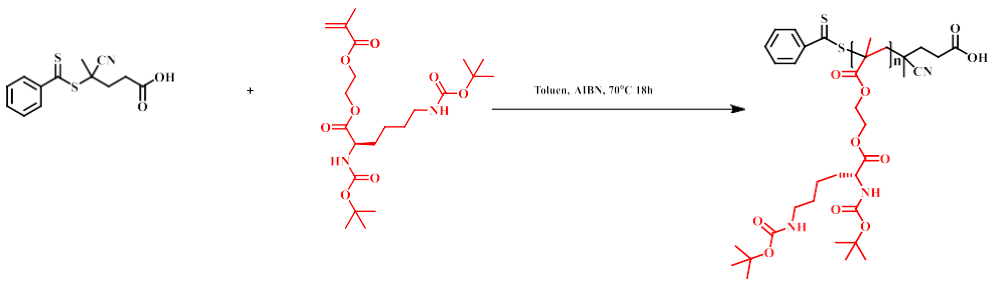


Şekil 19: Temozolomid monomerine (TMZMA) ait kütle spektrometresi, iç resim Temozolomid asit (TMZ-COOH) bileşiğine ait kütle spektrometresi.

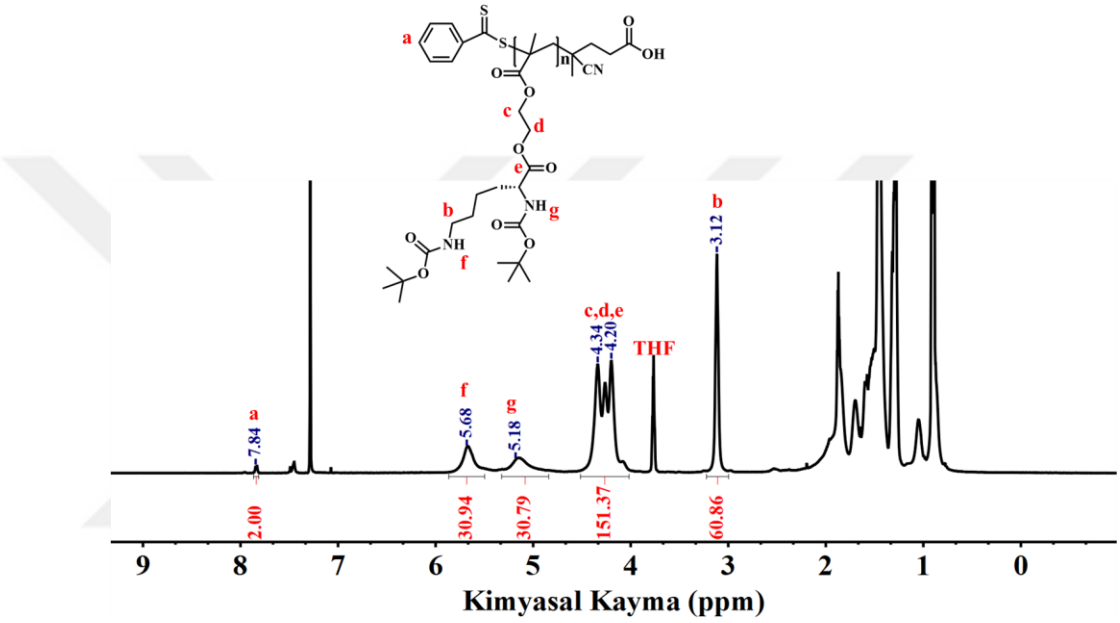
4.2. RAFT Polimerizasyon Yöntemiyle Polimer Sentezi

4.2.1. P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimer sentezi

P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimeri RAFT polimerizasyonu tekniği ile kontrollü olarak sentezlenmiştir. (Şekil 4.10) Polimerizasyon [*tBoc*$_2$LzMA]:[CPADB]:[AIBN] = [40]:[1]:[0.125] oranında ve monomer konsantrasyonu 1 M olacak şekilde 70 °C'de gerçekleştirildi. Reaksiyona girmemiş monomerin uzaklaştırılması için polimer THF'te çözülüp hekzana çöktürülerek saflaştırıldı. Şekil 4.11'de bulunan P(*tBoc*$_2$LzMA) polimerinin ^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde; yapıdaki fenil halkasına ait -*CH*$_2$ protonu (a) 7.84 ppm'de lizin monomerine ait (c,d,e) protonları 4.30-4.20 ppm aralığında açıkça görülmektedir. Lizin monomerinin tekrarlanan ünitesin sayısının açıkça belirlenmesinde ayırt edici -*CH*$_2$NH protonu (b) 3.10 ppm'de görülmektedir. ^{1}H NMR spektrum sonucuna göre yapının başarı ile sentezlendiği anlaşılmıştır. ^{1}H NMR analizine göre RAFT uç grubuna ait fenil protonu (a) ile lizin monomerine ait -*CH*$_2$NH protonunun (b) integrasyon değerlerinin kıyaslanması sonucu tekrarlanan ünite sayısı 30 olarak hesaplanmıştır.

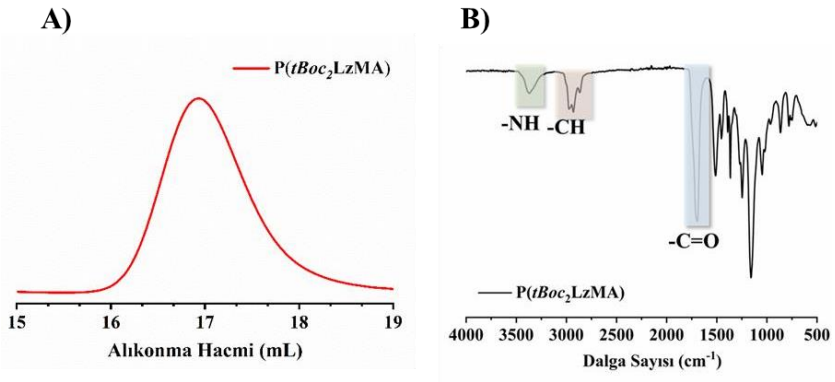


Şekil 20: P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimer sentezinin şematik gösterimi



Şekil 21: P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimerine ait ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$).

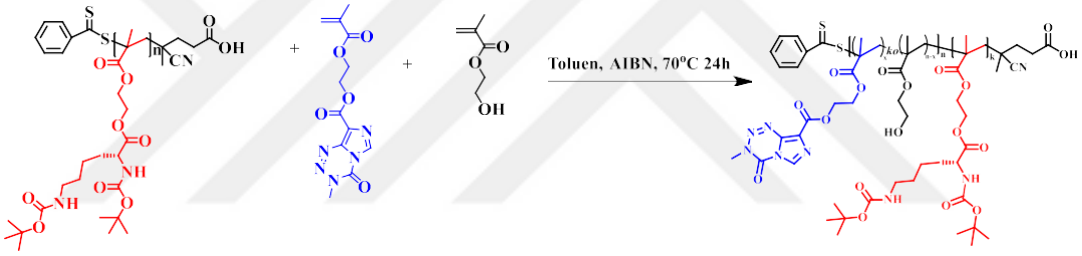
Şekil 4.12'de P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimerine ait GPC ve FTIR spektrumları görülmektedir. GPC analiz sonucuna göre $M_{n,GPC}$ 7,0 kDa olarak belirlenmiştir. Polidispersite değerinin 1,06 olarak analiz edilmesi, homopolimerin dar boyut dağılımına sahip olarak kontrollü bir şekilde sentezlendiğinin kanıtıdır. Ayrıca P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimerinin FTIR spektrumu incelendiğinde; lizin monomerine ait -NH gerilme bandı 3350-3150 cm^{-1}'de ve -CH gerilme bandı 3120-2700 cm^{-1}'de görülmektedir. Homopolimere ait -C=O fonksiyonel grubuna ait bandın 1700 cm^{-1}'de açıkça görülmesi yapıda fonksiyonel grupların varlığını göstermektedir.



Şekil 22: P(*tBoc*$_2$LzMA) homoblok polimerine ait A) THF- GPC kromatogramı B) FTIR spektrumu

