

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİKOPOLİMER BAZLI TERANOSTİK NANOSİSTEMLERİN MEME
KANSERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Gülşah YİĞİT ERDEM

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan DAĞ

MART 2025

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİKOPOLİMER BAZLI TERANOSTİK NANOSİSTEMLERİN MEME
KANSERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

**Gülşah YİĞİT ERDEM
175314001**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan DAĞ

MART 2025

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 175314001 numaralı Doktora Öğrencisi Gülşah YİĞİT ERDEM, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "GLİKOPOLİMER BAZLI TERANOSTİK NANOSİSTEMLERİN MEME KANSERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Aydan DAĞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Binnur TEMEL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi P.S. OMURTAG ÖZGEN
Marmara Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep ÇAĞMAN
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Neşe ÇAKIR YİĞİT
Yalova Üniversitesi

Teslim Tarihi : **03 Mart 2025**

Savunma Tarihi : **07 Şubat 2025**



Anneme ve Babama,

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim ve çalışmalarım boyunca bana her zaman destek olan, bilgisini ve tecrübelerini esirgemeyen, bilimsel araştırma yapmayı öğretene ve birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Aydan DAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım sırasında tez komitesi üyeliğini gerçekleştiren ve değerli tavsiyeleriyle yanımda bulunan Prof. Dr. Binnur TEMEL ve Dr. Öğr. Üyesi Pınar Sinem OMURTAG ÖZGEN'e; *in vitro* çalışmaların gerçekleştirilmesini sağlayan ve bu alandaki bilgisiyle bana destek olan Arş. Gör. Dr. Sezen ATASOY'a içten teşekkür ederim. Ayrıca moleküler çalışmalar ve *in vivo* çalışmalara (etik kurul onay numarası: 2018/23) destek veren Doç. Dr. Beyza GÖNCÜ'ye, *in vivo* çalışmaların gerçekleştirilmesinde katkı sağlayan Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı ekibine, Elif Beyza POLAT, Özge Sultan ZENGİN'e ve histopatoloji çalışmalarını gerçekleştiren Prof. Dr. Serpil DAĞ ve Arş. Gör. Ayfer YILDIZ UYSAL'a teşekkür ederim.

Yıllarca aynı laboratuvarı paylaşarak karşılaştığım zorluklarda yanımda olan, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili arkadaşlarım Büşra ÇETİN ERSEN ve Tuğba GENÇOĞLU KATMERLİKAYA'ya; çalışmalarım süresince analizlerde bana yardımcı olan, sorunlarımı çözen Ahmet BALCI'ya; enerjileriyle çevrelerine neşe katan, azimlerini her zaman takdir ettiğim arkadaşlarım Buse SANCAKLI ve Buse AVCI'ya ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana güvenen, destekleyen ve bugünlere güçlü bir şekilde gelmemi sağlayan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim canım babam Kenan YİĞİT'e, sevgili annem Nuriye YİĞİT'e, abim Ekrem YİĞİT'e, çok sevdiğim Zeliha TEPE YİĞİT'e ve ailemizin en değerli üyesi, her baktığımda tüm sıkıntılarımı unutturan canım yeğenim Zeynep Pera YİĞİT'e varlıkları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Özellikle her an sevgisi, desteği, cesaretlendirmesi ve bana olan inancıyla yanımda duran, her umutsuzluğa düştüğümde beni ayağa kaldıran kıymetli eşim Mustafa ERDEM'e, varlığı için sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak, doktora tez sürecimde 20210209, 12.2018/13 ve 20211201 numaralı BAP projeleri kapsamında mali destek sağlayan Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi'ne, BVÜ bünyesindeki İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (İLMER) ve tüm çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca, 2211-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında burs desteği ve 118S458 numaralı proje kapsamında mali destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Mart 2025

Gülşah YİĞİT ERDEM
(Eczacı)

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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gülşah YİĞİT ERDEM

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ii
BEYAN.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR.....	ix
SEMBOLLER	xi
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xix
SUMMARY	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kanser Biyolojisi; Tümör Mikroçevresi, EPR Etkisi ve Apoptoz	4
2.2 Meme Kanseri; Tanı ve Tedavi Yöntemleri.....	8
2.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler	16
2.4 Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler	19
2.5 Polimerizasyon Teknikleri	21
2.5.1 Kondenzasyon polimerizasyonu	22
2.5.2 Katılma polimerizasyonu	23
2.5.2.1 Serbest radikal polimerizasyonu	24
2.5.2.2 İyonik polimerizasyon.....	25
2.5.2.3 Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonu.....	25
2.6 Halka Açılma Polimerizasyonu (ROP)	32
2.7 Klık Kimyası	33
2.8 Glikopolimerik ilaç taşıyıcı sistemler	35
2.9 Teranostik Nanopartiküller (TNP)	38
2.10 Fototermal Terapi ile Kanser Tedavisi (PTT)	42
2.11 Gen Terapisi ile Kanser Tedavisi	45
2.12 Kombinasyon Kanser Tedavisi	48
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	52
3.1 Malzemeler ve Kullanılan Cihazlar	52
3.1.1 Malzemeler.....	52
3.1.2 Kullanılan cihazlar	53
3.2 Başlatıcıların ve Momomerlerin Sentezi.....	53
3.2.1 Halka açılma polimerizasyonunda kullanılan başlatıcı 1-azido-3-amino propan sentezi	54
3.2.2 RAFT ajanının sentezi.....	55
3.2.2.1 Di(tiyobenzoil) disülfid sentezi.....	55
3.2.2.2 4-Siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) sentezi	55
3.2.2.3 Trimetilsillil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) raft ajanı sentezi.....	56

3.2.3 Monosakkarit monomerinin sentezi	56
3.2.3.1 1,2:4,5-di- <i>O</i> -İzopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₁) sentezi	57
3.2.3.2 3- <i>O</i> -Metakriloil-1,2:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₁ MA) sentezi	57
3.2.3.3 2,3:4,5-di- <i>O</i> -İzopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₂) sentezi	58
3.2.3.4 1- <i>O</i> -Metakriloil-2,3:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₂ MA) sentezi	58
3.2.4 <i>N</i> -(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomerinin sentezi .	59
3.2.5 2-(4-Formil-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2- il) etilmetakrilat monomerinin sentezi (MiMA)	60
3.2.5.1 2-(Furan-2-il)-1,3-dioksolan sentezi (FurKet)	61
3.2.5.2 (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-3a,4,7,7a-tetrahidro- epoksisobenzofuran- 1,3-dion sentezi (FurKetMi).....	61
3.2.5.3 (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-2-(2-hidroksietil)-3a,4,7,7a- tetrahidro-1H-4,7-epoksisoindol-1,3(2H)-dion sentezi (FurKetMiOH)	62
3.2.5.4 2-((3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a- heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etil metakrilat sentezi (MiMA)	62
3.2.6 Lizin monomerinin sentezi.....	63
3.2.6.1 <i>N-N</i> -Di-(<i>ter</i> -bütoksikarbonil)-L-Lizin (<i>tBoc-Liz</i>) sentezi	63
3.2.6.2 <i>N</i> -(<i>ter</i> -bütoksi karbonil)-L-Lizin <i>N</i> -karboksianhidrit sentezi (<i>tBoc-Liz</i> - NCA)	63
3.3 Polimerizasyon Reaksiyonları.....	64
3.3.1 ω -Azido fonksiyonlu <i>N-ter</i> -bütoksikarbonil-L-lizin polimerinin sentezi (P(<i>tBoc-Liz</i>)-N ₃).....	65
3.3.2 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7- epoksiisoindol-2-il)etil metakrilat) homopolimerizasyonu (PMiMA)	65
3.3.3 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7- epoksisoindol-2-il)etilmetakrilat- <i>blok-N</i> -(3,4-dihidroksifenetil)metakril- amid) diblok polimerizasyonu P(MiMA- <i>b</i> -DopMA)	66
3.3.4 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3 ^a ,4,7,7 ^a -heksahidro-2H-4,7- epoksisoindol-2-il)etilmetakrilat- <i>blok-N</i> -(3,4-dihidroksifenetil)metakril- amid)- <i>blok-3-O</i> -metakriloil-1,2:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz) triblok kopolimerizasyonu (P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₁ MA)).....	66
3.3.5 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3 ^a ,4,7,7 ^a -heksahidro-2H-4,7- epoksisoindol-2-yl)etilmetakrilat- <i>blok-N</i> -(3,4-dihidroksifenetil)metakril- amid)- <i>blok-1-O</i> -metakriloil-2,3:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz) triblok kopolimerizasyonu (P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₂ MA)).....	67
3.3.6 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₁ MA) Triblok kopolimerinin trimetilsillil grubu hidrolizi	67
3.3.7 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₂ MA) Triblok kopolimerinin trimetilsillil grubu hidrolizi	67
3.3.8 Klik reaksiyonu ile tetrablok kopolimerin sentezi P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b- iprFr</i> ₁ MA)- <i>b</i> -P(<i>tBoc-Liz</i>) (P1)	68
3.3.9 Klik reaksiyonu ile tetrablok kopolimerin sentezi P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b- iprFr</i> ₂ MA)- <i>b</i> -P(<i>tBoc-Liz</i>) (P2)	68

3.3.10 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>iprFr</i> ₁ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin izopropiliden ve <i>ter</i> bütüloksikarbonil grubu hidrolizi	68
3.3.11 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>iprFr</i> ₂ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin izopropiliden ve <i>ter</i> bütüloksikarbonil grubu hidrolizi.....	69
3.4 Kemoterapötik İlaç (Doksorubisin, Dox) Taşıyan Tetrablok Kopolimerin Hazırlanması.....	69
3.4.1 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin konjugasyonu (P1/Dox)	69
3.4.2 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin konjugasyonu (P2/Dox)	69
3.5 Manyetik Nanoparçacıkların (Fe ₃ O ₄) Sentezi	70
3.6 Upconversion Nanopartiküllerin (UCNP) Hazırlanması.....	71
3.6.1 NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺ UCNP' nin hazırlanması.....	71
3.6.2 Sitrat kaplı UCNP sentezi (UCNP-C).....	72
3.7 Tetrablok Polimer Kaplı UCNP Nanoprobunun Hazırlanması.....	73
3.8 Manyetik Özellikli Glikopeptid Biyonanoprobuların Hazırlanması	73
3.9 UCNP@MP-Dox Nanopartiküllerden Dox Salım Deneyi.....	74
3.10 siRNA Taşıyan Biyonanoprobuların Hazırlanması ve Salım Profillerinin İncelenmesi.....	74
3.11 Hazırlanan Teranostik Biyonanoprobuların <i>In vitro</i> Çalışmalarla Test Edilmesi	74
3.11.1 Hücrelerin büyütülmesi	74
3.11.2 Sitotoksikite çalışmaları.....	74
3.11.3 Hücre içi alım çalışmaları	75
3.11.4 Biyonanoprobuların apoptoz çalışmaları	75
3.12 Hazırlanan Teranostik Biyonanoprobuların <i>In Vivo</i> Çalışmalarla Test Edilmesi	76
3.12.1 Meme tümör modelinin oluşturulması	76
3.12.2 Hazırlanan UCNP'lerin antikanser tedavisinde etkinliğinin incelenmesi	76
3.12.3 <i>In vivo</i> biyodağılım ve farmakokinetik çalışmaları.....	76
3.12.4 Histopatolojik antikanser etkilerinin değerlendirilmesi.....	77
3.12.4.1 İmmunohistokimyasal boyama (IHC).....	77
3.12.4.2 İmmunofloresan boyama.....	78
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	80
4.1 Başlatıcıların ve Monomerlerin Sentezi.....	80
4.1.1 Halka açılma polimerizasyonunda kullanılan başlatıcı 1-azido-3-amino propan sentezi	80
4.1.2 RAFT ajanının sentezi.....	81
4.1.3 Monosakkarit monomerinin sentezi	85
4.1.3.1 1- <i>O</i> -Metakrilolil-1,2:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₁ MA) sentezi	85
4.1.3.2 1- <i>O</i> -Metakrilolil-2,3:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₂ MA) sentezi	86
4.1.4 <i>N</i> -(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomerinin sentezi .	88
4.1.5 2-(4-Formil-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il) etilmetakrilat monomerinin sentezi (MiMA).....	89
4.1.6 Lizin monomerinin sentezi (<i>t</i> Boc-Liz-NCA)	93
4.2 Polimerizasyon Reaksiyonları.....	95

4.2.1 ω -Azido fonksiyonlu <i>N-ter</i> -bütüloksikarbonil-L-lizin polimerinin sentezi (P(<i>tBoc-Liz</i>)-N ₃).....	95
4.2.2 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7 epoksiisindol-2-il)etil metakrilat) homopolimerizasyonu (PMiMA)	96
4.2.3 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7 epoksisindol-2-il)etilmetakrilat- <i>blok-N</i> -(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid) diblok polimerizasyonu P(MiMA- <i>b</i> -DopMA)	97
4.2.4 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3 ^a ,4,7,7 ^a -heksahidro-2H-4,7-epoksisindol-2-il)etilmetakrilat- <i>blok-N</i> -(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid)- <i>blok-3-O</i> -metakriloil-1,2:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz) triblokkopolimerizasyonu(P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₁ MA))	99
4.2.5 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3 ^a ,4,7,7 ^a -heksahidro-2H-4,7-epoksisindol-2-il)etilmetakrilat- <i>blok-N</i> -(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid)- <i>blok-1-O</i> -metakriloil-2,3:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz) triblok kopolimerizasyonu (P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₂ MA)).....	100
4.2.6 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₁ MA) Triblok kopolimerinin trimetilsillil grubu hidrolizi	102
4.2.7 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₂ MA) Triblok kopolimerinin trimetilsillil grubu hidrolizi	102
4.2.8 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₁ MA)- <i>b</i> -P(<i>tBoc-Liz</i>) Tetrablok kopolimerinin klik reaksiyonu ile sentezi	103
4.2.9 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₂ MA)- <i>b</i> -P(<i>tBoc-Liz</i>) Tetrablok kopolimerinin klik reaksiyonu ile sentezi	105
4.2.10 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₁ MA)- <i>b</i> -P(<i>tBoc-Liz</i>) Tetrablok kopolimerinin izopropiliden ve <i>ter</i> bütüloksikarbonil grubu hidrolizi	106
4.2.11 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-iprFr</i> ₂ MA)- <i>b</i> -P(<i>tBoc-Liz</i>) Tetrablok kopolimerinin izopropiliden ve <i>ter</i> bütüloksikarbonil grubu hidrolizi.....	107
4.3 Kemoterapötik İlaç (Doksorubisin, Dox) Taşıyan Tetrablok Kopolimerin Hazırlanması.....	108
4.3.1 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-Fr</i> ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi (P1-Dox).....	108
4.3.2 P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b-Fr</i> ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi (P2-Dox).....	109
4.4 Manyetik Nanoparçacıkların (Fe ₃ O ₄) Sentezi	109
4.5 Upconversion Nanopartiküllerin (UCNP) Hazırlanması.....	111
4.5.1 NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺ UCNP' nin hazırlanması (UCNP)	112
4.5.2 Sitrata kaplı UCNP sentezi (UCNP-C)	113
4.6 Tetrablok Polimer Kaplı UCNP Nanoprobalarının Hazırlanması	114
4.7 Manyetik Özellikli Glikopeptid Biyonanoprobalarının Hazırlanması.....	114
4.8 UCNP@MP-Dox Nanoprobunun Manyetik Özelliklerinin ve Fototermal Terapi Etkinliğinin İncelenmesi	117
4.9 Hazırlanan Nanoprobaların Dox Salım Deneyi	120
4.10 siRNA Taşıyan Biyonanoprobalarının Hazırlanması ve Salım Profillerinin İncelenmesi (UCNP@P-Dox/siRNA)	122
4.11 Hazırlanan Teranostik Biyonanoprobalarının <i>In Vitro</i> Çalışmalarla Test Edilmesi	123
4.11.1 Sitotoksikite çalışmaları.....	123
4.11.2 Hücre içi alım çalışmaları	127