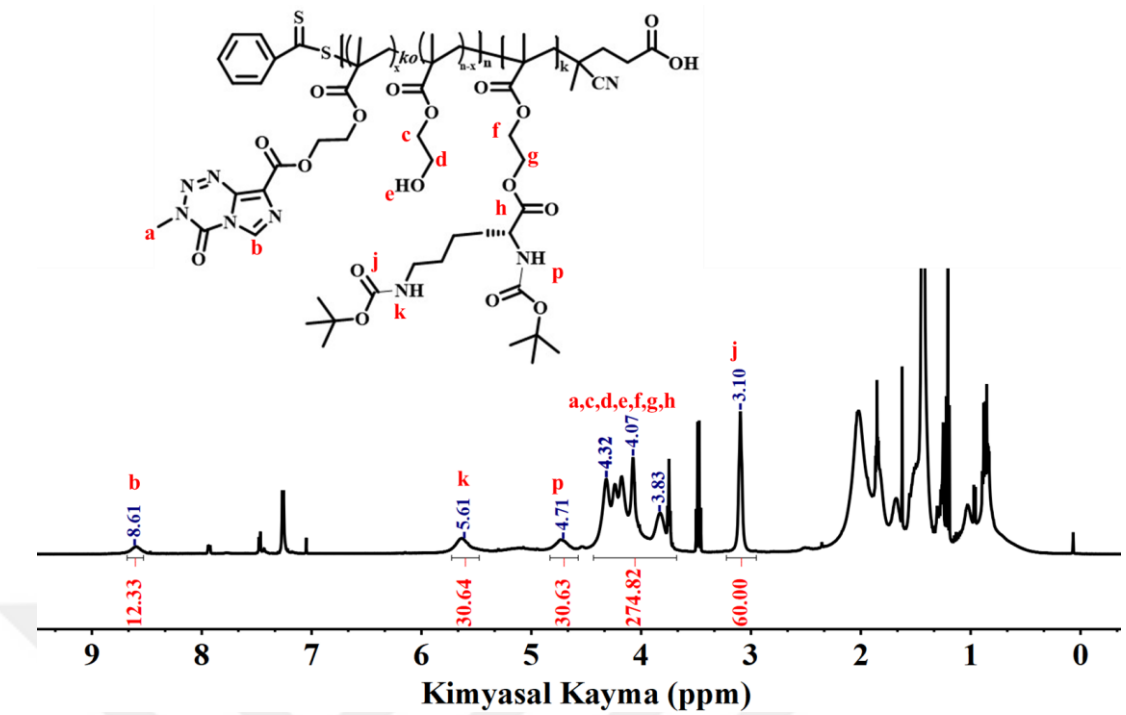
4.2.2 P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer sentezi

Polimerizasyon [TMZMA]:[HEMA]:[P(*tBoc*$_2$LzMA)]:[AIBN]= [10]:[20]:[1]:[0.15] oranında şekilde 70 °C'de 24 saat boyunca gerçekleştirildi. Polimer THF'te çözülüp 1:1 (h/h) oranında dietileter:hekzan karışımına çöktürülerek saflaştırıldı. (Şekil 4.13)



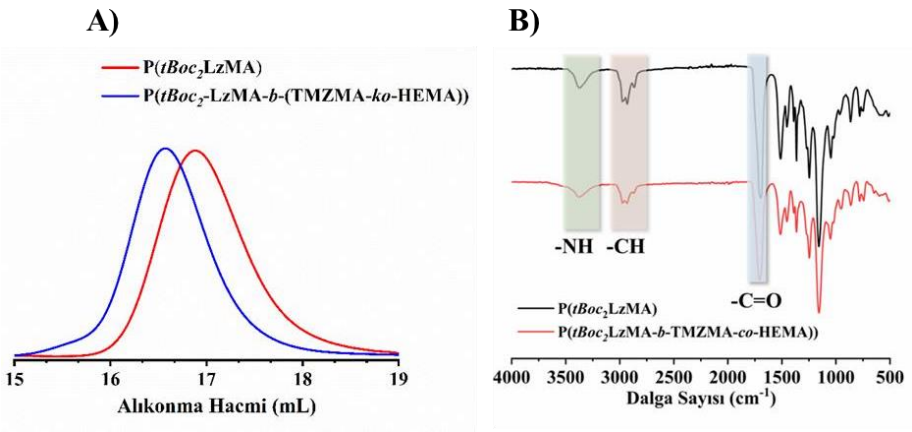
Şekil 23: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer sentezinin şematik gösterimi

Sentezlenen P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimeri ^{1}H NMR spektroskopisi, FTIR ve GPC kullanılarak karakterize edildi. Şekil 4.14'te P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) polimerine ait spektrum gösterilmektedir. ^{1}H NMR analiziyle TMZMA monomerine ait ayırt edici pik 8.63 ppm'de (b) görülmektedir. P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimerine ait 3.10 ppm de (j) gözlemlenensinglet pik ile integrasyon değerleri kıyaslandığında TMZMA monomerinin kopolimer yapısındaki tekrarlanan ünite sayısı 8 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde HEMA monomerine ait 5 protonun (c,d,e) 4.32-3.83 ppm arasında gözlemlendiği literatürde bildirilmiştir. İntegrasyon değerleri kıyaslandığında HEMA monomerine ait tekrarlanan ünite sayısı 12 olarak hesaplanmıştır. ^{1}H NMR sonucuna göre kopolimerin sahip olduğu moleküler ağırlık 19.7 kDa olarak hesaplamıştır [69].



Şekil 24: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)))) kopolimerine ait ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$).

Şekil 4.15'te P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimeri ile P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimeri için GPC ve FTIR spektrumları gösterilmektedir. THF-GPC analizinde kopolimere ait kromatogramın alıkonma hacminin homopolimere kıyasla sola doğru kayım sergilediği görülmektedir. Kopolimerin homopolimere kıyasla alıkonma hacminin daha erken gözlenmesi molekül ağırlığının arttığının bir kanıtıdır. GPC sonucuna göre $M_{n,GPC}$ 8.4 kDa olarak belirlenmiştir. Polidispersite değerinin 1.12 olarak belirlenmesi, P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerinin dar boyut dağılımına sahip olarak kontrollü bir şekilde sentezlendiğinin kanıtlamıştır.

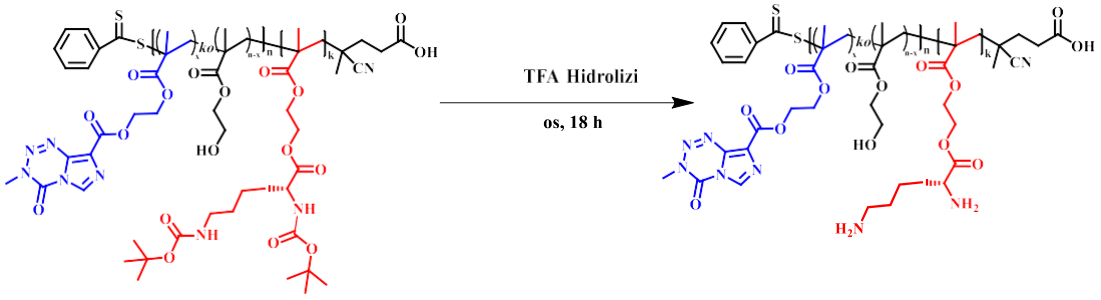


Şekil 25: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerine ait A) THF- GPC kromatogramı B) FTIR spektrumu

P(*tBoc*$_2$LzMA) homopolimerine ve P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimeri ait FTIR spektrumu incelendiğinde TMZMA ve HEMA monomerlerinin -C=O grubuna ait titreşiminden kaynaklanan 1701 cm^{-1} dalga sayılı band şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Spektruma göre -CH gerilme bandı 3120-2700 cm^{-1}'de görülmektedir. Ayrıca homopolimere ait -NH gerilme bandı 3350-3150 cm^{-1}'de görülmektedir.

4.2.3 P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer hidrolozi

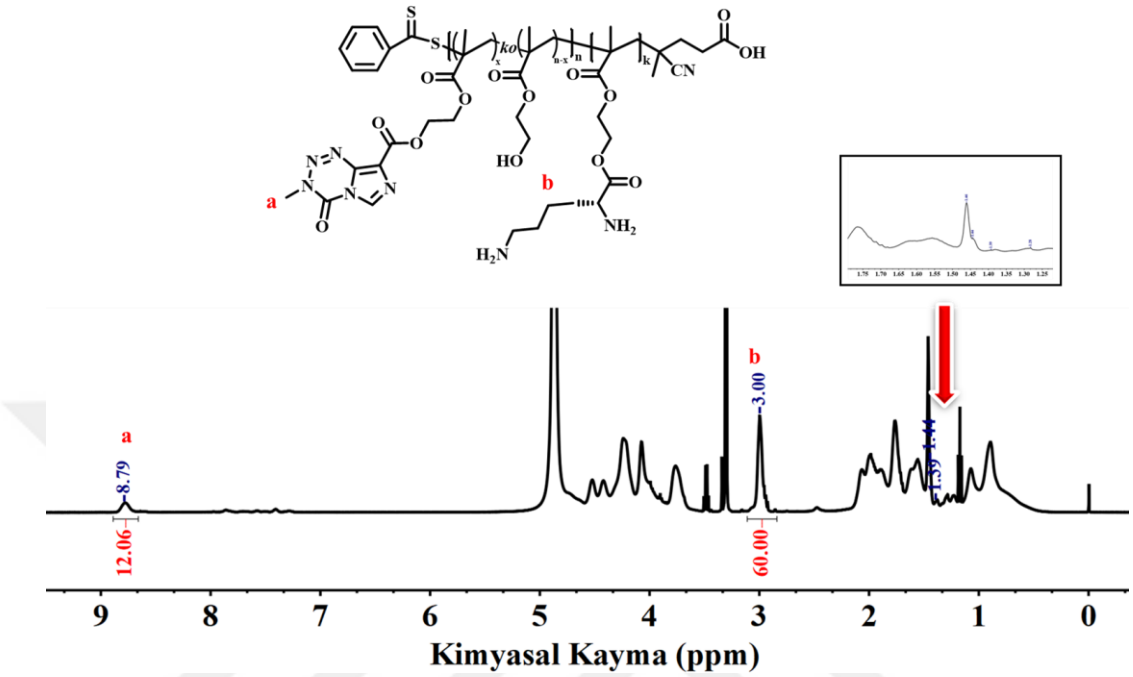
P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerinin *tBoc*$_2$ koruma gruplarının hidroliz edilmesinde polimer THF'de çözüldükten sonra 10/1 (v/v) oranında su eklenir ve TFA eklenerek hidroliz reaksiyonu gerçekleştirildi. (Şekil 4.16)