4.11.3 Biyonanoproların apoptoz çalışmaları	130
4.12 Hazırlanan Teranostik Biyonanoproların <i>In Vivo</i> Çalışmalarla Test Edilmesi	133
4.12.1 Meme tümör modelinin oluşturulması	133
4.12.2 Hazırlanan UCNP'lerin antikanser tedavisinde etkinliğinin incelenmesi	134
4.12.3 <i>In vivo</i> biyodağılım çalışmaları	136
4.13 Histopatolojik Çalışmalar	138
5. SONUÇLAR	142
KAYNAKLAR	144
EKLER	166
ÖZGEÇMİŞ.....	168



KISALTMALAR

AIBN	: 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile)
ATRP	: Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
AuNPs	: Altın Nanopartiküller
Bcl-2	: B-Hücreli Lenfoma-2
CDCl₃	: Döteryumlanmış kloroform
CNPs	: Karbon Bazlı Nanopartiküller
CTAB	: Setrimonyum bromür
CuAAC	: Bakır Katalizli Azid-Alkin Siklokatılma Reaksiyonu
DA	: Diels–Alder
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol)
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
D-MEM	: Dulbecco modifiye besin ortamı
DMF	: Dimetil formamid
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Dox	: Doksorubisin
EPR	: Artırılmış geçirgenlik ve Alıkonma
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
GLUT	: Glukoz Taşıyıcısı
GP	: Glikopolimer
GPC	: Jel dağılım kromatografisi
Ln	: Lantanit
LNPs	: Lipid Nanopartiküller
MEPs	: Metalik Nanopartiküller
MNPs	: Manyetik Nanopartiküller
MR	: Manyetik Rezonans
MSNs	: Mezoporöz Silika Nanopartiküller
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MWCNT	: Çok Duvarlı Karbon Nanotüp
NCA	: N-Karboksianhidrit
NIR	: Yakın Kızılötesi
NMP	: Nitroksit Aracılı Polimerizasyon
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
OFF	: Kapalı
ON	: Açık
P	: Polimer
p53	: Tümör Protein 53
PDI	: Polidispersite
PEG	: Poli(etilen glikol)
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PNPs	: Polimerik Nanopartiküller

PTT	: Fototermal Terapi
QD	: Kuantum Nokta
RAFT	: Tersinir Katılma-Parçalanma Zincir Reaksiyonu
RES	: Retikuloendoteliyal sistem
RNA	: Ribonükleik Asit
siRNA	: Küçük Girişimci RNA
SLNs	: Katı Lipid Nanopartikülleri
SNPs	: Silika Bazlı Nanopartiküller
SPECT	: Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi
SPION	: Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar
SWCNT	: Tek Duvarlı Karbon Nanotüp
TEM	: Taramalı elektron mikroskopu
TEMPO	: 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidinil-N-oksi
UCL	: Upconversion Luminesans
UCNP	: Upconversion Nanopartikül
UV-Vis	: Ultraviyole ve görünür ışık
XRD	: X-ray ışını difraktometresi

SEMBOLLER

$^{\circ}\text{C}$: Derece Santigrat
\AA	: Angstrom
C_D	: Isı Kapasitesi
g	: Gram
h	: Isı Transfer Katsayısı
h	: Saat
J	: Joule
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
m_p	: Çözücünün kütlesi
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
$mmol$: Milimol
η	: Fototermal Dönüşüm Verimliliği
S	: Kabın Yüzey Alanı
t	: Zaman
T_{Max}	: Maksimum Sabit Sıcaklık
T_{Surr}	: Ortam Sıcaklığı
W	: Watt
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
τ_s	: Isı Transferinin Zaman Sabiti

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1	: Kemoterapötik ilaçların biyokimyasal sınıflandırması	13
Tablo 3.1	: Seçilen anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin listesi.....	53
Tablo 4.1	: P(<i>t</i> Boc-Liz)-N ₃ homopolimerlerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları	95
Tablo 4.2	: PMiMA homopolimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.	97
Tablo 4.3	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA) diblok kopolimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.....	98
Tablo 4.4	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -iprFr ₁ MA) triblok kopolimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.	99
Tablo 4.5	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -iprFr ₂ MA) triblok kopolimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.	101
Tablo 4.6	: Tetrablok kopolimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.	106
Tablo 4.7	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz) polimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.....	107
Tablo 4.8	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz) polimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.....	107
Tablo 4.9	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz)/Dox polimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları	108
Tablo 4.10	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz)/Dox polimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.	109
Tablo 4.11	: Hazırlanan UCNP nanoparçacıkların DLS ölçümleri.	113
Tablo 4.12	: Belirli azot/ fosfor (N/P) oranlarındaki biyonanoproların boyut ve zeta potansiyel değerleri.	123
Tablo 4.13	: İki bağımsız deney sonucunda elde edilen ortalama IC ₅₀ değerleri..	124
Tablo 4.14	: Mitotik indeks verilerinin istatistiksel analizi.	139
Tablo 4.15	: Bax-Bcl-2 boyamalarının istatistiksel korelasyonu.....	140

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Tümör mikroçevresinin şematik gösterimi	5
Şekil 2.2	: Tümör ortamında nanopartiküllerin EPR etkisinin şematik gösterimi	6
Şekil 2.3	: Kemoterapi ilaçlarının hücre döngüsünün farklı fazlarına etkilerinin şematik gösterimi.	12
Şekil 2.4	: İlaç taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi.	16
Şekil 2.5	: pH'a Duyarlı kimyasal bağların ve bunların bozunma ürünlerinin örnekleri.	17
Şekil 2.6	: Kanser tedavisinde nanotaşıyıcı sistemlerin aktif hedefleme ve pasif hedeflemesinin şematik bir gösterimi	18
Şekil 2.7	: Polimerik nanotaşıyıcılar için kullanılan polimer türleri.	20
Şekil 2.8	: Polimerizasyon reaksiyonlarının sınıflandırılması.....	22
Şekil 2.9	: Kondenzasyon ve katılma polimerizasyonunun genel mekanizması... ..	24
Şekil 2.10	: Serbest radikal polimerizasyonunun genel mekanizması..	24
Şekil 2.11	: Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonu yoluyla elde edilen moleküler yapı örnekleri	26
Şekil 2.12	: Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonunun genel mekanizması.	26
Şekil 2.13	: Atom transfer radikal polimerizasyonunun genel mekanizması.....	28
Şekil 2.14	: Nitroksit aracılı polimerizasyonda kullanılan başlatıcılar.....	29
Şekil 2.15	: Nitroksit aracılı polimerizasyonun genel mekanizması.	29
Şekil 2.16	: RAFT ajanlarının genel yapısı.	30
Şekil 2.17	: Tersinir katılma-parçalanma zincir transfer polimerizasyonunun genel mekanizması.....	31
Şekil 2.18	: α -amino asit- <i>N</i> -karboksianhidritlerin (NCA) polimerizasyonunun genel gösterimi.	33
Şekil 2.19	: CuAAC klik reaksiyonu genel mekanizması.	34
Şekil 2.20	: Polisakkaritlerin yapıları. (I) Nişasta, (II) kitin, (III) selüloz, (IV) heparin, (V) hiyaluronik asit, (VI) kondroitin sülfat.....	35
Şekil 2.21	: Şeker bazlı polimerik taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi ve sınıflandırılması	36
Şekil 2.22	: Kanser teşhis ve tedavisinde kullanılan farklı teranostik nanopartiküllerin şematik gösterimi.....	40
Şekil 2.23	: A) Tümör bölgesinde PTT'yi artırmak için AuNP'lerin MMP ile indüklenen agregasyonunun şematik gösterimi. B) MoS ₂ /Fe@CPT-11-PEG-iRGD nanoplatformunun sentez süreci. C) İndosiyanın yeşili (ICG) yüklü ve kanser hücre zarı kaplı nanopartikülünün (ICNP) hazırlanmasının şematik gösterimi. D) Au@MSN-Cu/PEG/DSF nanoplatform sentezinin şematik gösterimi	44

Şekil 2.24	: A) Katyonik fotokafesli Si-UCNP'lerin sentez süreçleri ve parçacık yüzeyine siRNA adsorpsiyonunun ardından UCNP'lerden UV ışığı ile siRNA salımının şematik gösterimi. B) Azobenzenin NIR ile tetiklenen trans-cis fotoizomerizasyonunun ve bunu takiben UCNP-(CD/Azo)-siRNA/PEG nanopartiküllerinden siRNA salımının gösterimi. C) UCNP nanokapsüllerinin sentezinin ve folat reseptörü aracılı hücre alımının ve NIR kontrollü hücre içi siRNA iletimi ve tedavisinin şematik çizimleri. D) UCNP-cy-siRNA sentezinin şematik gösterimi. E) Amfifilik polimerin (MFAP) sentezine ve gen nanokapsüllerinin üretimine, gen iletiminin gerçek zamanlı lüminesans takibine ve transfeksiyon verimliliğinin izlenmesine yönelik şematik gösterim. 46
Şekil 4.1	: 1-Azido-3-amino propan sentezi..... 80
Şekil 4.2	: 1-Azido-3-amino propan bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃). 80
Şekil 4.3	: 3-Bromo-propanamin.HCl ve 1-azido-3-amino propan bileşiklerine ait FTIR spektrumu. 81
Şekil 4.4	: Di(Tiyobenzoil) disülfid sentezi. 81
Şekil 4.5	: Di(Tiyobenzoil) disülfid bileşiğinin ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃). 82
Şekil 4.6	: 4-Siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) sentezi 82
Şekil 4.7	: CPADB bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 83
Şekil 4.8	: Trimetilsilil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) RAFT ajanı sentezi. 83
Şekil 4.9	: TSA-CPADB bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 84
Şekil 4.10	: Trimetilsilil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) RAFT Ajanı ve öncü bileşiğine ait FTIR spektrumları. 84
Şekil 4.11	: <i>iprFr</i> ₁ MA monomerinin sentezi. 85
Şekil 4.12	: 1,2:4,5-di- <i>O</i> -İzopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₁) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu(CDCl ₃). 85
Şekil 4.13	: 3- <i>O</i> -Metakriloil-1,2:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₁ MA) monomerinin ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 86
Şekil 4.14	: 1- <i>O</i> -Metakriloil-2,3:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₂ MA) sentezi. 86
Şekil 4.15	: 2,3:4,5-di- <i>O</i> -İzopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₂) monomerinin ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 87
Şekil 4.16	: 1- <i>O</i> -Metakriloil-2,3:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₂ MA) monomerinin ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃)..... 87
Şekil 4.17	: A) 3- <i>O</i> -Metakriloil-1,2:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₁ MA) bileşiğinin ve öncülerinin, B) 1- <i>O</i> -metakriloil-2,3:4,5-di- <i>O</i> -izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (<i>iprFr</i> ₂ MA) bileşiğinin ve öncülerinin FTIR spektrumları..... 88
Şekil 4.18	: <i>N</i> -(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomerinin sentezi..... 88
Şekil 4.19	: <i>N</i> -(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomerinin ¹ H-NMR spektrumu (DMSO-d ₆)..... 89
Şekil 4.20	: <i>N</i> -(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomeri ve öncü bileşiğinin FTIR spektrumlarının karşılaştırması..... 89
Şekil 4.21	: 2-(Furan-2-il)-1,3-dioksolan sentezi (FurKet). 90

Şekil 4.22	: 2-(Furan-2-il)-1,3-dioksolan (FurKet) bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).	90
Şekil 4.23	: (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-3a,4,7,7a- tetrahidro- 4,7 epoksisobenzofuran-1,3-dion sentezi.....	90
Şekil 4.24	: (3aS, 4R, 7R, 7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-3a,4,7,7a-tetrahidro- 4,7 epoksisobenzofuran-1,3-dion bileşiğine ait ¹ H-NMR NMR spektrumu (CDCl ₃).	91
Şekil 4.25	: (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-2-(2-hidroksietil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoksisoindol-1,3(2H)-dion sentezi.....	91
Şekil 4.26	: (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-2-(2-hidroksietil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoksisoindol-1,3(2H)-dion bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).	91
Şekil 4.27	: 2-((3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il) etil metakrilat sentezi	92
Şekil 4.28	: 2-((3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etil metakrilat bileşiğine ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	92
Şekil 4.29	: MiMA Monomerinin ve öncü bileşikler FurKet, FurKetMi ve FurKetMiOH'a ait FTIR spektrumları.	93
Şekil 4.30	: <i>N</i> -(<i>ter</i> -Bütoksi karbonil)-L-lizin <i>N</i> -karboksianhidrit bileşiğinin sentezi.....	93
Şekil 4.31	: <i>N</i> -(<i>ter</i> -Bütoksi karbonil)-L-Lizin <i>N</i> -karboksianhidrit (<i>t</i> Boc-Liz-NCA) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).	94
Şekil 4.32	: <i>t</i> Boc-Liz ve <i>t</i> Boc-Liz-NCA'nın FTIR spektrumları.	94
Şekil 4.33	: ω-Azido fonksiyonlu <i>N</i> - <i>ter</i> -bütoksikarbonil-L-lizin polimerinin sentezi.....	95
Şekil 4.34	: P(<i>t</i> Boc-Liz)-N ₃ Polimerine ait A) DMF-GPC, B) FTIR ve C) ¹ H-NMR analizi sonucu.....	96
Şekil 4.35	: PMiMA Homopolimer sentezi.	96
Şekil 4.36	: Hazırlanan PMiMA homopolimerine ait ¹ H-NMR analizi sonucu..	97
Şekil 4.37	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA) Diblok polimer sentezi.	98
Şekil 4.38	: Hazırlanan P(MiMA- <i>b</i> -DopMA) diblok kopolimerine ait ¹ H-NMR analizi sonucu.....	98
Şekil 4.39	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₁ MA) Triblok polimer sentezi.	99
Şekil 4.40	: P(MiMA), P(MiMA- <i>b</i> -DopMA) ve P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₁ MA) Polimerlerine ait A) THF-GPC, B) FTIR analizleri ve C) P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₁ MA) polimerine ait ¹ H-NMR analizi sonucu.	100
Şekil 4.41	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₂ MA) Triblok polimer sentezi.	101
Şekil 4.42	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₂ MA) Polimerine ait A) THF-GPC, B) FTIR analizi ve C) ¹ H-NMR analizi.	101
Şekil 4.43	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₁ MA) Triblok polimerinin TBAF hidroliz reaksiyonu.	102
Şekil 4.44	: TBAF Hidroliz sonrası P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₁ MA) triblok polimerinin A) THF-GPC ve B) ¹ H-NMR analiz sonuçları.	102
Şekil 4.45	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₂ MA) Triblok polimerinin TBAF hidroliz reaksiyonu.	103
Şekil 4.46	: TBAF Hidroliz sonrası P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₂ MA) triblok polimerinin A) THF-GPC ve B) ¹ H-NMR analiz sonuçları.	103

Şekil 4.47	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin klik reaksiyonu ile sentezi.	104
Şekil 4.48	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz) Polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹ H-NMR analizi sonucu.	104
Şekil 4.49	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin klik reaksiyonu ile sentezi.	105
Şekil 4.50	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz) Polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹ H-NMR analizi sonucu.	105
Şekil 4.51	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin TFA hidrolizi.	106
Şekil 4.52	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz) Polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹ H-NMR analizi sonucu.	106
Şekil 4.53	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>ipr</i> Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin TFA hidrolizi.	107
Şekil 4.54	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz) Polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹ H-NMR analizi sonucu.	107
Şekil 4.55	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi.	108
Şekil 4.56	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz)/Dox Polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹ H-NMR analizi sonucu.	108
Şekil 4.57	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi.	109
Şekil 4.58	: P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz)/Dox Polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹ H-NMR analizi sonucu.	109
Şekil 4.59	: Büyük boyutlu Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerin DLS analizi sonuçları.	110
Şekil 4.60	: Küçük boyutlu Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin DLS analizi sonuçları.	110
Şekil 4.61	: Küçük boyutlu Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin TEM görüntüsü.	111
Şekil 4.62	: Suda dispers olan Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin DLS ve TEM analizleri.	111
Şekil 4.63	: NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺ (UCNP) Nanokristallerinin A) DLS ve B) TEM analiz sonuçları.	112
Şekil 4.64	: NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺ (UCNP) Nanokristallerinin TEM-EDX analiz sonuçları.	112
Şekil 4.65	: Başlangıçta yapılan UCNP sentez çalışmalarının TEM görüntüleri.	113
Şekil 4.66	: Sitrat kaplı UCNP (UCNP-C) nanokristallerinin A) DLS ve B) TEM analiz sonuçları.	114
Şekil 4.67	: A) UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox Nanopartiküllerinin DLS analizi. B) UCNP, UCNP-C, Fe ₃ O ₄ , P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un karşılaştırmalı FTIR analizi. C) UCNP@P-Dox ve D) UCNP@MP-Dox nanopartiküllerinin TEM görüntüsü.	115
Şekil 4.68	: A) UCNP-C, Fe ₃ O ₄ , P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un Zeta potansiyel analizi. B) UCNP, UCNP-C, P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un UCL analizi. C) UCNP, UCNP-C, Fe ₃ O ₄ , P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un TGA analizi. D) UCNP, Fe ₃ O ₄ ve UCNP@MP-Dox nanopartiküllerinin XRD analizi.	116
Şekil 4.69	: A) Farklı lazer yoğunluklarında ve B) farklı konsantrasyonlarda UCNP@MP-Dox çözeltisinin fototermal verimliliği. C) Lazer ışıması altında UCNP-C, Fe ₃ O ₄ , P-Dox, UCNP@MP-Dox ve suyun	

- fototermal verimliliği. **D)** Soğuma periyodundan elde edilen, θ' 'nin negatif doğal logaritması ile zaman (t) arasındaki doğrusal korelasyon. **E)** UCNP@MP-Dox'un UV-Vis-NIR spektrumu. **F)** Tekrarlanan lazer ışınımının beş döngüsü boyunca UCNP@MP-Dox'un fototermal kararlılık testi..... 119
- Şekil 4.70** : **A)** Fe₃O₄, UCNP@MP-Dox'un histerezis döngüsü ve UCNP@MP-Dox nanoprobalarının sulu dispersiyonunun manyetik ayrımını gösteren ek bir fotoğraf. **B)** Çeşitli demir konsantrasyonlarında UCNP@MP-Dox'un 1/T₂ değerlerinin grafiği 120
- Şekil 4.71** : **A)** P-Dox, **B)** UCNP@P-Dox ve **C)** UCNP@MP-Dox'un farklı pH tampon çözeltilerinde (pH 5.5, 6.8 ve 7.4), UV-Vis spektrofotometresi ile ölçülen Dox salım profili. **D)** UCNP@MP-Dox'un lazer ışınımı altında Dox salım profili. 121
- Şekil 4.72** : UCNP@P-Dox'un siRNA taşıma kapasitesi 122
- Şekil 4.73** : UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunun salım ölçümü. 123
- Şekil 4.74** : 3T3 hücrelerinin (**A-C**) ve MCF-7 hücrelerinin (**D-F**), UCNP, Polimer (P), P-Dox ve serbest Dox çözeltileri ile 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonrası relatif hücre canlılıkları. 125
- Şekil 4.75** : P-Dox, P-Dox/siRNA, UCNP@P-Dox, UCNP@P-Dox/siRNA, UCNP@MP-Dox ve UCNP@MP-Dox/siRNA ile 6 saatlik tedavi sonrasında, hem ışık uyarımı ile hem de ışık uyarımı olmadan, 24 saatlik inkübasyon sonrası 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığı 126
- Şekil 4.76** : UCNP@P-Dox, UCNP@P-Dox/siRNA, UCNP@MP-Dox ve UCNP@MP-Dox/siRNA ile 6 saatlik tedavi sonrasında, hem ışık uyarımı ile hem de ışık uyarımı olmadan, 48 saatlik inkübasyon sonrası 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığı. 127
- Şekil 4.77** : Akış sitometresi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ve zaman aralıklarında UCNP, Dox ve UCNP@P-Dox'un *in vitro* hücre alımı 128
- Şekil 4.78** : Kültür ortamında UCNP, UCNP@P-Dox ve Dox'un 3.9, 7.8 ve 15.6 µg/mL konsantrasyonlarıyla inkübe edilen 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin FL1-A akış sitometrisi histogramları. 128
- Şekil 4.79** : UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobaları ile 12 ve 24 saat tedaviden sonra hücre alım için floresan mikroskopisi ile 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin görselleştirilmesi..... 129
- Şekil 4.80** : **A)** UCNP ve **B)** Dox ile tedavi edilen 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin 12 saat ve 24 saat sonra hücre alım için floresan mikroskopisi ile görüntülenmesi. **C)** 12 ve 24 saat sonra Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedavi edilen 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin ortalama floresan yoğunluğu değerleri..... 130
- Şekil 4.81** : **A)** UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedaviden sonra canlı ve toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi. **B)** Sırasıyla farklı konsantrasyonlarda Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedavi edilen 3T3 ve MCF-7 hücrelerindeki bağıl mRNA ekspresyonu değişiklikleri..... 132
- Şekil 4.82** : 7.8 µg/mL konsantrasyonda UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedaviden sonra MCF-7 hücrelerinde bağıl mRNA ekspresyonu değişiklikleri..... 132

Şekil 4.83	: <i>In vivo</i> model oluşturulması ve tedavi grubunun takibi aşamalarına ait şematik görsel.....	133
Şekil 4.84	: Tümör oluşturulan pozitif kontrol grubundaki sakrifikasyon öncesi tümör boyutları	134
Şekil 4.85	: Tümör oluşturulan farelerin A) vücut ağırlıklarının ve B) tümör hacimlerinin değişim grafikleri.....	135
Şekil 4.86	: Tümör oluşturulan farelerdeki tümör dokusunun görüntüleri.....	136
Şekil 4.87	: Tümör taşıyan farelerde Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA enjeksiyonundan sonra; A) farklı zaman dilimlerinde alınan <i>in vivo</i> floresan görüntüleri ile ana organlar ve tümör dokularındaki dağılımı ve B) enjeksiyondan 24 saat sonra kaydedilen floresan sinyal yoğunluklarını gösteren grafik	137
Şekil 4.88	: Tümör taşıyan farelerde Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA enjeksiyonundan 24 saat sonra kaydedilen; A) <i>ex vivo</i> floresan görüntüleri ile ana organlar ve tümör dokularındaki dağılımı ve B) bunların floresan sinyal yoğunluklarını gösteren grafik.	137
Şekil 4.89	: Bcl-2 ve BAX İmmunoreaktivite skorunun dört grup arasındaki istatistiki değerleri	138
Şekil 4.90	: 24. günde farklı tedavi gruplarına ait MCF-7 tümör kesitlerinin H&E, PCNA, Bcl-2 ve Bax immünohistokimyasal boyama görüntüleri..	139
Şekil 4.91	: Tümör, Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA gruplarının ikili immunofloresan boyaması. Bcl-2 immunofloresan (FITC), BAX immunofloresan, çekirdek immunofloresan boyaması, Bcl-2, BAX ve çekirdek boyamalarının birleştirilmiş hali	140

GLİKOPOLİMER BAZLI TERANOSTİK NANOSİSTEMLERİN MEME KANSERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Tanı ve tedavi özelliklerini bir arada sunan teranostik nanopartiküller (TNP'ler), kişiselleştirilmiş tıp alanında büyük bir potansiyele sahiptir. Bu çalışmada, meme kanserini hedefleyen ve sinerjistik üçlü tedavi yaklaşımı sunan iki yenilikçi nanoprop geliştirildi. İlk olarak, sodyum itriyum florür (NaYF_4) çekirdeği üzerine iterbiyum ve erbiyum (Yb^{3+} , Er^{3+}) katkılı upconversion nanopartiküller sentezlendi. Bu nanopartiküller, biyoyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip doksorubisin (Dox) yüklü tetrablok kopolimer (P-Dox) ile kaplanarak UCNP@P-Dox adı verilen teranostik nanoprob oluşturuldu. Ardından, yapıya fototermal terapi özelliği kazandırmak için Fe_3O_4 nanopartikülleri ile modifiye edilerek UCNP@MP-Dox adlı, üçlü tedavi yapabilen bir nanoprob geliştirildi. Son olarak, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox nanoprobuları, anti-apoptotik Bcl-2 proteininin aşırı ekspresyonunu düzenlemek amacıyla anti-Bcl-2 siRNA ile yüklendi. Böylece, UCNP@P-Dox/siRNA ve UCNP@MP-Dox/siRNA teranostik nanoprobuları elde edildi. Bu teranostik nanoproblarda, tümör dokusunun asidik mikroçevresinde polimer ile Dox arasındaki asit duyarlı imin bağı sayesinde Dox salımının önemli ölçüde arttığı gözlemlendi. Ayrıca, UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobunu 980 nm yakın kızılötesi ışık (NIR) ile uyarıldığında, artan sıcaklıkla birlikte Dox salımının daha da arttığı tespit edildi. Dahası, Fe_3O_4 içeriği sayesinde UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobunu, UCNP'nin sağladığı upconversion lüminesans görüntüleme (UCL) özelliğine ek olarak manyetik rezonans görüntüleme (MRI) imkanı da sunmaktadır. Üçlü tedavi için tasarlanan UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobunu, ön değerlendirmeler sonucunda etkileyici bir fototermal etkinlik ve iyi bir MRI kontrast özelliği göstermektedir. Bunun yanı sıra, ikili tedavi için geliştirilen UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunu, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda antitümör etkinliği önemli ölçüde artırmaktadır. Tümör oluşturulan farelerde yapılan *in vivo* deneylerde, nanoprobun tümör bölgesinde biriktiği ve kombinasyon tedavisinin yalnızca Dox ve siRNA tedavilerine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, teranostik nanoprobun glikopeptid polimer aracılığıyla tümör hedefleme yeteneği sergilediği ve kemoterapi ile gen tedavisinin sinerjik etkisi sayesinde güçlü bir tedavi stratejisi sunduğu ortaya konulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kanser tedavisi, fototermal terapi, gen tedavisi, glikopeptid polimerler, upconversion nanopartiküller, teranostik nanoprobunlar.

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF GLYCOPOLYMER BASED THERANOSTIC NANOSYSTEM IN BREAST CANCER

SUMMARY

Theranostic nanoparticles (TNPs), which combine diagnostic and therapeutic capabilities, hold significant potential in the field of personalized medicine. In this study, two innovative nanoproboscopes were developed to target breast cancer and offer a synergistic triple-therapy approach. First, ytterbium and erbium (Yb^{3+} , Er^{3+})-doped upconversion nanoparticles were synthesized on a sodium yttrium fluoride (NaYF_4) core. These nanoparticles were coated with a biocompatible and biodegradable tetrablock copolymer loaded with doxorubicin (Dox), forming a theranostic nanoprobe termed UCNP@P-Dox. Subsequently, Fe_3O_4 nanoparticles were incorporated into the structure to confer photothermal therapy capabilities, resulting in a triple-therapy-enabled nanoprobe named UCNP@MP-Dox. Finally, both UCNP@P-Dox and UCNP@MP-Dox nanoproboscopes were loaded with anti-Bcl-2 siRNA to regulate the overexpression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein, producing theranostic nanoproboscopes designated as UCNP@P-Dox/siRNA and UCNP@MP-Dox/siRNA. In these theranostic nanoproboscopes, the acid-sensitive imine bond between the polymer and Dox facilitated a significantly enhanced release of Dox in the acidic tumor microenvironment. Furthermore, when the UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobe was irradiated with 980 nm near-infrared (NIR) light, the increased temperature further accelerated Dox release. Additionally, due to the inclusion of Fe_3O_4 , the UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobe offered magnetic resonance imaging (MRI) capabilities in addition to the upconversion luminescence imaging (UCL) provided by UCNPs. Designed for triple therapy, the UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobe demonstrated impressive photothermal efficacy and excellent MRI contrast in preliminary evaluations. Meanwhile, the UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobe, developed for dual therapy, significantly enhanced antitumor efficacy in both *in vitro* and *in vivo* studies. *In vivo* experiments conducted on tumor-bearing mice revealed that the nanoproboscopes accumulated in the tumor region, and the combination therapy was more effective than Dox or siRNA treatments alone. This study highlights the tumor-targeting capability of theranostic nanoproboscopes mediated by glycopeptide polymers and demonstrates their potential as a robust therapeutic strategy through the synergistic effects of chemotherapy and gene therapy.

Keywords: Cancer therapy, photothermal therapy, gene therapy, glycopeptide polymers, upconversion nanoparticles, theranostic nanoproboscopes.

1. GİRİŞ

Dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser türü meme kanseridir ve daha da önemlisi, yalnızca 2020 yılında 2,3 milyondan fazla yeni meme kanseri vakası teşhis edilmiş ve 685.000'den fazla ölüm meydana gelmiştir [1]. Hızla büyüyen bir tehdit haline gelen meme kanseri günümüzde, kemoterapi, immünoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleler gibi geleneksel tedavi yöntemleri kullanılarak tedavi edilmektedir. Paklitaksel (PTX) ve doksorubisin (Dox) gibi kemoterapötik ilaçlar, erken evre meme kanserinin tedavisinde cerrahi prosedürlerle birlikte kullanılmaktadır. Ancak kemoterapötiklerin sağlıklı dokulara zarar vermesi gibi istenmeyen etkileri, kalıcı kalp hasarı ve sinir hasarı gibi ciddi yan etkileri, tedaviye dirençli ve metastaz yapmış meme kanseri vakalarında geleneksel tedavi yöntemlerinin etkisiz kalması nedeniyle son yıllarda yeni hedeflenebilir ilaçlar ve ilaç taşıyıcı nanoplatformları araştırılmaya başlanmıştır.