Şekil 26: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimer hidrolozinin şematik gösterimi

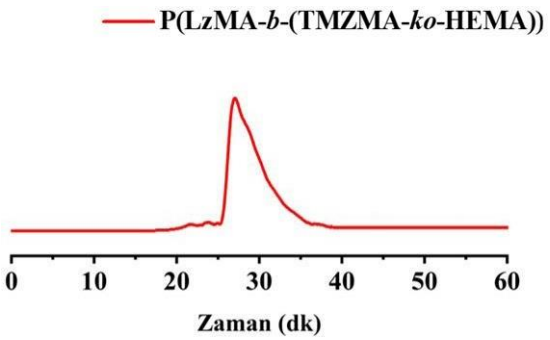
Şekil 4.17'de bulunan ^{1}H NMR spektrumuna göre kopolimerin lizin ünitelerinin *tBoc*$_2$ koruma grubuna ait metil protonlarından gelen 1.43 ppm'de bulunan keskin pikin hidroliz reaksiyonu sonrasında spektrumda görülmemektedir. Ayrıca polimerin ^{1}H NMR spektrumu incelendiğinde TFA ile reaksiyon sonucu polimere ait piklerin (a,b)

varlığı açıkça görülmektedir. Ayrıca polimerin TFA ile reaksiyonu sonucu kemoterapöitk ajan olan TMZ'nin ayrıt edici pikinin spektrumda açıkça görülmesi, TMZ'nin kimyasal yapısının bozulmadığını kanıtlamaktadır.



Şekil 27: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)))) kopolimerine ait ^{1}H NMR spektrumu (CD_3OD).

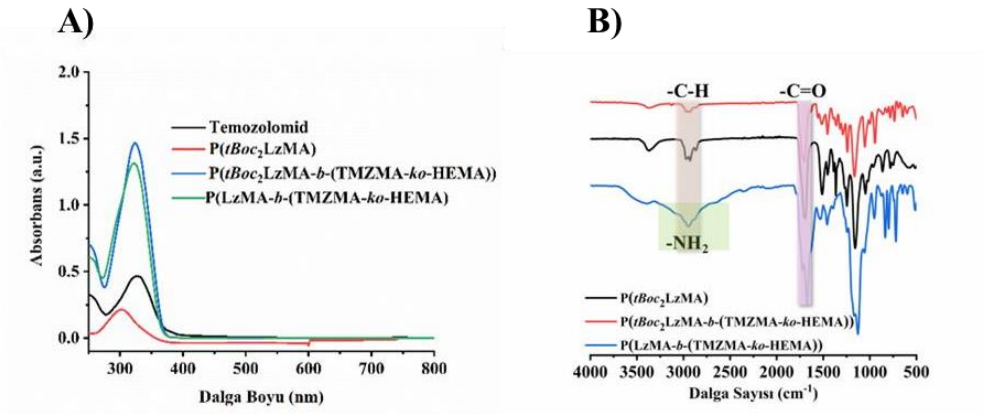
Kopolimerin hidroliz sonrası DMF-GPC analizi Şekil 4.18'te gösterilmiştir. DMF-GPC analizi sonucunda polidispersite indeksi 1,31 olarak belirlenmiştir.



Şekil 28: P(LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerine ait DMF-GPC kromatogramı.

Temozolomid bileşiğinin UV-Vis spektrumunda 328 nm'de spesifik pik göstermesi sebebiyle P(LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) kopolimerinin ve öncü bileşiklerinin

UV-Vis analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.19'da UV-Vis spektrumları verilmiştir. Kopolimer yapısında 328 nm'de spesifik TMZ pikinin bulunması, TMZ halkasının bozunmadan reaksiyonların gerçekleştiğinin kanıtıdır. Ayrıca karşılaştırmalı FTIR spektrumu incelendiğinde 3000 cm^{-1} de hidroliz sonrası -NH_2 gerilme bandına ait yayvan pik görülmesi hidroliz reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin bir diğer kanıtıdır. Tüm polimer sentezlerine ait reaksiyon koşulları ve moleküler ağırlık değerleri Tablo 2'de özetlenmiştir.



Şekil 29: P(*tBoc*$_2$LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)))) kopolimerine ve öncü bileşiklere ait A) UV-Vis spektrumu (MeOH) ve B) FTIR spektrumu.

Tablo 2. Polimer sentezlerine ait reaksiyon koşulları ve moleküler ağırlık değerleri

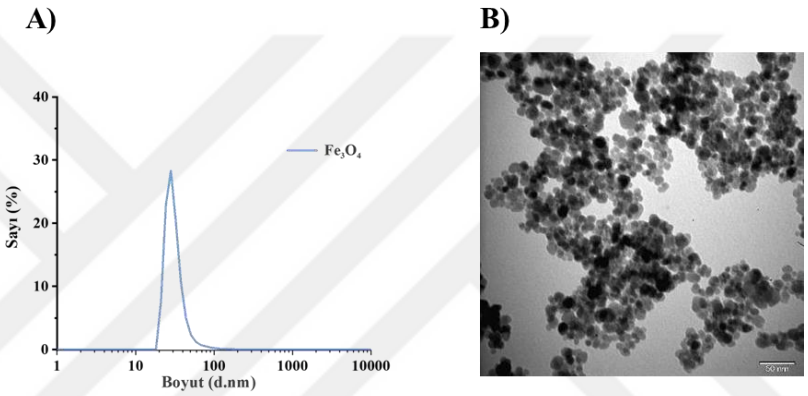
** DMF-GPC'den elde edilen değerlerdir.

Polimerler	[M]:[RAFT]:[I]	Zaman (saat)	Dön. (%)	$M_{n,GPC}$ (kDa)	Đ	$M_{n,NMR}$ (kDa)
P(*tBoc*$_2$LzMA)$_{30}$	[40:[1]:[0.125]	17	80	7.0	1.06	14.0
P(*tBoc*$_2$LzMA$_{20}$-*b*-(TMZMA$_{12}$-*ko*-HEMA$_{15}$))	[20]:[1]:[0.125]	17	64	8.4	1.12	19.7
P(LzMA$_{20}$-*b*-(TMZMA$_{12}$-*ko*-HEMA$_{15}$)) **	-	16	100	6.7	1.31	16.2

4.3 Nanoplatform Sentezi ve Karakterizasyonu

4.3.1 Manyetik Nanoparçacık Sentezi

0.213 g, demir (III) klorür hekzahidrat, 0,147 g demir (II) sülfat heptahidrat ve 1,25 mL %25'lik amonyum hidroksit solüsyonun kullanıldığı birlikte çöktürme yöntemi ile 80 °C yağ banyosunda 2 saat boyunca süren reaksiyon sonucu manyetik nanoparçacıklar %50 verim ile sentezlendi. Şekil 4.20'de sentezlenen nanoparçacığa ait DLS analizinden elde edilen boyut dağılım grafiği (A) ve TEM görüntüsü (B) verilmiştir.

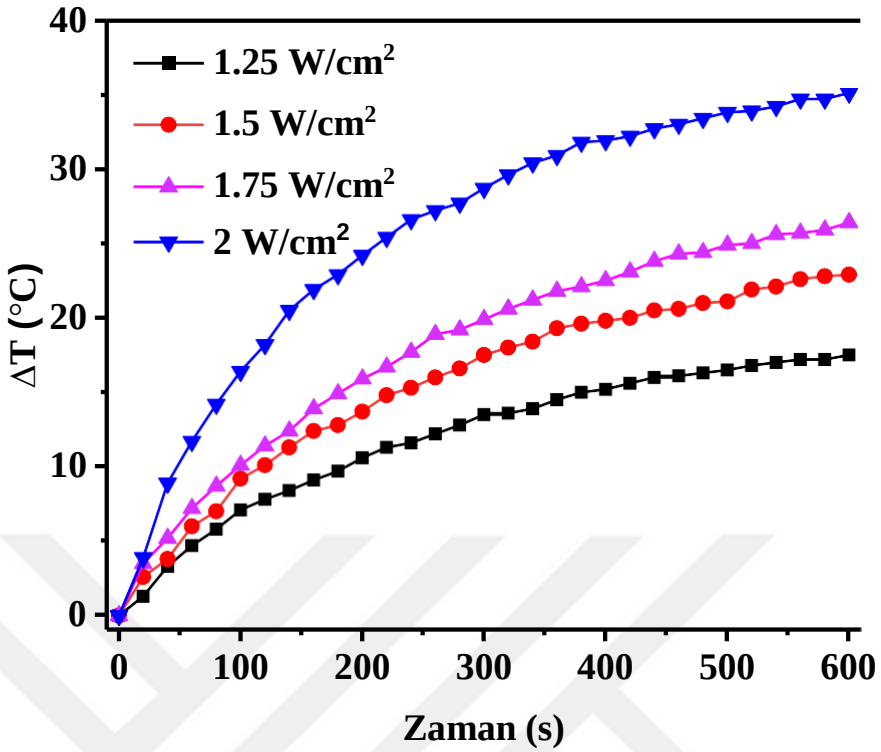


Şekil 30: Fe_3O_4 'e ait A) boyut dağılım grafiği ve B) TEM görüüntüsü

Şekil 4.20A'ya göre sentezlenen parçacığın ortalama boyut dağılımı 45.1 (±0,8) nm olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyel analizi sonuçları negatif yüzey yüküne sahip (-11,2 (±,0) mV) manyetik nanoparçacıkların sentezlendiği anlaşılmıştır. Nanoparçacığın PDI değerinin 0,27 (±0,0) olması monodispers boyut dağılımına sahip parçacıkların sentezlendiğinin bir kanıtıdır. TEM görüntüsü ile karşılaştırıldığında korale sonuçlar elde edilmiştir.