Kanser tanısında sıklıkla X-ışını bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme (MRG), ultrason ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Her teknolojinin benzersiz avantajlarının yanında uygulama yönünden sınırlamaları da bulunmaktadır. Farklı görüntüleme teknolojilerinin kombinasyonlarıyla birden çok kaynaktan toplanan bilgiler, özellikle patofizyolojik süreçlerin anlaşılmasında, sonuç olarak daha doğru tanı ve yeni tedavi yaklaşımlarının tasarımlarına imkân sağlamaktadır. Bu özellikler ikili veya çok fonksiyonlu biyomedikal görüntüleme problemlerinin gelişmesine yol açmıştır, özellikle bir arada kullanılması en uygun yöntemler arasında floresans ve MRG teknikleri verilebilir. Teşhis ve tedavideki kısıtlamalar sebebiyle, son yıllarda hem tedavi hem de teşhis amacıyla kullanılan ve teranostik nanopartiküller olarak adlandırılan nanoplatformlar geliştirilmektedir. Bu nanoplatformlar multimodal görüntülemede kontrast madde olarak kullanılmak üzere geliştirilebilmektedirler. Teranostik

nanopartiküller sayesinde tümör hücresine spesifik hedefleme ile kişiye özel tedavi imkanı elde edilirken, eş zamanlı olarak hedeflenen tedavi etkinliğinin izlenmesi ve ilaç taşıyıcı sistemin lokasyonu hakkında bilgi sağlanması da mümkün olmaktadır. Teranostik nanopartiküller primer tümörlerin ve metastazların erken teşhis ve tedavisine olanak sağlar [2]. Teranostik nanopartiküller, upconversion nanopartiküller (UCNP), manyetik nanopartiküller [3], kuantum dotlar, altın nanopartiküller (AuNP), silika nanopartiküller ve karbon nanotüpler (CNT) ile birlikte hedeflenebilir ilaç dağıtım sistemleri kullanılarak formüle edilebilir.

Upconversion nanopartiküller son zamanlarda, ilgi çekici optik ve kimyasal özellikleri sayesinde görüntüleme, teşhis, optik görüntüleme kılavuzlu ilaç dağıtımı ve tedavideki uygulamaları nedeniyle biyotıp alanında büyük ilgi toplamıştır. Özellikle düşük toksisiteli, sentez ve modifikasyon kolaylığı, farklı büyüklüklerde sentezlenebilme ve çeşitli görüntüleme teknolojileri ile birleştirilebilme potansiyellerinden dolayı UCNP'ler teranostik uygulamalarda ön plana çıkmaktadır. Lantanit grubu toprak elementlerinden elde edilen inorganik nanopartiküller olan UCNP'ler, düşük enerjili yakın kızılötesi (NIR) ışığı emer ve UV'den görünür aralığa kadar yüksek enerjili fotonlar yayar. UCNP'ler terapötik uygulamalarının yanı sıra algılama ve tespit etme [4–6], kimyasal reaksiyonlara aracılık etme [7,8], optogenetik stimülasyon [9] ve şifreleme ve şifre çözme [10] alanlarında da araştırma konusudur.

Kemoterapinin yanı sıra UCNP'ler aynı zamanda fotodinamik terapi (FDT) ve fototermal terapi (FTT) gibi terapötik uygulamalarla birleştirilebilmektedir. Fototermal terapi, yakın kızılötesi (NIR) ışığı ısıya dönüştürmek için ışığa duyarlılaştırıcıların kullanımını içermektedir ve normal dokulara zarar vermeden tümör hücrelerinin etkili bir şekilde yok edilmesini sağlamaktadır. FTT yaklaşımı son derece seçicidir ve minimal invazivdir, çünkü terapötik etki fototermal ajanın tümör bölgesinde birikmesine ve yakın kızılötesi lazer ile odaklanmış ışınlanmaya dayanır; bu da tedavi hassasiyetini artırırken normal dokulara zararı en aza indirmektedir [11]. FTT için amaçlanan hipertermi sıcaklık aralığı 41,8 °C ila 45 °C arasındadır. Bu sıcaklık, kanser hücreleri üzerinde terapötik bir etki yaratırken, komşu sağlıklı dokulara minimum düzeyde zarar vermektedir. Ek olarak FTT, hem radyoterapinin hem de kemoterapinin terapötik etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir. Ancak 45 °C'yi aşan sıcaklıklar, enzimatik ve mitokondriyal fonksiyonları bozduğu için kanser hücrelerinin yanı sıra normal hücrelerde de nekroza neden olabilmektedir [12].

Bu çalışmanın amacı, NIR/pH'a duyarlı ilaç salımını, GLUT5 hedeflemeyi ve MRI/fotolüminesans çift modlu görüntüleme kılavuzlu kemo-gen-fototermal kombine terapisini gerçekleştiren çok işlevli, benzersiz teranostik nanoprobolar sentezlemek ve bu nanoproboların etkinliğini hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarla göstermektir. Bu amaçla tetrablok kopolimerin yapısı, (i) UCNP ve Fe₃O₄ nanopartiküllerini biyouyumlu hale getiren ve GLUT5 (fruktoz taşıyıcı) aracılığıyla meme kanseri hücrelerinin tanınmasında seçicilik sağlayan fruktoz birimlerini, (ii) Fe₃O₄ nanopartiküllerinin yüzeye bağlanmasını mümkün kılan dopamin birimlerini ve (iii) doksorubisinin pH'a duyarlı bir imin bağı ile yapıya bağlanacağı furan-maleimid birimlerini içermektedir. Ayrıca tetrablok polimerin yapısındaki (iv) polilisin blokları sayesinde yapıya anti-Bcl-2 siRNA yüklenerek kanser hücrelerinde anti-apoptotik direnç oluşturan Bcl-2 proteininin seviyesi düzenlenmektedir. Bu çok işlevli glikonanoproboları oluşturmak için UCNP'ler, P-Dox ile kaplanarak UCNP@P-Dox nanoprobolar elde edildi, Fe₃O₄ (M) eklenmesiyle ise UCNP@MP-Dox nanoprobolar sentezlendi. Son olarak, her iki yapı da siRNA ile yüklenerek UCNP@P-Dox/siRNA ve UCNP@MP-Dox/siRNA nanoproboları elde edildi. Bu tez kapsamında, çok işlevli glikonanoproboların sentezlenmesinin ardından, UCNP@MP-Dox/siRNA'nın fototermal ve MRI kontrast özellikleri incelenirken, Dox/siRNA'nın meme kanserine karşı sinerjik etkisini araştırmak amacıyla, UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunun *in vitro* ve *in vivo* prelinik çalışmaları gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

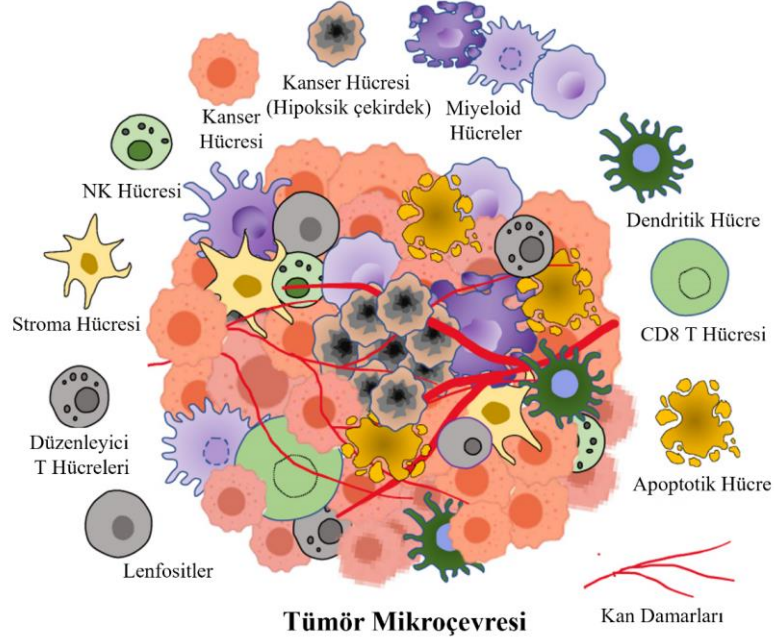
2.1 Kanser Biyolojisi; Tümör Mikroçevresi, EPR Etkisi ve Apoptoz

Kanser dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen karmaşık ve çok yönlü bir hastalıktır. Vücuttaki anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılmasıyla karakterizedir, bu durum tümör oluşumuna ve çevre dokuların istilasına yol açabilir. Kanser hücrelerinin temel özelliklerinden biri, hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen normal sinyal mekanizmalarından kaçabilme yetenekleridir [13]. Normal hücrelerde, hücre bölünmesinin zamanlaması ve frekansı, karmaşık sinyal yolları aracılığıyla sıkı bir şekilde düzenlenir, bu da hücrelerin kontrollü bir şekilde çoğalmasını sağlar. Ancak kanser hücreleri, bu sinyal yollarını düzenleyen genlerde mutasyonlar geliştirir, bu da var olan hücresel kontrol mekanizmalarını etkisiz hale getirir ve hücrelerin kontrolsüz bir şekilde proliferasyonuna neden olur [14,15]. Kanser hücreleri bölünmeye ve büyümeye devam ettikçe yakındaki doku ve organları istila edebilir ve kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. Bu sürece metastaz denir ve vücudun diğer bölgelerinde ikincil tümörlerin oluşmasına yol açabilir [16]. Kanser hücrelerinde en yaygın görülen mutasyonlardan biri, hücre bölünmesini baskılayan tümör baskılayıcı genlerde meydana gelir. Bu genlerdeki mutasyonlar, normalde hücre bölünmesini durduran mekanizmaların devre dışı kalmasına neden olur, böylece hücreler kontrolsüz bir şekilde bölünmeye ve çoğalmaya başlar. DNA onarım süreçlerinde görevli, tümör baskılayıcı BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki kalıtsal mutasyonlar, meme ve yumurtalık kanseri oluşma riskiyle ilişkilendirilirken [17], benzer şekilde, DNA onarımı ve hücre döngüsü düzenlemesinde rol oynayan TP53 genindeki mutasyonlar, meme, kolon ve akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin gelişme riskini artırabilir [18]. Onkogenler gibi hücre büyümesini düzenleyen diğer genlerde meydana gelen

3mutasyonlar da kanser gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunabilir [19,20]. Bu mutasyonlar, genetik yatkınlık nedeniyle ortaya çıkabileceği gibi, çeşitli çevresel faktörlere maruz kalma sonucu da gelişebilir.

Kanserin gelişimi ve ilerlemesi genetik faktörlerin yanı sıra çevresel maruziyetler, diyet, egzersiz ve alkol tüketimi gibi yaşam tarzı etmenleri ve mevcut tıbbi durumlar gibi çeşitli dış faktörlerden etkilenir [21]. Tütün kullanımı, hava ve su kirliliği, belirli virüs ve bakterilere, radyasyona ve bazı kimyasal maddelere maruz kalma kanser riskini artırabilir. Kanser gelişimini etkileyen önemli dış faktörlerden biri de bağışıklık sistemidir. Bağışıklık sistemi, kanser hücrelerinden gelen ve yabancı antijenleri tanıyan bir sistem olarak, kanser hücrelerini hedef alıp yok etme işlevi görür. Aynı zamanda, adaptif bağışıklık yanıtları aracılığıyla immünolojik bellek geliştirerek, konak organizmanın yaralanma veya saldırı durumlarına karşı gelecekteki savunma mekanizmalarını güçlendirir [22,23].

Kanserli hücreler, normal hücrelerden bağımsız büyüme sinyalleri üretme, büyüme karşıtı sinyalleri göz ardı etme ve apoptoz sinyallerine duyarsız olma gibi özellikleriyle ayrılırken, aynı zamanda morfolojik özelliklerinde de belirgin farklılıklar gösterirler. Morfolojik olarak kanserli hücre, düzensiz boyut ve şekle sahip büyük bir çekirdek ile karakterize edilir, nükleoller çok sayıda ve belirgin, sitoplazma ise az hacimli ve yoğun renklidir veya tam tersine soluktur [24]. Kanser dokusu, yalnızca kanser hücrelerinden oluşan bir yapı değildir; aksine, stromal fibroblastlar, endotelial hücreler ve bağışıklık hücreleri gibi stromal hücreleri ve ekstraselüler matriksin hücresel olmayan bileşenlerinden oluşan heterojen bir topluluğudur (Şekil 2.1) [25]. Tümör hücreleri, tümörün büyümesini ve ilerlemesini desteklemek amacıyla, buldukları dokularda önemli moleküler, hücresel ve fiziksel değişiklikler oluşturur. Ortaya çıkan tümör mikroçevresi, karmaşık ve sürekli gelişen bir yapıdır [26]. Tümör büyümesinin erken evrelerinde, kanser hücreleri ile tümör mikroçevresinin bileşenleri arasında, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, lokal invazyonu ve metastatik yayılımı destekleyen dinamik ve karşılıklı bir ilişki gelişir. Hipoksik ve asidik bir mikroçevrenin üstesinden gelebilmek için, tümör mikroçevresi oksijen ve besin tedarikini yeniden sağlamak ve metabolik atıkları uzaklaştırmak amacıyla anjiyogenezi (yeni damar oluşumu) uyarır [27,28].

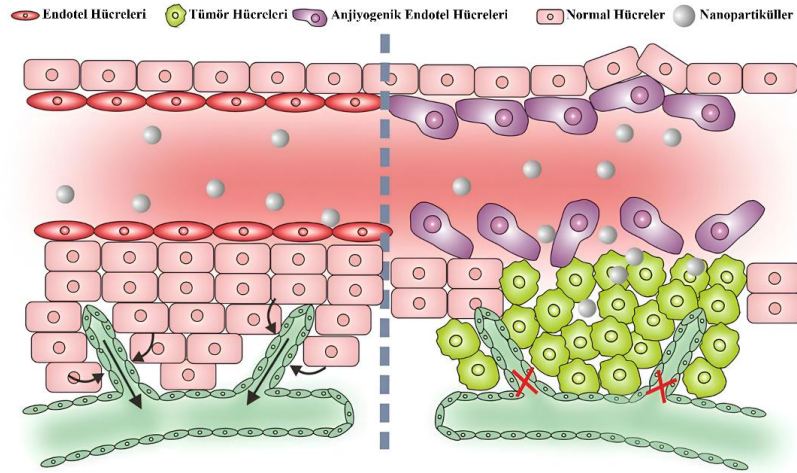


Şekil 2.1 : Tümör mikroçevresinin şematik gösterimi [25].

Tümör büyümesi ve metastazı, hızlı büyüme aşamasında tümör hücrelerinden gelen kimyasal sinyallerle tetiklenen anjiyogenez ve lenfanjiyogeneze bağlıdır [29]. Muthukkaruppan ve arkadaşları (1982) [30], aynı organın iki farklı bölgesine, kan dolaşımının bulunduğu ve bulunmadığı alanlara, aşıl原因 kanser hücrelerinin davranışlarını karşılaştırmışlardır. Kan dolaşımının olmadığı bölgede bulunan kanser hücreleri 1-2 mm³ büyüklüğe ulaştıktan sonra büyümeleri dururken, anjiyogenezin geliştiği alana yerleştirilen kanser hücreleri 2 mm³'ün üzerine çıkmıştır. Vasküler desteğin yokluğunda, tümörler nekrotik hatta apoptotik hale gelebilir [31]. Bu nedenle anjiyogenez kanserin ilerlemesinde önemli bir faktördür.

Tümör dokusunun aşırı geçirgen damar yapısı ve bozulmuş lenfatik drenajı nedeniyle, nano boyutlu ilaçların tümör dokularında normal dokulara göre daha fazla biriktiği ve daha uzun süre tutulduğu varsayılmaktadır (Şekil 2.2) [32,33]. Bu patofizyolojik fenomen ilk kez Maeda ve arkadaşları tarafından (1986), artırılmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmada antitümör protein olan neokarzinostatin ile poli(stiren-ko-maleik asit) polimeri (SMANCS) konjuge edilmiş ve protein-polimer konjugatının çeşitli moleküler boyutlarda (12 kDa-160 kDa) tümör dokusunda akümüasyonu araştırılmıştır. Nano boyutlu ilaçların tümör bölgesinde birikmesine yol açan faktörler, bu bölgede artan damarlanma, oluşan damarların yapısal bozuklukları, endotelial hücreler arasında geniş boşlukların

bulunması ve nano boyutlu ilaçları bu bölgeden uzaklaştıracak lenfatik sistemin yetersizliği olarak belirtilmiştir [34].



Şekil 2.2 : Tümör ortamında nanopartiküllerin EPR etkisinin şematik gösterimi [32,33].

Nanoparçacıkların tümör bölgesinde normal dokulara göre daha fazla birikmesini sağlayan EPR etkisi, bu parçacıkların boyutu, bileşimi, şekli, yüzey yükü ve parçalanabilirliği gibi çeşitli fizyokimyasal özelliklerden etkilenir. Nano boyutlu partiküller intravenöz olarak uygulandığında, böbrek tarafından atılacak kadar küçük veya retiküloendotelial sistem (RES) tarafından hızla tanınıp tutulacak kadar büyük değilse, uzun bir süre dolaşımında kalma eğilimindedir [35]. Mononükleer fagosit sistemi olarak da bilinen bu sistem, yabancı partiküllerin dokulardan ve kan dolaşımından temizlenmesinde kritik rol oynayan heterojen bir fagositik hücre popülasyonuna sahiptir. RES, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve granülositlerden oluşur [36,37]. Terapötik amaçla kullanılan nanopartiküllerin uzun süre kan dolaşımında kalabilmesi ve RES hücreleri tarafından tanınarak fagositoz yoluyla temizlenmelerini önleyip tümör bölgesine ulaşmalarını sağlamak için çeşitli yüzey modifikasyonları uygulanabilmektedir [38,39]. PEGilasyon [40,41], bu yöntemler arasında en bilinen ve en sık kullanılanı olmakla birlikte, dekstran [42,43], polisakkaritler (kitosan, hyaluronik asit) [44–46] ve albümin [47,48] gibi moleküller de organik ve inorganik moleküllerin biyoyumluluğunu artırarak RES tarafından tanınmalarını engellemek amacıyla tercih edilmektedir. Yüzey modifikasyonları, nanopartiküllerin tümöre nüfuz etmesini engelleyen biyolojik bariyerleri aşmak ve EPR etkisini artırmak için etkili bir strateji olarak işlev görür.

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, çok hücreli organizmalarda gelişim, homeostaz ve hastalık süreçlerinde kritik rol oynayan temel bir mekanizmadır. Apoptoz, kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi belirgin morfolojik değişikliklerle karakterize edilen bir hücre ölüm biçimidir. Bu süreç, DNA hasarı, oksidatif stres ve viral ya da bakteriyel enfeksiyonlar gibi çeşitli koşullara yanıt olarak gerçekleşir [49,50]. Apoptozun düzenlenmesi, sinyal yolları ve moleküler etkileşimlerden oluşan karmaşık bir süreçtir. Apoptoza sebep olan iki farklı sinyalleşme yolu bulunmaktadır: intrinsik ve ekstrinsik yollar. Bu yollar sırasıyla mitokondriyal ve ölüm reseptörü yolları olarak da bilinir. İntraselüler (hücre içi) sinyaller arasında DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği ve sitokin eksikliği bulunurken, en yaygın ekstraselüler (hücre dışı) sinyaller, bağışıklık sistemindeki sitotoksik T hücreleri tarafından hasar görmüş veya enfekte olmuş hücrelere yanıt olarak üretilen ölüm indükleyici sinyallerdir [51,52]. Apoptoz sinyali verildiğinde, hücre içinde bir dizi değişiklik meydana gelir. Bu değişiklikler, hücre iskeleti ve nükleer proteinler gibi normal hücre fonksiyon için gerekli hücre bileşenleri parçalayan kaspazların aktivasyonunu içerir. Kaspazların etkisiyle, apoptotik hücreler küçülmeye başlar ve makrofaj yanıtına sebep olan hücre zarı değişiklikleri meydana gelir [53].

Apoptoz yolları son derece sıkı bir şekilde düzenlenmektedir, bu nedenle apoptoz yalnızca sinyal verildiğinde gerçekleşir. İntrinsik yol, B-hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesi tarafından kontrol edilir. Bcl-2 ailesi, hem proapoptotik hem de antiapoptotik üyelerden oluşur. Antiapoptotik Bcl-2 proteinleri, proapoptotik Bcl-2 proteinleri olan BAX ve BAK proteinlerini inhibe ederek apoptozu engeller. BH3-proteinleri ise antiapoptotik Bcl-2 proteinlerini inhibe eder [54,55]. Bcl-2 ailesine ek olarak, kaspaz aktivitesini inhibe eden IAP protein ailesi ve DNA hasarına yanıt olarak apoptozu teşvik edebilen P53 tümör baskılayıcı dahil olmak üzere apoptozu düzenleyen çok sayıda başka protein tanımlanmıştır [56]. Genellikle, kanserlerde inhibe edilen yol intrinsik yoldur; ancak apoptozu engellemenin birçok farklı mekanizması vardır. Apoptotik kontrolün kaybı, kanser hücrelerinin daha uzun süre yaşamasına ve bu süre zarfında genetik mutasyonların birikmesine olanak tanır. Bu mutasyonlar, tümör ilerlemesi sürecinde hücrelerin invazivliğini artırabilir, anjiyogenezi teşvik edebilir, hücre proliferasyonunu düzensizleştirebilir ve hücrelerin normal farklılaşma süreçlerini bozabilir [57,58]. Bu durum, tümör oluşumunun yanı

sıra sıklıkla kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek etki gösteren kemoterapi ve radyasyon terapilerine karşı direnç gelişimiyle sonuçlanabilir.

2.2 Meme Kanseri; Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Meme kanseri, anormal meme hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak tümör oluşturduğu, moleküler düzeyde heterojen bir hastalıktır [59]. Dünya genelinde akciğer kanserinden (~2,5 milyon) sonra en sık görülen kanser türü olup, kadınlar arasında en yaygın kanserdir. 2022 yılında yaklaşık 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası teşhis edilmiş ve 660.000'den fazla ölüm gerçekleşmiştir. Meme kanseri ve akciğer kanseri (1,8 milyon) sırasıyla kadınlarda ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmuştur [60].

Meme kanseri etiyojisi, bu hastalığın gelişimine katkıda bulunan genetik, çevresel, beslenme, hormonal ve kalıtsal unsurlar tarafından belirlenir. Risk faktörleri arasında önceden meme kanseri öyküsü, pozitif aile öyküsü, obezite, uzun boy, sigara içme [61], alkol tüketimi [62], erken menarş [63], geç menopoz [64], hareketsiz yaşam tarzı [65], nulliparite ve hormon replasman tedavisi [66] yer alır. Meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkili faktörler arasında ise çoklu doğum, emzirme öyküsü [67], fiziksel aktivite, kilo kaybı ve profilaktik cerrahi ve tıbbi müdahaleler yer alır. Risk yaş ilerledikçe artar; meme kanseri hastalarının yaklaşık %80'i 50 yaşın üzerindedir. Meme kanserinin etiyojisinin analiz edilmesi, daha iyi tarama ve tedavi müdahalelerinin geliştirilmesine olanak sağlar.

Meme kanseri tanısı, ele gelen kitle veya ağrı gibi semptomların takibiyle, aynı zamanda görüntüleme teknikleriyle konulabilmektedir. Görüntüleme teknikleri tanı koymanın yanı sıra tedaviye yanıtın takibi için de sıklıkla kullanılmaktadır. Mamografi, meme kanserinin tespitinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir ve X-ışını ile görüntüleme sağlar. Yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü, düşük maliyeti ve iyi tolere edilebilirliği gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak, mamografinin ağrı ve kaygı, yanlış pozitif sonuçlar ve radyasyon riskleri gibi bazı sınırlamaları da bulunmaktadır [68]. Ultrason, meme kanserinin teşhisi ve tedaviye yanıtın izlenmesinde bir diğer önemli görüntüleme tekniği olarak öne çıkmaktadır. İyonlaştırıcı radyasyon kullanmaması ve yüksek duyarlılığı gibi avantajları sayesinde, özellikle genç kadınlar, hamile ve emziren kadınlar arasında meme tümörlerinin tespiti için etkili bir tanı aracı olarak kullanılmaktadır [69,70]. MRG (manyetik rezonans

görüntüleme), meme kanseri için diğer önemli tanı araçlarından biri olarak kabul edilmektedir. Bu teknik, tedaviye yanıtın izlenmesi, yüksek riskli hastaların takibi, meme kanseri metastazının değerlendirilmesi ve tümör nüksünün incelenmesi dahil olmak üzere meme kanseri tedavisinin çeşitli alanlarında kullanılabilir. MRG tarafından sağlanan, meme kanserinin evrelemesi, mikro-kalsifikasyonların değerlendirilmesi, premalign lezyonlar gibi veriler, klinik karar verme süreçlerinde değerli bir rehberlik sağlayabilir [71,72]. PET (pozitron emisyon tomografisi) ve SPECT (tek foton emisyon tomografisi) , meme kanseri tanısında kullanılabilecek diğer görüntüleme teknikleridir. PET tekniği, pozitron yayılımı yapan radyoizotopları (örneğin, ^{18}F , ^{15}O , ^{13}N ve ^{11}C) kullanırken, SPECT tekniği gama ışınları yayılımı yapan izotopları (örneğin, Teknesyum-99m, İyot-131) kullanır [73]. PET ve SPECT görüntüleme teknikleri, düşük çözünürlükleri ve detay eksikliklerine rağmen, BT (bilgisayarlı tomografi) ve MRI gibi geleneksel görüntüleme yöntemleriyle tespit edilebilen anatomik değişikliklerden önce hastalıkla ilişkili biyokimyasal ve fizyolojik anormallikleri yüksek duyarlılıkla tespit edebilme yetenekleri nedeniyle tercih edilmektedir. Bunlarla birlikte, görüntüleme yöntemlerinin her birinin sınırlamalarını aşmak ve güçlü yönlerini en üst düzeye çıkarmak amacıyla çok modelli (hibrit) görüntüleme teknikleri geliştirilmiştir. PET/BT, SPECT/BT ve PET/MR gibi çok modelli (hibrit) görüntüleme yöntemleri, fizyolojik süreçlerin anatomik lokalizasyonunu sağlayarak tümör yapısının detaylı bir şekilde görselleştirilmesini mümkün kılar [74].

Meme kanserinin yaygın olarak kabul edilen sınıflandırması, hormon reseptörlerinin immünohistokimyasal ekspresyonuna göre dörde ayrılır: östrojen reseptörü pozitif (ER+), progesteron reseptörü pozitif (PR+), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü pozitif (HER2+) ve bu reseptörlerin hiçbirinin ekspresyon göstermediği üçlü negatif (TNBC) [75]. İnvaziv meme kanserlerinin %70-75'i yüksek ER ekspresyonu ile karakterize edilir ve ER, önemli bir tanısal belirleyicidir. PR, genellikle ER pozitif hastalarda eksprese edilir ve ER tarafından düzenlenir, bu nedenle PR değerleri işlevsel ER yolu hakkında bilgi verir. Hem ER hem de PR, tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak önem taşır; yüksek PR seviyeleri daha iyi sağkalım ile ilişkilendirilirken, düşük seviyeler daha agresif bir hastalık seyrine işaret eder [76–78]. HER2, meme kanserlerinin %20-30'undan sorumludur ve serum HER2 düzeyleri, tümör varlığı veya nüksünün tespitinde belirteç olarak kabul edilir. HER2'nin aşırı

ekspresyonu, proto-onkojenik sinyal yollarının aşırı aktivasyonuna yol açarak kontrolsüz kanser hücresi büyümesine neden olur ve bu durum HER2+ vakalarını daha kötü klinik sonuçlarla ilişkilendirilir [79,80].

Görüntüleme yöntemleriyle birlikte çeşitli biyobelirteçlerin kullanılması, meme kanseri tanı ve tedavi takibinde önemli bir yaklaşım sağlar. Uygun biyobelirteçler, meme kanseri patogeneğinde yer alan hücrel ve moleküler yolların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir. Bu bulgular, meme kanserine karşı etkili terapötik yaklaşımın tasarlanmasında ve tedaviye yanıtın izlenmesinde önemli bir rol oynar [81]. Birçok çalışma, proteinler (örn., HER2, ER ve Ki67), mRNA'lar (örn., ER α , ER β ve ERR γ), enzimler (örn., CEA ve TSGF) ve miRNA'lar (örn., miR21, miR10b, miR155 ve miR145) dahil olmak üzere çeşitli biyobelirteçlerin meme kanseri hastalarının tespiti ve takibi için tanısall biyobelirteç olarak kullanılabilceğini göstermiştir [82].

Tanı konulduktan sonra tedavide asıl amaç hastalığın kontrol altına alınmasıdır. Metastatik olmayan, erken evre meme kanseri için amaç, sağkalımı iyileştirmek, uzak metastaz veya lokal nüks riskini en aza indirmek, semptomların hafifletilmesini sağlamak ve mümkünse eski yaşam kalitesine geri dönmektir. İleri evre, metastatik meme kanseri için ise amaç, semptomları hafifletmek, yaşam süresini uzatmaktır [83,84].

Günümüzde meme kanserinin tedavisi, cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi, hormon tedavisi ve immünoterapinin birlikte kullanıldığı çok yönlü bir stratejiyi içerir. Tedavi planı, kanserin evresi, tümörün boyutu ve konumu, metastaz durumu ve hormon reseptörlerinin pozitifliği gibi faktörlere bağlı olarak belirlenir.

Meme cerrahisinde en yaygın yaklaşımlar, memenin tamamen çıkarılması (mastektomi) sonrasında genellikle meme rekonstrüksiyonu veya meme koruyucu cerrahi (lumpektomi) uygulanmasıdır. Lumpektomi, tümörün etrafındaki sağlıklı doku ile birlikte meme tümörünün çıkarılmasını hedefler [85]. Cerrahiden önce tümör kitlesini küçültmek amacıyla neoadjuvan tedavi, cerrahiden sonra ise tam iyileşmeyi sağlamak ve metastaz riskini en aza indirmek amacıyla adjuvan tedavi uygulamaları tercih edilmektedir [86]. Ayrıca cerrahi işlem sırasında fark edilemeyen kanser hücreleri radyasyonla yok edilerek, kanserin tekrarlama riski azaltılabilir [87]. Yapılan araştırmalar, lumpektominin radyoterapi ile birlikte uygulanmasının, mastektomi ile

karşılaştırıldığında genel sağkalım açısından eşdeğer olduğunu ortaya koymaktadır [88]. Bunun yanı sıra, meme kanserinin koltuk altı lenf bezlerine yayılıp yayılmadığını değerlendirmek ve bu lenf bezlerini cerrahi olarak çıkarmak (koltuk altı lenf bezi diseksiyonu) gibi ek cerrahi müdahaleler de yaygın olarak uygulanmaktadır.