4.3.1.2 Manyetik Nanoparçacığın Termal Davranış Analizi

Kanser hücrelerinin ısı dayanımı normal dokulara göre oldukça düşüktür. Sentezlenen manyetik nanoparçacığın ilerleyen in vitro çalışmalarda hedeflenen fototermal terapi özelliğini kanıtlamak amacıyla 808 nm NIR lazer ile uyarıldığındaki ısınma yeteneği Şekil 4.21'de gösterilmektedir.



Şekil 31: Fe_3O_4 manyetik nanoparçacığın 808nm NIR lazer ışıması altında sıcaklık değişim grafiği.

200 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan Fe_3O_4 solüsyonu 600 saniye boyunca 20 saniyede bir sıcak bölge modunda FLIR termal kamera ölçüm alınarak sıcaklık değerleri kaydedilmiştir. 0. saniye sıcaklık değerleri ile 600. saniye sıcaklık değerleri arasındaki fark birbirlerinden çıkarılarak ΔT (ºC) grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen grafiğe göre manyetik nanoparçacık 808 nm NIR lazer ile uyarıldığında fototermal terapiye elverişli olduğu gösterilmektedir.

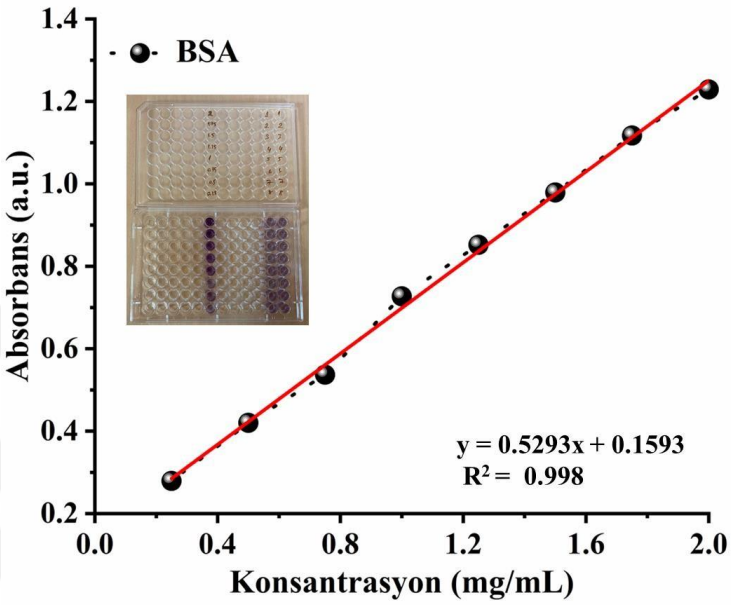
4.3.2 U87-MG Hücre membran proteinlerinin izolasyonu

U87-MG hücrelerinden membran proteinlerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin karakterizasyonu BSA protein analizi ve western-blot yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.1 BSA Protein Miktar Analizi

U87-MG hücre hattından izole edilen membran proteinlerinin miktarca tayini için BSA analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen membran proteinleri 8 fraksiyona ayrılmıştır ve analiz her bir fraksiyon için gerçekleştirilmiştir. BSA standartları ve protein içeriği bilinmeyen örneklerin analizleri 96 kuyulu plaka içerisinde toplam

hacim 200 µL olacak şekilde eşit miktarda hazırlanmıştır. Plaka okuyucu kullanılarak 560 nm'de bulunan absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen denklem kullanılarak fraksiyonların miktarca protein içeriği belirlenmiştir. (Şekil 4.22)



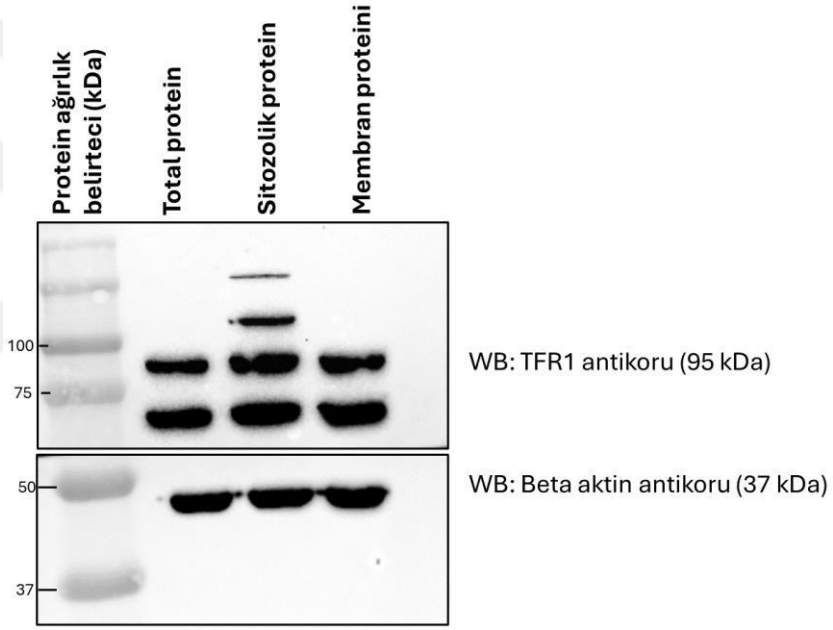
Şekil 32: Sığır serum albümini (BSA) kalibrasyon grafiği.

Elde edilen sonuçlarda 1-8. fraksiyonlarda bulunan protein içeriği sırasıyla; 1.35, 1.17, 0.99, 0.74, 1.10, 0.88, 1.55 ve 1.67 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

4.3.2.2 Western Blot

Yapılan Western Blot sonucu Şekil 4.23'te gösterilmektedir. 1. kuyuda pozitif kontrol olarak kabul edilen U87-MG hücre hattından RIPA tamponu kullanılarak izole edilen total protein, 2. kuyuda membran izolasyonu süresince elde edilen sitozolik protein, 3. kuyuda ise membran proteinleri olduğu düşünülen örnekler eşit miktarda kuyulara ekilerek western blot deneyi gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda 95 kDa moleküler ağırlığa sahip transferrin reseptör-1 (TFR-1) antikoruna ait bantlar elde edildi. Bu aşamada kullanılan antikor poliklonal özelliğe sahip olduğundan ötürü spesifik olmayan bağlanmalar da gözlenmiştir. TFR-1 antikoru, t membran proteinlerine özgül bir antikordur. U87-MG hücre hattında eksprese edildiği 1. kuyudan alınan görüntü

sayesinde kanıtlanmıştır. Sitozolik proteinlerin bulunduğu izolasyon fraksiyonunda TFR-1 antikoruna ait bant gözlenmesi şaşırtıcı olmuştur. Yapılan literatür çalışması hücrenin sitozolik membranında da bulunduğunu göstermiştir. Membran proteinlerinin olduğu düşünülen 3. kuyuda TFR-1 antikoruna ait bant gözlenmesi membran proteinlerinin izole edildiğinin kanıtıdır. Ayrıca beta-aktin antikorunun sekonder antikor olarak kullanılması sonucu 37 kDa moleküler ağırlık seviyesinde eşit bant görüntülerinin gözlenmesi her bir kuyuya eşit miktarda protein örneğinin ekiminin yapıldığının kanıtlamaktadır.

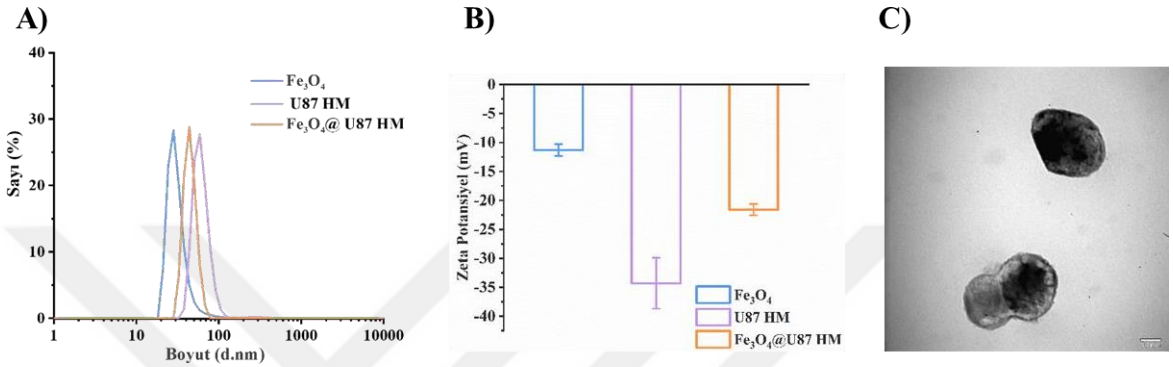


Şekil 33: Membran-spesifik protein TFR-1'e ait western blot analizi. Kanser hücresi lizatı, kanser hücresi sitozolik protein fraksiyonu ve kanser hücresi membran protein fraksiyonu.