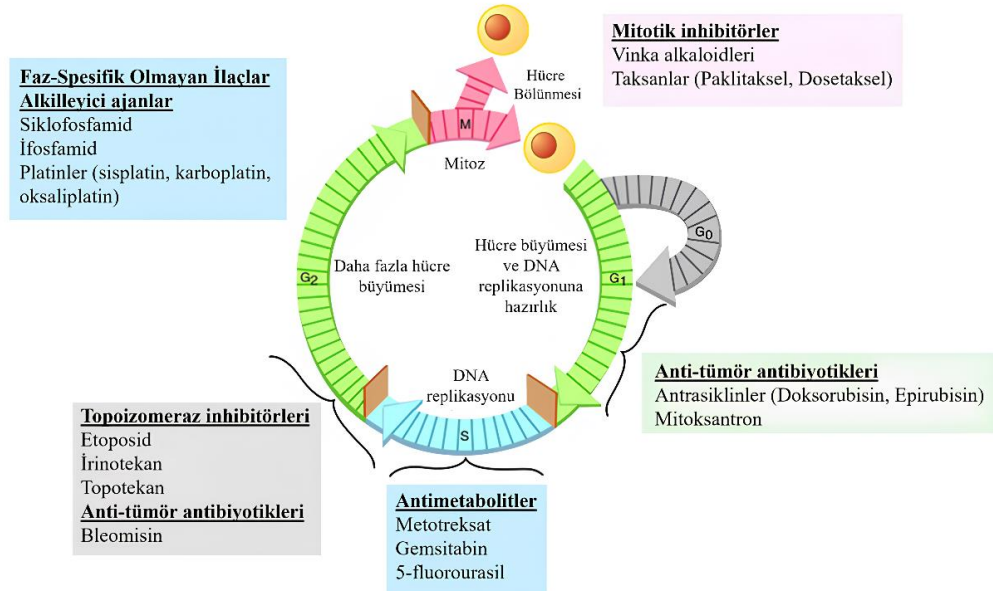
Radyoterapi, kanser hücrelerini yok etmek amacıyla, yüksek enerjili ışınların doğrudan memenin tamamına veya bir kısmına (meme koruyucu cerrahi sonrası), göğüs duvarına (mastektomi sonrası) ve bölgesel lenf düğümlerine uygulanmasıyla gerçekleştirilen bir tedavi yöntemidir [89]. Bu yöntem, meme koruyucu cerrahiden sonra kanserin aynı memede veya yakındaki lenf düğümlerinde tekrar etme olasılığını azaltmak için, mastektomi sonrası, özellikle tümörler 5 cm'den büyükse ve çok sayıda lenf düğümüne yayılmışsa ya da kanser kemikler, omurilik veya beyin gibi diğer vücut bölgelerine yayılmışsa, diğer tedavilere ek olarak tercih edilebilir. Ancak, meme kanseri radyoterapisi, göğüs kafesindeki normal dokuların, kalp de dahil olmak üzere, bir miktar radyasyona maruz kalmasına neden olabilir. Bu durum, cilt problemleri, telenjiektazi, yorgunluk, ağrı, lenfödem, kardiyotoksisite, akciğer dokusunun reaksiyonuna bağlı semptomatik radyasyon pnömonisi, brakial pleksopati ve ikincil kanserler gibi yan etkilere yol açabilir [90,91]. Modern radyoterapi uygulamaları, yüksek enerjili kaynaklar kullanılarak, daha düşük günlük dozlar (veya daha küçük fraksiyonlar) ve normal dokuların maruziyetini sınırlayan alan düzenlemeleri ile gerçekleştirildiğinde, toksik etki oranlarını önemli ölçüde azaltabilmektedir [92].

Erken evre meme kanseri tedavisinde cerrahi işlem temel tedavi yöntemi olarak tercih edilirken, metastatik meme kanseri tedavisinde, kan dolaşımı yoluyla dağıtım kanser bölgelerine erişimi kolaylaştırdığından sistemik tedavi temel tedavi yöntemi olarak tercih edilmektedir. Sistemik tedaviler arasında kemoterapi, hormon tedavisi ve immünoterapi yer alır.

Sitotoksik kemoterapi ajanları, hücre döngüsünün çeşitli aşamalarını hedef alarak bozar ve böylece kanser hücrelerinin çoğalmasını engeller. Kanser hücreleri apoptoz sinyallerine duyarsız hale gelerek hücre ölümünden kaçınır ve bu sayede normal hücrelere kıyasla daha iyi bir hayatta kalma yeteneği kazanır. Ayrıca proto-onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar, normal hücre döngüsü kontrollerinin kaybolmasına neden olur ve hücre bölünmesini teşvik eder. Hücre döngüsü, dört temel aşamadan oluşur: mitoz, G1 fazı, sentez fazı (S-fazı) ve G2 fazı [93]. Sitotoksik ilaçların toksisitesi en çok hücre döngüsünün DNA sentez

fazı olan S fazında belirgindir. Kemoterapötik ilaçlar, DNA, RNA veya protein sentezine müdahale ederek veya önceden oluşturulmuş moleküllerin çalışmasını bozarak kanser hücrelerinin makromoleküler sentezini ve fonksiyonunu etkiler. Makromoleküler sentez veya işlevdeki bu bozulma yeterli olduğunda, kemoterapötik ajanın doğrudan etkisiyle veya apoptozu tetikleyerek hücre ölümüne yol açar. Ancak kemoterapötik ajanlar, hem kanserli hücrelerde hem de sağlıklı hücrelerde DNA ve protein ekspresyonunu hedef aldığından, bu ilaçların terapötik indeksi oldukça dardır ve toksisiteye neden olma potansiyeli yüksektir. Ayrıca, kemoterapi ilaçları genellikle hızla çoğalan hücrelere karşı etkili oldukları için, kemik iliği, gastrointestinal sistem ve saç folikülleri gibi hızlı bölünen hücreler üzerinde belirgin etkilere sahiptirler. Bu tür ajanlarla ilişkili yaygın toksisiteler arasında mielosüpresyon, mukozit, bulantı, kusma, ishal, alopesi, yorgunluk, kısırlık ve infüzyon reaksiyonları yer alır. Ayrıca bağışıklık sisteminin baskılanması nedeniyle enfeksiyon riski de artmaktadır [94–96].

Kemoterapötik ilaçlar, hücre döngüsündeki etkileri (Şekil 2.3) ve biyokimyasal yapılarına (Tablo 2.1) göre sınıflandırılırlar. Hücre döngüsü spesifikliklerine göre ilaçların sınıflandırılması, bu ajanların maksimum etki göstermesi için tedavi planlarının optimize edilmesinde ve ilaç kombinasyonlarının belirlenmesinde kritik bir rol oynar [93].



Şekil 2.3 : Kemoterapi ilaçlarının hücre döngüsünün farklı fazlarına etkilerinin şematik gösterimi [93].

Tablo 2.1 : Kemoterapötik ilaçların biyokimyasal sınıflandırması [93].

İlaç Sınıfı	Etki Mekanizması	İlaç Örnekleri
Alkilleyici ajanlar	DNA, RNA ve önemli proteinlerle kovalent bağlar oluşturarak hücre fonksiyonunu bozar.	Platinler (sisplatin, karboplatin, oksaliplatin) Oksazofosforinler (siklofosfamid, ifosfamid)
Anti-metabolitler	DNA ve RNA sentezinde yer alan, doğal olarak oluşan metabolitlerin yapısal analogları. Normalde DNA ya da RNA'ya katılan bir metabolitin yerine geçerler veya anahtar enzimin katalitik bölgesi için rekabet ederler.	Pirimidin analogları (gemsitabin, 5-florourasil, kapesitabin) Anti-folatlar (metotreksat, raltitreksed)
Anti-tümör antibiyotikleri	DNA baz çiftleri arasına girerek normal yapıyı bozar ve DNA replikasyonu ve transkripsiyonuna müdahale ederek etki gösterir. Ayrıca, DNA'nın bütünlüğünün korunmasında görevli	Antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin), mitoksantron, bleomisin
Topoizomeraz inhibitörleri	Topoizomerazlar, DNA'nın 3 boyutlu yapısını kontrol eden enzimlerdir. Topoizomeraz I ve topoizomeraz II, replikasyon sırasında DNA'nın açılmasından sorumludurlar.	Topoizomeraz I inhibitörleri (irinotekan, topotekan) Topoizomeraz II inhibitörleri (etoposid)
Anti-mikrotübül ilaçlar (Mitotik inhibitör)	Tübülün proteinine bağlanarak, hücre şekli, hücre içi taşıma ve hücre bölünmesi (mitoz) için önemli olan mikrotübül oluşumunu engeller.	Vinka alkaloidleri (vinkristin, vinorelbin) Taksanlar (paklitaksel, dosetaksel)

Kombinasyon kemoterapi, düşük dozlarda daha yüksek etkinlik, azalmış toksisite ve ilaç direncinin azalması gibi avantajlar sağlar [97]. Prospektif bir klinik çalışmada test edilen ilk kombinasyon adjuvan kemoterapi rejimi siklofosfamid, metotreksat ve 5-florourasil (5-FU) (CMF rejimi) içermekteydi [98]. Ardından doksorubisin içeren kemoterapi kombinasyonları da klinik denemelerde test edilmiştir. Doksorubisini değerlendiren ilk denemelerden biri, tamoksifene yanıt vermeyen 697 hastada melfelan ve 5-FU ile doksorubisinli veya doksorubisinsiz tedavileri değerlendiren NSABP B-11 çalışmasıdır. Bu çalışmada, doksorubisin içeren tedavi grubunda 5 yıllık nüksüz sağkalım ve genel sağkalımda iyileşmeler gözlenmiştir [99]. Diğer kemoterapi kombinasyonlarında kullanılan ilaç kombinasyonları şunlardır: 5-FU, doksorubisin ve siklofosfamid [100]; 5-FU, epirubisin ve siklofosfamid [101,102];

sisplatin, doksorubisin ve siklofosamid [103], sispaltin, 5-FU ve etoposid [104], doksorubisin, sispaltin ve vinkristin [105], sispaltin ve epirubisin [106]. Taksanlar, 1990'larda meme kanseri tedavisinde tanıtılan ve kemoterapi kombinasyonlarında yaygın olarak kullanılan etkili sitotoksik ajanlardır [107]. Birçok araştırmacı tarafından, paklitaksel'in doksorubisin ile kombinasyonu metastatik meme kanseri tedavisindeki etkileri açısından değerlendirilmiştir [108,109]. Ancak paklitaksel ve doksorubisinin eş zamanlı uygulanması, güçlü bir tedavi yanıtı sağlamasına rağmen, doksorubisin maruziyetini artıran farmakokinetik etkileşim nedeniyle kardiyotoksisite riskini yükselterek kullanımını sınırlamıştır [110]. Meme kanserinin adjuvan tedavisinde terapötik kombinasyonlar, yalnızca kemoterapötik ajanlardan oluşan kombinasyonlar (yani en az iki kemoterapötik ajan) olabileceği gibi kemoterapötik ajanların hormon tedavisi veya immnoterapilerle kombinasyonları şeklinde de olabilir. Kemoterapi rejiminin seçimi, hastalığa özü faktörler, örneğin nüks riski ve kemoterapiden beklenen mutlak ve göreceli faydalar, ile hastaya özü faktörler, örneğin yaş, ek hastalıklar ve risk toleransı, dikkate alınarak bireyselleştirilebilir [111].

Meme kanseri hastalarının yaklaşık üçte ikisinde hormon reseptörü pozitifdir (strojen reseptörleri, progesteron reseptörleri veya her ikisi) ve hormon reseptörü pozitif meme kanseri hücrelerinin büyümesini engellemek için tamoksifen veya aromataz inhibitörleri gibi hormon tedavileri uygulanır [112]. Selektif strojen reseptör modlatr olan tamoksifen, kanser hücrelerinde östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik etkinin oluşumunu engeller. Aromataz inhibitörleri (anastrozol, letrozol ve eksemestan) ise östrojen sentezinde rol oynayan aromataz enziminin inhibisyonu yoluyla etki gösterir. Premenopozal dönemde olup hormon reseptörü pozitif meme kanseri tanısı konan kadınlarda, tamoksifen veya aromataz inhibitörlerine ek olarak gonadotropin salıcı hormon (GnRH; Leuprolid, goserelin) kullanılır. GnRH analogları, overleri baskılayarak östrojen salgısını engeller. GnRH ve tamoksifen/aromataz inhibitörü kombinasyonlarından en fazla faydayı yüksek nüks riski taşıyan hormon reseptörü pozitif, ERBB2 negatif meme kanseri olan hastalar sağlar [113].

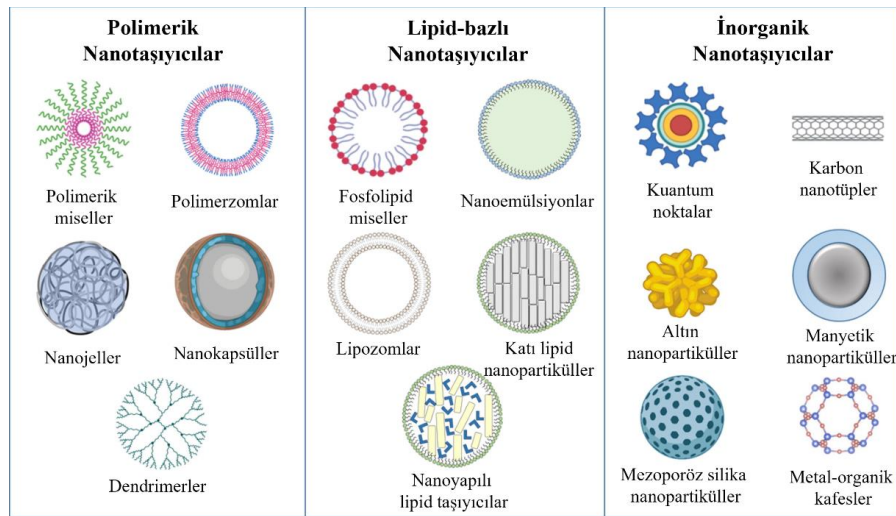
Bağışıklık sistemi, meme kanserinin gelişiminde, ilerlemesinde ve kontrolünde önemli rol oynar. Kanser immünoterapisi ise, kanser hücrelerini ortadan kaldırmak amacıyla insan bağışıklık hücrelerini aktive etmeyi hedefler [114]. Günümüzde meme kanserinde kullanılan immnoterapik ilaçlar, kontrol noktası inhibitörleri, yani PD-1 (programlı hücre ölümü-1; pembrolizumab) ve PDL-1 (programlanmış ölüm ligandı-

1; atezolizumab) inhibitörleri ve HER2 onkogenine yönelik monoklonal antikorlardan oluşmaktadır. Kanser hücreleri, tespit edilme ve yok edilme riskini azaltmak için çeşitli adaptif stratejiler geliştirir. Bu stratejilerden biri, kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan PD-L1'in, T hücrelerinin yüzeyindeki PD-1 ile bağlanmasını sağlayarak bağışıklık T hücrelerinin tümör hücrelerini öldürmesini engellemektir [115]. İmmünoterapik ilaçlar, PD-L1'in PD-1 ile bağlanmasını engelleyerek, bağışıklık T hücrelerinin tümör hücrelerini tanıyıp öldürmelerine olanak tanır. Kısacası, bu ilaçlar bağışıklık hücrelerinin tümör karşıtı etkinliğini engelleyen faktörleri ortadan kaldırarak, vücudun bağışıklık sisteminin daha önce tespit edilmemiş veya bağışıklık sistemi tarafından hoşgörölmüş kanser hücrelerini tanıyıp yok etmesini sağlar [116,117]. Diğer yandan, HER-2 onkogeni meme kanserlerinin yüzde 20 ila 30'unda aşırı eksprese edilir ve bu tümörler, onkogeni aşırı eksprese etmeyenlere göre daha agresiftir ve kemoterapi ajanlarına daha dirençlidir [118]. HER2, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesinin bir üyesidir ve bu aile EGFR/HER1, HER2, HER3 ve HER4'ten oluşan tirozin kinaz reseptörlerini içerir [119]. EGFR reseptör ailesi, normal hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rol oynar. Ancak, bu reseptörlerin aşırı ekspresyonu veya anormal aktivasyonu, meme, over ve mide kanserleri dahil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinin patogeneğinde etkili olur [120]. Trastuzumab, pertuzumab, ado-trastuzumab emtansin ve margetuksimab anti-HER2 aktivitesi gösteren monoklonal antikorlardır. Lapatinib ve neratinib ise HER2 tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden küçük moleküllü inhibitörler olarak görev yapar [121,122]. Anti-HER2 ajanları, HER2 pozitif ve üçlü negatif meme kanseri olan hastalarda güçlü antitümör aktivitesi gösterir ve kalıcı klinik yarar sağlar [123,124].

Meme kanserinin dünya genelindeki görülme sıklığı ve ölüm oranı, tümör oluşumunun altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması ve tedavi stratejilerinin oluşturulmasındaki önemli ilerlemelere rağmen hala yüksek düzeyde seyretmektedir. Geleneksel kemoterapi ilaçlarının tümör seçiciliğinden yoksun olması, ilaçların sistemik dolaşıma girdikten sonra çeşitli doku ve organlara hızla dağılmasına ve yalnızca sınırlı bir miktarının rastgele tümör dokularına ulaşabilmesine sebep olur. Bu durum, klinik tedavi sırasında ciddi toksisite, yan etkiler ve düşük tedavi etkinliği ile sonuçlanır. Bu nedenle, daha düşük dozlarda güvenli ve etkili tedavi sağlamak amacıyla çeşitli hedeflenmiş ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmektedir.

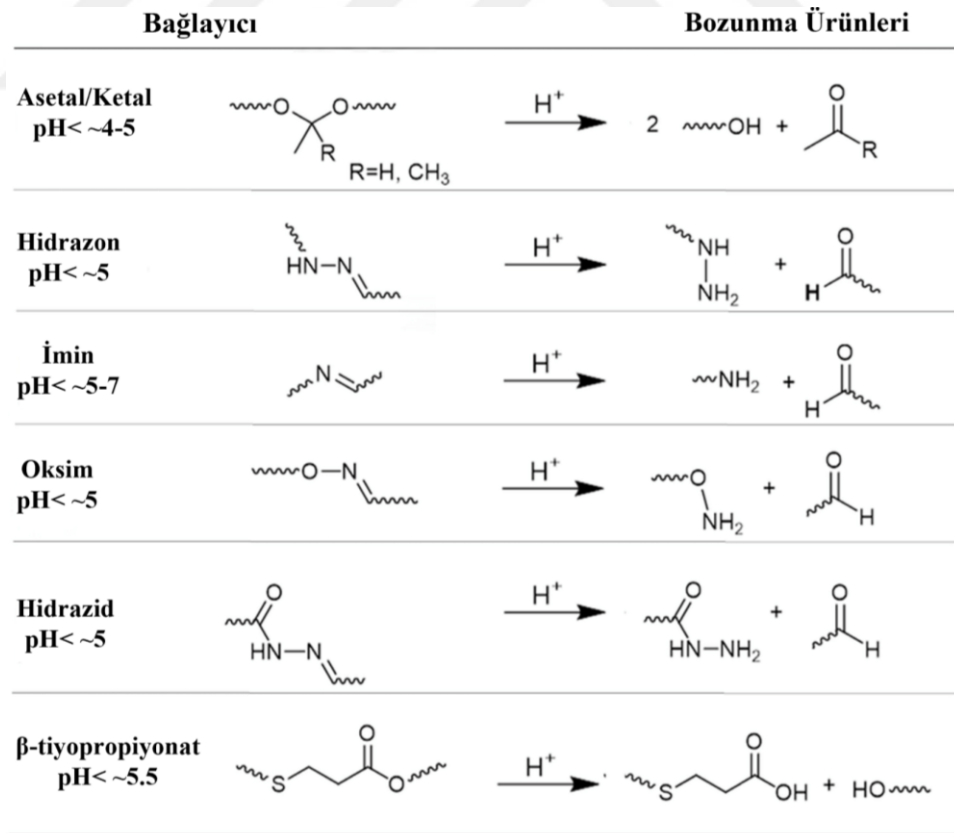
2.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler, ilaç salımının hızını, kapsamını ve yerini kontrol ederek bir ilaç molekülünün vücuda girmesine izin veren teknolojik bir formülasyon veya bir araç olarak özetlenmektedir. Yeni bir ilacın geliştirilmesi çok pahalı ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu nedenle halihazırda mevcut bir ilaç molekülünün yeni taşıyıcı sistemlerinin tasarlanması, ilacın güvenliğini, etkililiğini önemli ölçüde artırabilir [125,126]. Nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemler, geleneksel tedavide kullanılan ilaç moleküllerinin yan etkileri, çoklu ilaç direnci ve hedefe spesifik olmama gibi dezavantajlarının üstesinden gelmek için etkili bir seçenek olarak görülmektedir. Bu sistemler, serbest ilaçlara kıyasla çözünürlüklerinin artırılması, ilaç etkileşimlerinin önlenmesi, kandaki dolaşım sürelerinin iyileştirmesi ve kontrollü salım özellikleri sunması gibi birçok avantaj sağlayabilir. Nanotaşıyıcıların geliştirilmesinde lipidler, polimerler ve metaller gibi çeşitli malzemeler kullanılmaktadır. Bu taşıyıcılar, polimerik nanopartiküller, lipid bazlı nanopartiküller ve inorganik nanopartiküller gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır (Şekil 2.4) [127]. Bu nanosistemler arasında özellikle polimerik ilaç taşıyıcı sistemler son yıllarda büyük ilgi görmüş ve nanotıp alanında önemli yenilikler sunmuştur [128,129]. Polimerik miseller, nanokapsüller, nanopartiküller, nanojeller ve dendrimerler gibi çeşitli polimerik nanotaşıyıcılar, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikleriyle öne çıkmaktadır. Bu sistemler, proteinler, peptitler, genetik materyaller (DNA/RNA) ve hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların taşınmasında büyük potansiyele sahiptir ve hassas kargoları hedef bölgeye güvenle ulaştırana kadar koruma sağlar [130].



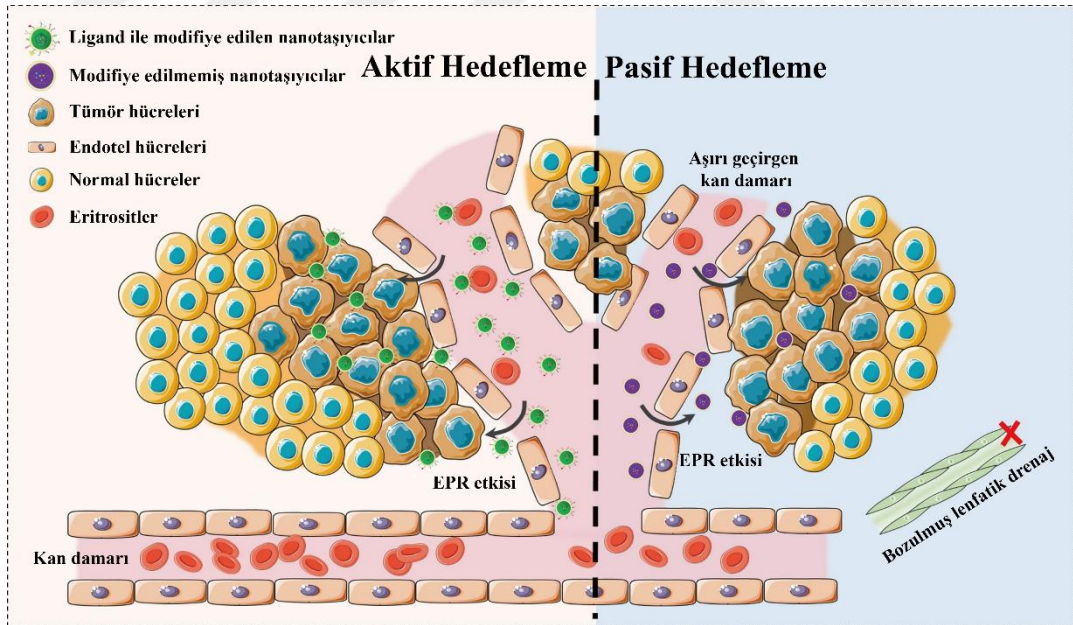
Şekil 2.4 : İlaç taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi [127].

Nanotaşıyıcıların hedef bölgeye ulaştıktan sonra ilacı serbest bırakması için pH, enzimler, redoks potansiyeli, sıcaklık, manyetik alan, ultrason, ışık gibi içsel veya dışsal uyarılara yanıt veren nanomalzemeler kullanılarak kontrollü ilaç salımı sağlayan akıllı nanotaşıyıcılar geliştirilmiştir [131]. Vücutta farklı bölgelerde değişen pH seviyeleri gözlemlenmektedir; örneğin, normal dokuların ve kanın ekstraselüler pH'ı 7.4 iken, tümör dokularında genellikle daha düşük olur. Çoğu tümörün ekstraselüler pH değeri 6.5 ile 7.2 arasında değişir. Ancak, hücre içi ortamda pH daha da düşük olabilir. Endozomlarda pH değerinin 5-6 arasında, lizozomlarda ise 4-5 arasında olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle, ekstraselüler ve intraselüler ortamdaki asidite, pH'a duyarlı nanotaşıyıcıların geliştirilmesinde önemli bir etken olarak değerlendirilir [132]. pH'a duyarlı biyomalzemeler sayesinde, nanotaşıyıcılar asidik veya bazik ortamlara maruz kaldıklarında şekil değişikliğine uğrayabilir veya aside duyarlı bağların (Şekil 2.5) [133] kopması sonucunda etken maddelerin serbest kalmasını sağlayabilir. Bu sistemler, kanser, inflamasyon veya anemi gibi belirgin pH değişiklikleri gösteren patolojik durumlarda ilaç moleküllerinin hedef bölgelere taşınmasında kullanılmaktadır [134].



Şekil 2.5 : pH'a duyarlı kimyasal bağların ve bunların bozunma ürünlerinin örnekleri [133].

Kanser tedavisinde nanotaşıyıcı sistemler aracılığıyla kemoterapötik ilaçların tümör dokularına hedeflenmesi, ilacın biyoyararlanımını artırırken yan etkilerini de önemli ölçüde azaltmakta ve bu yaklaşım son yıllarda araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Nanotaşıyıcılarda ilaçların enkapsüle edilmesi, çözünürlüklerini artırabilir ve hem pasif hem de aktif hedefleme yoluyla tümör bölgesine ulaşma etkinliğini yükseltebilir. Ayrıca, tümör mikroçevresi ilaç salımını etkilediği için, ilaçlar eşzamanlı ya da ardışık olarak salınabilir. Şekil 2.6'da gösterildiği üzere, kanser bölgesinde ilacın birikmesini sağlayan hedefleme stratejileri iki ana kategoriye ayrılmaktadır: pasif ve aktif hedefleme [135]. Pasif hedefleme, tümör dokularında vasküler sistem sızıntısı ve bozulmuş lenfatik drenaj nedeniyle, küçük molekül bileşiklerin etkili bir şekilde ekstravazasyona uğraması ve tümör interstisyumunda kalması sonucu (EPR etkisi) pasif birikimini ifade eder. Aktif hedefleme ise nanotaşıyıcıların yüzeyine aptamerler, ligandlar ve antikolar gibi hedefleme moleküllerinin eklenerek, bu taşıyıcıların tümör hücrelerini spesifik olarak tanıyıp hedef almasıyla gerçekleşir [136]. Tümör hücrelerinin yüzeyindeki aşırı eksprese edilen reseptörlerin tanınması, reseptör aracılı endositozu tetikleyerek nanotaşıyıcıların hücre içine alınmasını ve böylece daha yüksek terapötik etkinliğin elde edilmesini mümkün kılar [137].



Şekil 2.6 : Kanser tedavisinde nanotaşıyıcı sistemlerin aktif hedefleme ve pasif hedeflemesinin şematik bir gösterimi [135].

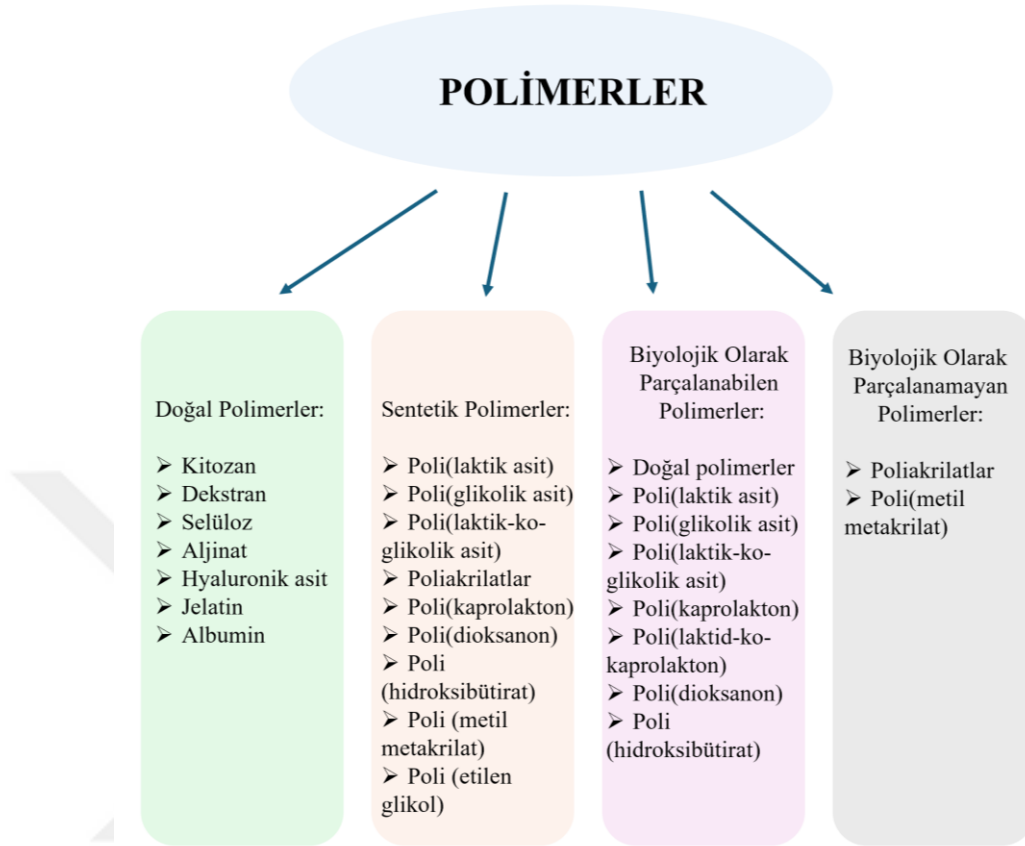
2.4 Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler

1980'lerden itibaren, polimerik ilaç taşıyıcı sistemler, terapötik ajanların uzun süre sabit dozlarda kontrollü salımını, dögüsel dozlamayı ve hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların ayarlanabilir salımını sağlayabilme özellikleriyle ilgi çekici bir araştırma konusu olmuştur. Polimerik nanotaşıyıcılar doğal, yarı sentetik veya sentetik polimerlerden elde edilirler. Bu taşıyıcılar, birçok monomer biriminin polimerizasyon reaksiyonuyla oluşturulur ve belirli koşullar altında kendi kendine organize olarak nanometrik boyutlarda (10-200 nm) yapılandırılabilir [138,139].