4.3.3 Fe_3O_4@U87HM Sentezi

Fe_3O_4@U87HM nanopartikülleri, literatürde en çok kullanılan yöntemi olan ekstrüzyon kullanılarak hazırlandı. Fe_3O_4:HM [1]:[1,2] oranlarında hazırlandı. Toplam Fe_3O_4 içeriği 0,5 mg/mL, HM içeriği ise 0,6 mg/mL olarak sabitlendi. HM 0,75 mL otoklavlanmış, 10 mM bistris tamponu içinde yeniden dağıtıldı. Ardından

Fe_3O_4 0,25 mL su içerisinde yeniden dağıtıldı. Yukarıda belirtilen karışım, 10 mL PBS içinde yeniden süspanse edildi ve Fe_3O_4@U87HM nanoparçacıkları üretmek için 200 nm polikarbonat membranlı bir Avanti mini ekstrüderden 11 kez ekstrüde edildi. Şekil 4.24'te Fe_3O_4@U87HM'ye ait DLS ve zeta grafiği ayrıca TEM görüntüsü verilmiştir.



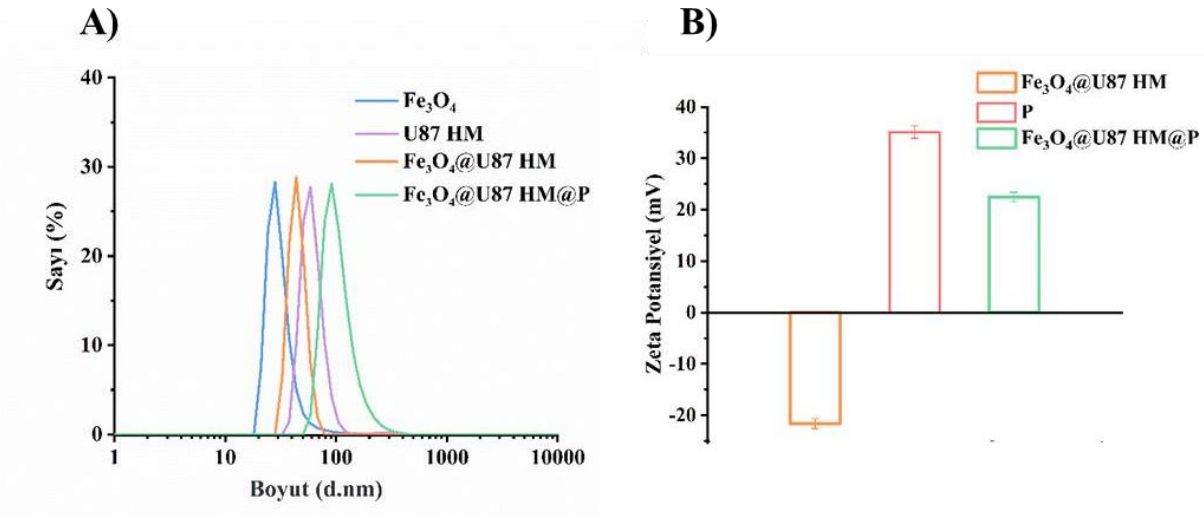
Şekil 34: Fe_3O_4, U87HM, Fe_3O_4@U87HM'ye ait A) boyut dağılım grafiği ve B) Zeta potansiyel değerleri ve C) Fe_3O_4@U87HM'ye ait TEM görüntüsü

DLS grafiğine göre Fe_3O_4, U87HM ve Fe_3O_4@U87HM'nin boyut dağılımları sırasıyla 45,1 (±0.8) d.nm, 63,2 (±0,3) d.nm ve 56,1 (±8,4) d.nm olarak kaydedilmiştir. Fe_3O_4@U87HM'nin boyut dağılımın iki öncü bileşenin ortalama boyut dağılımına sahip olması literatür ile uyumlu bulunmuştur. Zeta potansiyel sonuçları Fe_3O_4, U87HM ve Fe_3O_4 @U87HM'nin sırasıyla şu şekildedir; -11,2 (±1,0) mV, -31,6 (±5,6) mV ve -21,5 (±0,9) olarak kaydedilmiştir. Literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Fe_3O_4 @U87HM'nin zeta potansiyel sonucunun literatür ile örtüşen sonuçlarda elde edilmesi Fe_3O_4@U87HM'in başarılı bir şekilde sentezlendiğinin kanıtıdır. Ayrıca TEM mikrogram görüntüsü, Fe_3O_4@U87HM'nin başarılı dekorasyonunu açıkça doğrulamaktadır [70].

4.3.4 Fe_3O_4@U87HM@P'nin Sentezi

Fe_3O_4@U87HM'nin P(LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA)) ile başarılı dekorasyonunu sağlamak için, kütlece 1:1 oranında [Fe_3O_4@HM]:[P(LzMA-*b*-(TMZMA-*ko*-HEMA))] oda sıcaklığında 1 saat 5 mL PBS içinde inkübe edildi. Sistemden serbest polimeri uzaklaştırmak amacıyla 2 L deiyonize su içinde 2 gün diyaliz edildi. Elde

edilen Fe_3O_4@U87HM@P dondurularak kurutuldu. Fe_3O_4@U87HM@P nano platformu TEM ve DLS ile karakterize edildi. Şekil 4.25'te Fe_3O_4@U87HM@P ve öncü bileşenlerine ait DLS ve zeta grafiği gösterilmiştir.



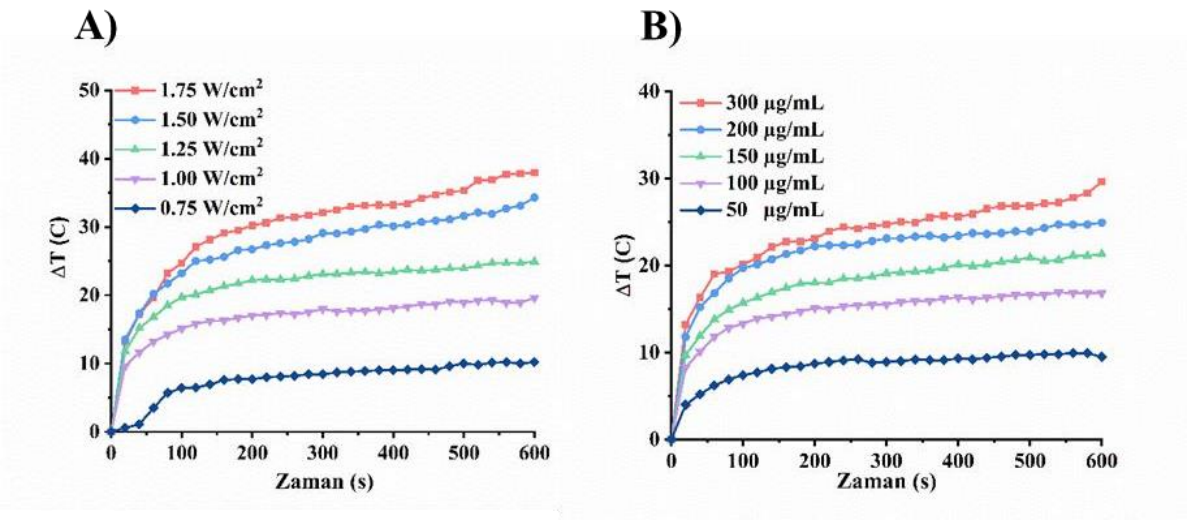
Şekil 35: Fe_3O_4, U87HM, Fe_3O_4@U87HM ve Fe_3O_4@U87HM@P'ye ait A) boyut dağılım grafiği ve B) Zeta potansiyel analizi

DLS grafiğine göre Fe_3O_4@U87HM@P'nin boyut dağılımı 106.8 (±0.70) .nm olarak kaydedilmiştir. Sisteme kemoterapötik ajan taşıyan biyopolimerin elektrostatik etkileşimler ile dahil olmasıyla Fe_3O_4@U87HM@P sistemindeki boyut dağılımında görülen artış literatür ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca sistemin PDI değeri 0.178 (±0.03) olarak bulunmuştur. Bu sonuç doğrultusunda biraraya getirilen biyomimetik nanoplatform ortamındaki parçacıkların boyut dağılımının birbirleri ile oldukça yakın olduğu anlaşılmıştır. Zeta potansiyel sonuçları Fe_3O_4@U87HM, P ve Fe_3O_4@U87HM@P malzemeleri için sırsasıyla; -21,5 (±0,9), 34,8 (±3,40) ve 22,6 (±0,40) olarak kaydedilmiştir. Bu sonuca göre polimerin sisteme dahil edilmesiyle yüzey yükünün negatiften pozitife kayması, Fe_3O_4@U87HM'nin P ile başarılı dekorasyonunu açıkça doğrulamaktadır. Elde edilen sonuçlar literatür uyumludur ve Fe_3O_4 @U87HM@P'in başarılı bir şekilde sentezlendiğinin kanıtıdır. [71]

4.3.4.1 Fe_3O_4@U87HM@P'nin Termal Davranış Analizleri

Fe_3O_4'lerin PTT ajanı olarak kullanıldığı sistemlerde kanser hipertermisinin genellikle 1-2 W/cm^2 aralığında sağlanabildiği son zamanlarda yapılan çalışmalarda literatürde kaydedilmiştir [72]. Hazırlanan biyomimetik nanoplatformun PTT özelliğinin incelenmesi için 808 nm NIR lazer ışınına; 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, ve 1.75 W/cm^2 şiddetlerinde maruz bırakılmıştır. Örneklerin termal kamera ile kaydedilen sıcaklık değerleri incelendiğinde ortamın lazer ışınına maruz bırakılmadan önceki ilk sıcaklığı ve lazer ile uyarılmaya başlandığı andan itibaren kaydedilen sıcaklıklar arasındaki fark kaydedilerek ΔT grafiği çizilmiştir. (Şekil 4.26).

Deney sonunda, biyomimetik nanoplatform 0.75 W/cm² lazer şiddetine maruz kalması sonucu 10,2 °C (±0,1) sıcaklık artışı gözlemlenmiştir. 1 W/cm² şiddetine maruz kaldığında sıcaklık artışı 19,6 °C (±0,2) ve 1.25 W/cm² şiddetinde ise 24,1 °C (±0,2) olmuştur. 1.5 ve 1.75 W/cm² lazer şiddetlerinde, biyomimetik nanoplatform çok hızlı bir şekilde ısınarak 10 dakika içinde sırasıyla 34,3 °C ve 37,6 °C (±1) sıcaklık artışlarına ulaşmıştır. Sonuç olarak, kanser hücrelerinde hipertermi sağlamak ve doku hasarını en aza indirmek amacıyla 41-47 °C sıcaklık aralığını elde etmek için en uygun lazer şiddeti 1.25 W/cm² olarak belirlenmiştir.



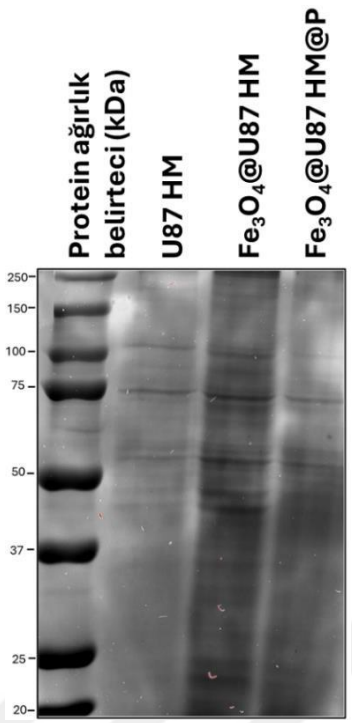
Şekil 36: Fe_3O_4@U87HM@P'ye ait termal davranış analizleri A) 10 dk boyunca farklı güçte lazer ışınına maruz bırakılan nanoplatformun ΔT grafiği. B) 1.25 W/cm^2 laser şiddetinde 10 dk boyunca farklı konsantrasyonlardaki nanoplatformun ΔTgrafiği.

Ayrıca hazırlanan nanoplatformun in vitro deneylerde kullanılacak birinci doz miktarının belirlenmesi için 1.25 W/cm^2 şiddetinde ile farklı konsantrasyonlarda 10 dakika boyunca 808 nm NIR lazer ışınına maruz bırakılmış örneklerin sıcaklık artışları termal kamera ile kaydedilmiştir. Grafikte belirtilen konsantrasyonlar nanoplatformun içerisindeki Fe_3O_4 miktarını belirtmektedir.

10 dk sonunda 300 µg/mL konsantrasyondaki nanotaşıyıcı sistemin 29,6 °C (±0,1), 200 µg/mL konsantrasyondaki nanotaşıyıcı sistemin 24,1 °C (±0,2), 150 µg/mL konsantrasyondaki biyomimetik nanoplatformun sıcaklık değişimi 21,3 °C (±0,2)'e ulaşmıştır. 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyondaki nanotaşıyıcı sistemin ΔT değerleri sırasıyla 16,8 ve 9,5 °C (±2)'ye kadar artmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda in vitro deneylerde Fe_3O_4 miktarına göre kullanılacak doz miktarı 200 µg/mL olarak belirlenmiştir.

4.3.4.2 Fe_3O_4@HM@P'nin Protein Profili

U87-MG hattından izole edilip western blot yoluyla membran proteinleri olduğu kanıtlanan membran fraksiyonlarının, sentezlenen nanoplatformdaki varlığı sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile analiz edildi. Öncelikle %10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) jeli hazırlandı. Ardından %4'lük yükleme jeli hazırlandı. Örnekler; U87HM (10 µg), Fe_3O_4@HM (25 µg) ve Fe_3O_4@HM@P (25 µg) olarak belirlendi ve kuyulara yüklendi. Ayrıca içerisindeki proteinlerin molekül ağırlığı belirli olan protein ağırlık belirteci 7 µL olarak jele yüklendi. 1X elektroforez tamponunda 30 dakika 100 V'ta yürütüldü ve ardından 120 V'ta 90 dakika yürütüldü. Jel tanktan çıkarılıp boyar madde ile 1 saat boyunca inkübe edildi. 1 saatin sonunda jel distile su ile iki gün boyunca protein bantları ortaya çıkana kadar yıkandı. Ardından Bio-Rad ChemiDoc, Kemilüminesans Görüntüleme Sisteminde jel görüntüsü alındı. Şekil 4.27'de gösterilen jel görüntüsüne göre Fe_3O_4@HM@P'nin ve Fe_3O_4@HM'nin protein profili, beklendiği gibi, U87HM'nin protein profiline benzemektedir. Bu sonuçlar sentezlenen nanoplatformda membran proteinlerinin varlığını kanıtlamaktadır [73].

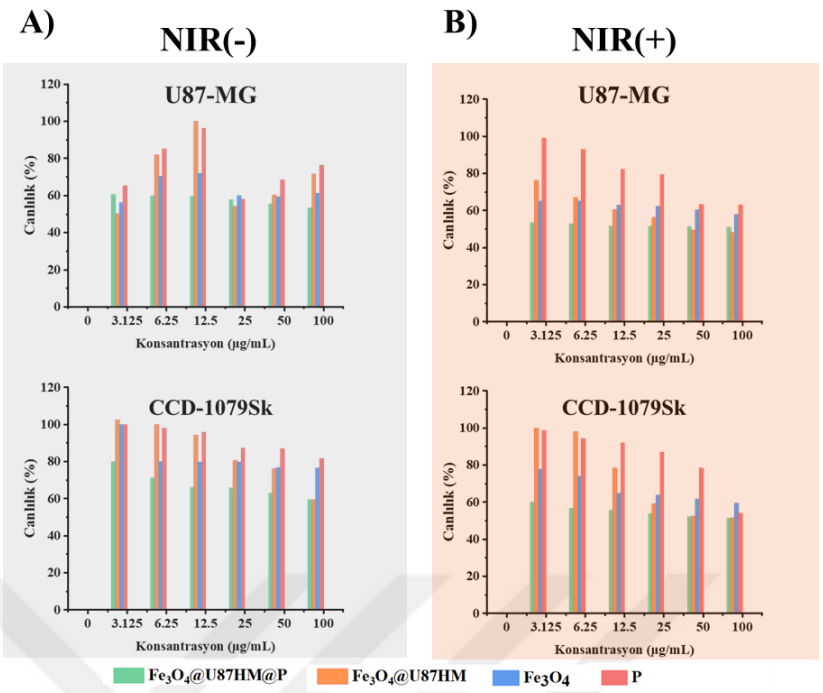


Şekil 37: U87HM membran proteinlerinin, Fe_3O_4@U87HM'nin ve Fe_3O_4@U87HM@P'nin SDS-PAGE protein analizi.

4.4 Sitotoksisite Testi

Biyomimetik nanoplatform ve öncü bileşiklerinin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla MTT sitotoksisite testi gerçekleştirildi. GBM'i hedef alan biyomimetik nanoplatformun geliştirildiği çalışmada U87-MG glioblastoma multiform hücre hattı ve kontrol grubu olarak CCD-1079Sk sağlıklı hücre hattı kullanıldı.

Fe_3O_4, P, Fe_3O_4@HM ve Fe_3O_4@HM@P örnekleri, hücreler üzerindeki toksisitesini değerlendirmek amacıyla uygulandı ve 24 saatlik inkübasyonun ardından hücre canlılığını kolorimetrik olarak incelemek amacıyla hücreler üzerine MTT eklendi ve 3 saat sonunda ELISA Reader cihazıyla ölçüm alındı. Örneklerin CCD-1079Sk ve U87-MG hücrelerinin canlılığına olan etkisi Şekil 4.28'deki grafikte gösterilmektedir. Hazırlanan örnekler içinde Fe_3O_4@HM@P'nin CCD-1079Sk hücreleri üzerinde de en yüksek toksisite gösteren örnek olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca 808 nm NIR(+) lazer uygulanan örneklerin IC_{50} değerleri, NIR(-) uygulanmayan örneklere göre daha düşük konsantrasyonlarda bulunmuştur.



Şekil 38: U87-MG ve CCD-1079Sk hücrelerinin karanlık **A)** NIR (-) ve NIR lazerle **B)** NIR (+) uyarılmaları sonucunda % canlılığı

5.SONUÇ

Glioblastoma Multiform tedavisine yönelik ikili kombinasyon terapisi içeren biyomimetik nanoplatform başarı ile sentezlenmiştir.

Nanoplatformun ilk bileşeni olan ve sisteme etkisinin 808 nm NIR lazer ile uyarıldığında hipertermi etkisi sağlayacak Fe_3O_4 manyetik nanoparçacık birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenmiştir. Fe_3O_4 manyetik nanoparçacığın boyut dağılımı, zeta potansiyeli ve morfolojisi DLS ve TEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. DLS sonuçlarına göre boyutu 45.1 (±0.8) nm olan ve zeta potansiyeli-11.2 (±1.0) mV olan Fe_3O_4 manyetik np sentezlenmiştir. Nanoparçacığın termal davranış analizi 808 nm NIR lazer altında incelenmiş olup fototermal terapide kullanılabilirliği kanıtlanmıştır.

U87-MG hücre hattından membran proteinleri izole edilmiştir. Membran proteinlerinin karakterizasyonu western-blot yöntemi ile aydınlatılmıştır. İzole edilen membran proteinlerinin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli DLS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. U87 hücre membranı kaplı manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin oluşturulmasında ekztrüzyon yöntemi kullanılmıştır. Fe_3O_4@U87HM karakterizasyonu boyut dağılımı ve zeta potansiyeli DLS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DLS sonucuna göre Fe_3O_4@U87HM'nin 56.1 (±8.4) nm'lik bir boyut dağılımına ve -21.5 (±0.9) mV'lik bir zeta potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır.

Sistemin son bileşeni olan polimerlerin sentezlenmesinde kullanılan RAFT ajanı CPADB ekibimiz tarafından önceki çalışmalarda sentezlenmiş olup yapısı ayrıntılı bir şekilde ^{1}H NMR, ^{13}C NMR spektroskopisi ve FTIR analizleri ile aydınlatılmıştır.

RAFT polimerizasyonu tekniği ile sentezlenecek olan polimerlerde kullanılmak üzere hedeflenen monomerlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Kolon kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan monomerlerin karakterizasyonu ^{1}H NMR, ^{13}C NMR ve FTIR spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

CPADB RAFT ajanı kullanılarak önce lizin ünitesi içeren biyopolimer sentezlenmiştir. Ardından homopolimer makroRAFT ajanı olarak kullanılmış ve zincir uzama reaksiyonu temozolomid metakrilat monomeri ve 2-hidroksietil metakrilat monomeri

ile gerçekleştirilmiştir. Kopolimerin karakterizasyonunda GPC, FTIR, ^{1}H NMR ve UV-Vis cihazları kullanılmıştır.

Elektrostatik etkileşimlerden yararlanılarak Fe_3O_4@U87HM@P sistemi oluşturulmuştur. Nihai nanoplatformun karakterizasyonunda DLS cihazı kullanılarak boyut dağılımı ve zeta potansiyeli analiz edilmiştir. DLS sonucuna göre boyut dağılımı 106.8 (±0.7) nm olarak ve zeta potansiyeli 22.6 (±0.4) mV olarak kaydedilmiştir. SDS-PAGE analizi yapılarak nihai nanoplatformun protein profili incelenerek izole edilen U87 membran proteinleri ile uyumlu bulunmuştur. İkili kombinasyon terapisine yönelik sentezlenen biyomimetik nanoplatformun düzgün morfolojide ve uygun boyutlarda olduğu anlaşılmıştır.

Biyomimetik nanoplatformun in vitro etkinlikleri CCD-1079Sk sağlıklı fibroblast ve U87-MG glioblastoma hücre hatlarında incelenmiştir. Elde edilen verilerin, glioblastomayı hedef alan biyomimetik nanoplatform etkinliğinin daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalar gerekmektedir. Biyomimetik nanoplatform ile ilgili çalışmalara devam edilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

[1]. Park, W., Y.-J. Heo, and D.K. Han, *New opportunities for nanoparticles in cancer immunotherapy.* Biomaterials research, 2018. **22**(1): p. 24.

[2]. Jovčevska, I. and S. Muyldermans, *The therapeutic potential of nanobodies.* BioDrugs, 2020. **34**(1): p. 11-26.

[3]. Quazi, S., *Artificial intelligence and machine learning in precision and genomic medicine.* Medical Oncology, 2022. **39**(8): p. 120.

[4]. Chan, H.-K. and S. Ismail, *Side effects of chemotherapy among cancer patients in a Malaysian General Hospital: experiences, perceptions and informational needs from clinical pharmacists.* Asian Pacific Journal of CancerPrevention, 2014. **15**(13): p. 5305-5309.

[5]. Lacouture, M. and V. Sibaud, *Toxic side effects of targeted therapies and immunotherapies affecting the skin, oral mucosa, hair, and nails.* American journal of clinical dermatology, 2018. **19**(Suppl 1): p. 31-39.

[6]. Dadwal, A., A. Baldi, and R. Kumar Narang, *Nanoparticles as carriers fordrug delivery in cancer.* Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2018. **46**(sup2): p. 295-305.

[7]. Mendes, R., et al., *Photothermal enhancement of chemotherapy in breast cancer by visible irradiation of Gold Nanoparticles.* Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 10872.

[8]. Zeng, Y., et al., *Cell membrane coated-nanoparticles for cancer immunotherapy.* Acta Pharmaceutica Sinica B, 2022. **12**(8): p. 3233-3254.

[9]. Roy, P. and B. Saikia, *Cancer and cure: A critical analysis.* Indian journal of cancer, 2016. **53**(3): p. 441-442.

[10]. Hausman, D.M., *What is cancer?* Perspectives in biology and medicine, 2019. **62**(4): p. 778-784.

[11]. Grech, N., et al., *Rising incidence of glioblastoma multiforme in a well-defined population.* Cureus, 2020. **12**(5).

[12]. Torre, L.A., et al., *Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update.* Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 2016. **25**(1): p. 16-27.

[13]. Kolodny, G.M., *New approach to acquired drug resistance and toxicity in cancer chemotherapy.* Medical Hypotheses, 2024: p. 111293.

[14]. Sun, X., et al., *Targeting the organelle for radiosensitization in cancer radiotherapy.* Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2024: p. 100903.

[15]. Dang, B.-T.N., et al., *Nanoparticle-based immunoengineering strategies for enhancing cancer immunotherapy.* Journal of Controlled Release, 2024. **365**: p. 773-800.

[16]. Jaymand, M., *Hydrogel-based drug delivery systems for synergistic chemo/hyperthermia therapy of cancer: A comprehensive review.* Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2024: p. 105581.

[17]. Koc, S.N.T., et al., *Gold nanoparticles-mediated photothermal and photodynamic therapies for cancer.* International Journal of Pharmaceutics, 2024: p. 124057.

[18]. Joyce, J.A. and D.T. Fearon, *T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment.* Science, 2015. **348**(6230): p. 74-80.

[19]. Holmes, M.D., et al., *Dietary carbohydrates, fiber, and breast cancer risk.* American journal of epidemiology, 2004. **159**(8): p. 732-739.

[20]. Miele, E., et al., *Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer.* International journal of nanomedicine, 2009: p. 99-105.

[21]. Suk, J.S., et al., *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery.* Advanced drug delivery reviews, 2016. **99**: p. 28-51.

[22]. Klibanov, A.L., et al., *Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes.* FEBS letters, 1990. **268**(1): p. 235-237.

[23]. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution.* Molecular pharmaceutics, 2008. **5**(4): p. 487-495.

[24]. Fischer, D., et al., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis.* Biomaterials, 2003. **24**(7): p. 1121-1131.

[25]. Qi, R., et al., *PEG-conjugated PAMAM dendrimers mediate efficient intramuscular gene expression.* The AAPS journal, 2009. **11**: p. 395-405.

[26]. Fan, Z., et al., *Synthesis, characterization, and antifungal evaluation of diethoxyphosphoryl polyaminoethyl chitosan derivatives.* Carbohydrate polymers, 2018. **190**: p. 1-11.

[27]. Davis, M.E., *Glioblastoma: overview of disease and treatment.* Clinical journal of oncology nursing, 2016. **20**(5): p. S2.

[28]. Oszvald, Á., et al., *Glioblastoma therapy in the elderly and the importance of the extent of resection regardless of age.* Journal of neurosurgery, 2012. **116**(2): p. 357-364.

[29]. Stummer, W., et al., *Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias.* Neurosurgery, 2008. **62**(3): p. 564-576.

[30]. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.* New England journal of medicine, 2005. **352**(10): p. 987- 996.

[31]. Greene, C. and M. Campbell, *Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules.* Tissue barriers, 2016. **4**(1): p. e1138017.

[32]. Shabani, L., et al., *The brilliance of nanoscience over cancer therapy: Novel promising nanotechnology-based methods for eradicating glioblastoma.* Journal of the Neurological Sciences, 2022. **440**: p. 120316.

[33]. Cha, G.D., et al., *Advances in drug delivery technology for the treatment of glioblastoma multiforme.* Journal of controlled release, 2020. **328**: p. 350-367.

[34]. Ruan, S., et al., *Increased gold nanoparticle retention in brain tumors by in situ enzyme-induced aggregation.* ACS nano, 2016. **10**(11): p. 10086-10098.

[35]. Krętowski, R., et al., *The effects of silica nanoparticles on apoptosis and autophagy of glioblastoma cell lines.* Nanomaterials, 2017. **7**(8): p. 230.

[36]. Cantow, H.-J. and R. Mülhaupt, *Hermann staudinger and polymer researchin freiburg.* Hierarchical Macromolecular Structures: 60 Years after the Staudinger Nobel Prize I, 2013: p. 21-37.

[37]. Braunecker, W.A. and K. Matyjaszewski, *Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives.* Progress in polymer science, 2007. **32**(1): p. 93-146.

[38]. Michael, J.S., et al., *Nanotechnology for treatment of glioblastoma multiforme.* Journal of Translational Internal Medicine, 2018. **6**(3): p. 128-133.

[39]. Kumar, S.S., *Formulation and characterization of noscapine-loaded polycaprolactone nanoparticles.* Asian Journal of Pharmaceutics (AJP), 2019. **13**(01).

[40]. Liu, J.-L., et al., *Preparation of N, N, N-trimethyl chitosan-functionalized retinoic acid-loaded lipid nanoparticles for enhanced drug delivery to glioblastoma.* Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2017. **16**(8): p. 1765-1772.

[41]. Xu, K., et al., *Increased the TMZ concentration in brain by poly (2-ethyl-2-oxazoline) conjugated temozolomide prodrug micelles for glioblastoma treatment.* European Polymer Journal, 2021. **145**: p. 110232.

[42]. Li, C., et al., *Paclitaxel-loaded cholesterol-conjugated polyoxyethylene sorbitol oleate polymeric micelles for glioblastoma therapy across the blood–brain barrier.* Polymer Chemistry, 2015. **6**(14): p. 2740-2751.

[43]. Marslin, G., et al., *Curcumin encapsulated into methoxy poly (ethylene glycol) poly (ε-caprolactone) nanoparticles increases cellular uptake and neuroprotective effect in glioma cells.* Planta medica, 2017. **83**(05): p. 434-444.

[44]. Mukherjee, S., et al., *Exploring dendrimer-based drug delivery systems and their potential applications in cancer immunotherapy.* European Polymer Journal, 2022. **177**: p. 111471.

[45]. Gazaille, C., et al., *Glioblastoma-targeted, local and sustained drug delivery system based on an unconventional lipid nanocapsule hydrogel.* Biomaterials Advances, 2023. **153**: p. 213549.

[46]. Eljamel, M.S., *Brain photodiagnosis (PD), fluorescence guided resection (FGR) and photodynamic therapy (PDT): past, present and future.* Photodiagnosis and photodynamic Therapy, 2008. **5**(1): p. 29-35.

[47]. Wang, K., et al., *Super-small zwitterionic micelles enable the improvement of blood-brain barrier crossing for efficient orthotopic glioblastoma combinational therapy.* Journal of Controlled Release, 2023. **364**: p. 261-271.

[48]. Younis, M.R., et al., *Acidity/carbon dioxide-sensitive triblock polymer-grafted photoactivated vesicles for programmed release of chemotherapeutic drugs against glioblastoma.* Acta Biomaterialia, 2023. **157**: p. 442-450.

[49]. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes: Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids.* Science, 1972. **175**(4023): p. 720-731.

[50]. Nicolson, G.L., *Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells: I. Cytoplasmic influence over cell surface components.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes, 1976. **457**(1): p. 57-108.

[51]. Nicolson, G.L., *The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2014. **1838**(6): p. 1451-1466.

[52]. Hu, C.-M.J., et al., *Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(27): p. 10980-10985.

[53]. Cao, H., et al., *Liposomes coated with isolated macrophage membrane can target lung metastasis of breast cancer.* ACS nano, 2016. **10**(8): p. 7738-7748.

[54]. Cheng, S., et al., *Artificial mini dendritic cells boost T cell–based immunotherapy for ovarian cancer.* Advanced Science, 2020. **7**(7): p. 1903301.

[55]. Deng, G., et al., *Cell-membrane immunotherapy based on natural killer cell membrane coated nanoparticles for the effective inhibition of primary and abscopal tumor growth.* ACS nano, 2018. **12**(12): p. 12096-12108.

[56]. Hu, Q., et al., *Anticancer platelet-mimicking nanovehicles.* Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.), 2015. **27**(44): p. 7043.

[57]. Sun, H., et al., *Cancer-Cell-Biomimetic Nanoparticles for Targeted Therapy of Homotypic Tumors.* Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.), 2016. **28**(43): p. 9581-9588.

[58]. Xu, C.-H., et al., *Cell membrane-camouflaged nanoparticles as drug carriers for cancer therapy.* Acta biomaterialia, 2020. **105**: p. 1-14.

[59]. Bang, K.-H., et al., *The delivery strategy of paclitaxel nanostructured lipid carrier coated with platelet membrane.* Cancers, 2019. **11**(6): p. 807.

[60]. Rao, L., et al., *Microfluidic electroporation-facilitated synthesis of erythrocyte membrane-coated magnetic nanoparticles for enhanced imaging-guided cancer therapy.* ACS nano, 2017. **11**(4): p. 3496-3505.

[61]. Sherwood, J., et al., *Cell-membrane coated iron oxide nanoparticles for isolation and specific identification of drug leads from complex matrices.* Nanoscale, 2019. **11**(13): p. 6352-6359.

[62]. Chen, Z., et al., *Cancer cell membrane–biomimetic nanoparticles for homologous-targeting dual-modal imaging and photothermal therapy.* ACS nano, 2016. **10**(11): p. 10049-10057.

[63]. Shervington, L., O. Ingham, and A. Shervington, *A novel series of phenolic temozolomide (TMZ) esters with 4 to 5-fold increased potency, compared to*

TMZ, against glioma cells irrespective of MGMT expression. RSC advances, 2020. **10**(30): p. 17561-17570.

[64]. Chu, W., et al., *Development and validation of a targeted treatment for brain tumors using a multi-drug loaded, relapse-resistant polymeric theranostic.* Biomacromolecules, 2023. **24**(6): p. 2674-2690.

[65]. Dag, A., et al., *Phthalocyanine-conjugated glyconanoparticles for chemo-photodynamic combination therapy.* Biomacromolecules, 2021. **22**(4): p. 1555-1567.

[66]. Sun, Y., et al., *Surface initiated ATRP in the synthesis of iron oxide/polystyrene core/shell nanoparticles.* European Polymer Journal, 2007. **43**(3): p. 762-772.

[67]. Mo, J., et al., *Upconversion nanoparticle-based cell membrane-coated cRGD peptide bioorthogonally labeled nanoplatform for glioblastoma treatment.* ACS applied materials & interfaces, 2022. **14**(44): p. 49454-49470.

[68]. Katmerlikaya, T.G., et al., *Dual-drug conjugated glyco-nanoassemblies for tumor-triggered targeting and synergistic cancer therapy.* ACS Applied Bio Materials, 2022. **5**(11): p. 5356-5364.

[69]. Gencoglu Katmerlikaya, T., et al., *Glycopolymeric Photoactive Micelles for Glucose Transporter-Targeted Synergistic Combination Therapy.* ACS Applied Polymer Materials, 2024. **6**(7): p. 4149-4163.

[70]. Zhang, W., et al., *Cancer cell membrane-camouflaged nanorods with endoplasmic reticulum targeting for improved antitumor therapy.* ACS applied materials & interfaces, 2019. **11**(50): p. 46614-46625.

[71]. Yang, R., et al., *Cancer cell membrane-coated adjuvant nanoparticles with mannose modification for effective anticancer vaccination.* ACS nano, 2018. **12**(6): p. 5121-5129.

[72]. Wang, L., et al., *Magnetically targeted erythrocyte membrane coated nanosystem for synergistic photothermal/chemotherapy of cancer.* Journal of Materials Chemistry B, 2020. **8**(18): p. 4132-4142.

[73]. Geng, S., et al., *Biomimetic Nanovehicle-Enabled Targeted Depletion of Intratumoral Fusobacterium nucleatum Synergizes with PD-L1 Blockade against Breast Cancer.* ACS nano, 2024. **18**(12): p. 8971-8987.

ÖZGEÇMİŞ

Ad – Soyad : Buse Sancaklı

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-Posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

Lisans : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Pr.

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR ve PATENTLER

Buse SANCAKLI, Tuğba Gençoğlu KATMERLİKAYA, Sezen ATASOY, Zeynep ÇAĞMAN. Aydan DAĞ. '' Biyopolimer-Modifiye Kanser Hücresi Membranı Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi ve Glioblastomada Tedavi Etkinliğinin İncelenmesi'' *VIII. Ulusal Biyomühendislik Kongresi "Biyomühendislik Uygulamaları,* Manisa, Türkiye, 16-18 Mayıs 2024. (Poster Bildirisi)

DİĞER ÇALIŞMALARDAN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Gencoglu Katmerlikaya, T., Cetin Ersen, B., Dag, A., **Sancakli, B.**, Omurtag Ozgen, P. S., Keskin Yalcin, E., & Avci, B. (2024). Glycopolymeric Photoactive Micelles for Glucose Transporter-Targeted Synergistic Combination Therapy. *ACS Applied Polymer Materials*, *6*(7), 4149-4163.

Mirabolghasemi, M., Bektas, N., **Sancakli, B.,** Dag, A., & Aydogan, A. (2024). Drug encapsulation and release with a nonionic amphiphilic calix [4] pyrrole. *New Journal of Chemistry*.

B Sancakli, TG Katmerlikaya, BC Ersen, PS Omurtag, AD Ozgen ''Synthesis and Characterization of Paclitaxel-loaded pH-sensitive Glycopolymeric Micelles'' *8.International FAPS Polymer Congress,* Istanbul, Türkiye, 12-14 September 2023. (Poster Presantation)