Polimerik nanotaşıyıcılar, hazırlama yöntemine bağılı olarak, nanoküre, nanokapsül veya ilaç konjugatı formunda tasarlanabilir ve etken maddeler bu sistemlere hapsedilebilir, enkapsüle edilebilir ya da bağlanabilir [140,141]. Nanoküreler, ilacı matriks yapısı içinde fiziksel olarak dağıtarak veya partikül yüzeyine adsorbe ederek hapseden kolloidal partiküllerdir. Nanokapsüller ise, merkezinde enkapsüle edilmiş bir ilaç bulunan ve etrafı polimerik bir kabukla çevrili bir çekirdek boşluğundan oluşan sistemlerdir. Polimerik kapsüller, kanser hücrelerine yönelik seçiciliğı artırmak amacıyla monoklonal antikorlar, antikor fragmanları, aptamerler, peptitler veya folik asit gibi küçük moleküllerden oluşan hedefleme ligandlarıyla konjugasyon yapılarak tasarlanabilir [141].

Kitosan, dekstran, polisakkaritler ve albumin gibi doğal polimerler, biyoyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri nedeniyle hücre bazlı transplantasyon, doku mühendisliğı ve gen terapisi gibi tıbbi uygulamalarda tercih edilen biyopolimerler arasında yer almaktadır. Doğal polimerler, fonksiyonel gruplarının kimyasal modifikasyonu yoluyla sentetik moleküllerle birleştirilebilir ve yarı sentetik polimerler olarak adlandırılan polimerler sentezlenir. Kontrollü ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarında sentetik polimerler, yapılarının tasarımı ve fizikokimyasal özelliklerinin modifikasyonu açısından önemli potansiyele sahip olması nedeniyle biyopolimerlerden daha fazla ilgi görmektedir [142]. Sentetik polimerik miseller, blok kopolimerlerin çekirdek oluşturan segmentlerini özelleştirerek, antisens oligonükleotidler, plazmid DNA, proteinler, siRNA'lar, mRNA'lar ve fotosensitizerler gibi geniş bir yelpazedeki biyoaktif molekülleri yüksek kapasitede taşıma yeteneğine sahiptir. En sık kullanılan sentetik polimerler arasında polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve (PLGA) öne çıkmaktadır. Bu polimerler, sentetik

olmalarına rağmen biyoyumlu ve biyobozunur özellikleri nedeniyle oldukça ilgi çekicidir [143–145].



Şekil 2.7 : Polimerik nanotaşıyıcılar için kullanılan polimer türleri.

Polimerik nanotaşıyıcılar, diğer ilaç taşıyıcı sistemlere kıyasla birtakım avantajlar sunmaktadır [146,147]. Bu avantajlar şunlardır:

- **Kontrollü Salım;** polimerik nanotaşıyıcılar, terapötik ajanların kontrollü ve yavaş salımını sağlayarak ilacın etki süresini uzatır ve daha dengeli bir tedavi sağlar.
- **Yüksek Etkin Madde Yükleme Kapasitesi;** polimerik sistemler, yüksek miktarda etken madde taşıma kapasitesine sahiptir, bu da daha fazla terapötik ajanın hedef hücrelere ulaştırılmasını sağlar.
- **Hedefe Yönelik Teslimat;** polimerlerin yüzeyine eklenen ligandlar sayesinde, belirli reseptörleri hedef alarak ilacın doğrudan hastalıklı hücrelere taşınması sağlanır. Bu, özellikle kanser tedavisinde daha etkili bir tedavi sunar.

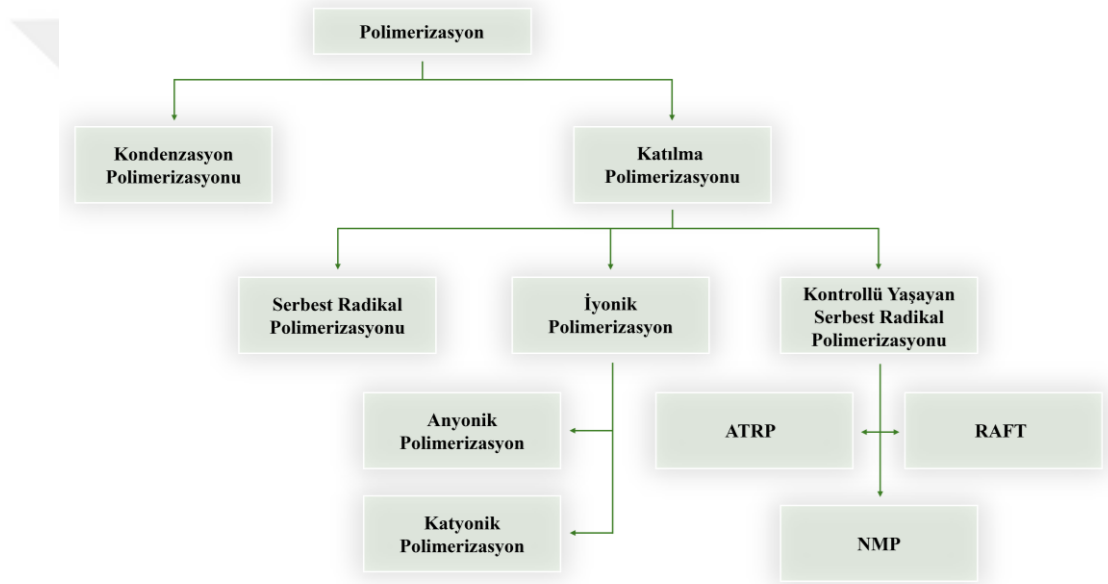
- Biyouyumluluk ve Biyobozunurluk; doğal ya da biyolojik olarak parçalanabilir polimerler kullanıldığında, bu taşıyıcılar vücut tarafından tolere edilir ve zaman içerisinde doğal yollarla parçalanır.
- Toksikite Azaltımı; ilacın yalnızca hedef hücrelerde etkili olmasını sağlayarak sağlıklı hücrelere olan zararını minimize eder, böylece yan etkileri azaltır.
- Çoklu Taşıma Kapasitesi; hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları taşıyabilme kapasitesine sahip olan polimerik nanotaşıyıcılar, çeşitli ilaçların aynı anda taşınmasına olanak tanır.
- Çevresel Uyum; polimerik taşıyıcılar, pH, sıcaklık gibi çevresel değişikliklere duyarlı yapılar tasarlanarak, belirli koşullar altında ilaç salımını gerçekleştirebilir.
- Düşük Üretim Maliyeti; polimerik nanotaşıyıcıların üretiminde kullanılan malzemeler genellikle uygun maliyetlidir ve üretim süreçleri de nispeten basittir. Bu da, büyük ölçekli üretimde maliyet avantajı sağlayarak tedavi süreçlerinde daha ekonomik çözümler sunulmasına olanak tanır.

Polimerik nanotaşıyıcıların sunduğu avantajlar, onları kanser tedavisinde öne çıkan bir seçenek haline getirmektedir. Örneğin, Park ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kemoterapötik bir ilaç olan doksorubisinin PEG'lenmiş PLGA nanopartikülleri içinde enkapsüle edildiğinde, sistemik kullanımda sık karşılaşılan kardiyomiyopati gibi ciddi yan etkilerinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir [148]. Diğer bir çalışmada, Kong ve arkadaşları, aptamer-polidopamin ve kolik asit ile işlevselleştirilmiş yıldız şeklinde poli(ϵ -kaprolakton-ko-laktid) nanopartiküllerini geliştirmiştir. Bu nanopartiküllere meme kanseri tedavisinde güçlü bir kemoterapötik ajan olan dosetaksel yüklenmiş ve bu sistemin kemoterapi ile fototermal tedavi kombinasyonunun etkinliği değerlendirilmiştir. Araştırmanın sonuçları, bu nanopartiküllerin *in vitro* ortamda başarılı bir sitotoksikite sağladığını ve *in vivo* deneylerde dosetakselin sağkalım süresini artırdığını ve yan etkilerini azalttığını göstermiştir [149].

2.5 Polimerizasyon Teknikleri

Polimerler, kovalent bağlarla birbirine bağlanan tekrarlayan birimlerden, yani monomerlerden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı kimyasallardır. Polimerlerin fiziksel özellikleri, (1) monomerik birimlerin kimyasal bileşimine, (2) varsa monomerik birimler arasındaki stereokimyaya, (3) polimer zincirinin mekanik

yapısına (örneğin, zincir kıvrımlı mı yoksa doğrusal mı olduğuna) ve (4) polimerin zincir uzunluğuna, yani polimerin monomer sayısına, diğer bir ifadeyle polimerizasyon derecesine (DP) bağlıdır. Ticari polimerlerin polimerizasyon derecesi (DP) değerleri birkaç yüzden on binlere kadar değişir. Polimerler, yapılarını oluşturan monomerlerine göre sınıflandırılabilir. En basit polimer türü, yalnızca bir tür monomer içeren homopolimerdir. Monomer sayısının artmasıyla birlikte, sırasıyla diblok polimer, triblok polimer ve tetrablok polimer gibi daha karmaşık yapılar ortaya çıkar. Polimerizasyon reaksiyonları ise iki ana kategoriye ayrılır: kondenzasyon polimerizasyonu ve katılma polimerizasyonu, bu süreçler sırasıyla kondenzasyon ve katılma polimerlerini oluşturur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 : Polimerizasyon reaksiyonlarının sınıflandırılması.

2.5.1 Kondenzasyon Polimerizasyonu

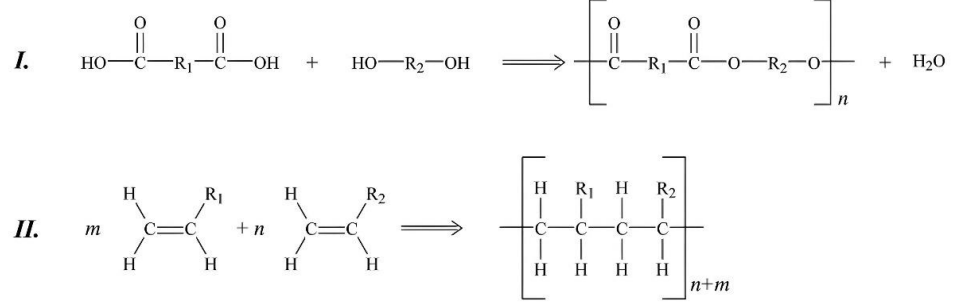
Kondenzasyon polimerizasyonu, en az iki fonksiyonel grup (-COOH, -NH₂, -OH) içeren monomerlerin adım adım reaksiyona girerek polimer oluşturduğu bir süreçtir. Bu nedenle, bu polimerizasyon türüne "basamaklı polimerizasyon" da denir (Şekil 2.9). Reaksiyon her iki yönde ilerlerken, monomerler arasında gerçekleşen her bir adım sonucunda, reaktantın yapısına bağlı olarak su (H₂O), hidroklorik asit (HCl) veya amonyak (NH₃) gibi küçük bir molekül yan ürün olarak açığa çıkar. Bu süreç, özellikle ester (esterifikasyon) ve amid bağlarının (amidasyon) olduğu reaksiyonlarda yaygın olarak kullanılır ve doğal polimerlerden sentetik polimerlere kadar geniş bir uygulama alanına sahiptir. Kondenzasyon polimerizasyonu, poliamidler (nylon), poliester ve

poliüretan gibi birçok önemli polimerin üretiminde kullanılır. Örneğin, naylon üretimi sırasında amino grubu (-NH₂) ve karboksil grubu (-COOH) taşıyan monomerler birleşir ve her bir bağlanma adımında su açığa çıkar. Kondenzasyon polimerizasyonu, polimerlerin yüksek moleküler ağırlıklara ulaşmasını sağlayan önemli bir yöntemdir. Bu süreç, reaksiyona giren monomerlerden birinin tamamen tükenmesi ve polimer zincirlerinin her iki ucunun aynı fonksiyonel gruplarla bitmesiyle sona erer. Polimerizasyon boyunca, adım adım gerçekleşen reaksiyonlar, her aşamada polimer zincirlerinin büyümesini sağlar ve bu yöntemle elde edilen polimerlerin özellikleri, süreç üzerinde yapılan kontrollere bağlı olarak optimize edilebilir [150–152].

2.5.2 Katılma polimerizasyonu

Katılma polimerizasyonunda (zincir büyüme polimerizasyonu olarak da adlandırılır), halka yapısına sahip monomerler veya en az bir çift/ üçlü bağ içeren monomerlerden polimerler üretmek için zincirleme bir reaksiyon kullanılır (Şekil 2.9). Bu süreçte monomerin sahip olduğu “fazladan bağ”, monomerler arasındaki bağı oluşturmak için kullanılır ve yeni monomer birimleri büyüyen polimer molekülüne birer birer eklenir. Bu durum, polimerizasyon sırasında hiçbir molekülün kaybolmadığı ve yan ürünün oluşmadığı, yani monomerin polimere dahil edilirken molekül ağırlığının değişmediği anlamına gelir. Elde edilen polimerin molekül ağırlığı, polimerizasyona dahil edilen tüm monomerlerin toplam molekül ağırlığına eşittir [153]. Bu tür polimerler genellikle serbest radikal reaksiyonlarıyla oluşur; ancak anyonik ve katyonik mekanizmalar da kullanılabilir; fakat bunlar özel çözücüler ve reaksiyon koşulları gerektirir. Katılma polimerizasyon süreci üç ayrı aşamada gerçekleşir [154];

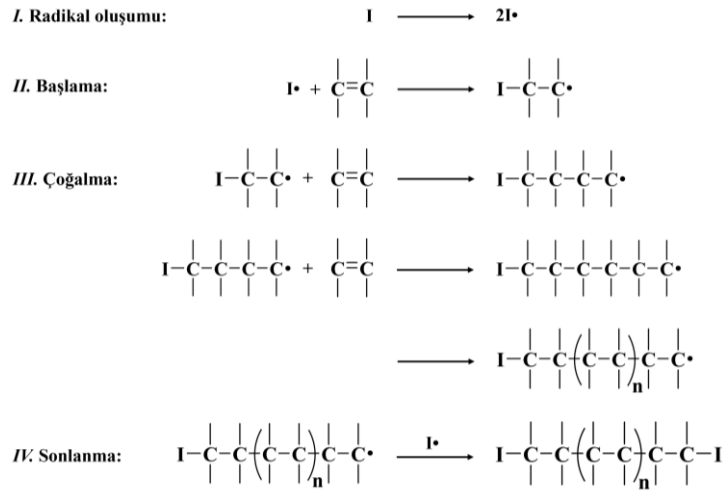
1. Başlama; genellikle polimerizasyon sürecini başlatan bir başlatıcı aracılığıyla gerçekleştirilir. Reaktif başlatıcı molekül bir radikal (serbest radikal polimerizasyonu), katyon (katyonik polimerizasyon), anyon (anyonik polimerizasyon) ve/veya organometalik kompleks (koordinasyon polimerizasyonu) olabilir.
2. Büyüme; bir monomer zincire eklenir ve her yeni monomer birimi, bir sonraki ekleme için aktif bir yer oluşturur.
3. Sonlanma; radikal, katyon veya anyon "nötralize edilir" ve zincir uzaması durdurulur.



Şekil 2.9 : Kondenzasyon ve katılma polimerizasyonunun genel mekanizması.

2.5.2.1 Serbest radikal polimerizasyonu

Serbest radikal polimerizasyonu, sanayide yaygın olarak kullanılan hızlı ve son derece etkili bir tekniktir. Bu yöntem, ticari polimerler üretmek için kullanılır; örneğin, poli(metil metakrilat) (PMMA), poli(akrilamid) ve birçok akrilat ve metakrilat uçlu polyester ve polieterler. Serbest radikal reaksiyonlarında, reaksiyonu başlatmak için peroksitler, redoks başlatıcıları, azo grupları ve fotobaşlatıcılar gibi serbest radikal oluşturan başlatıcılar kullanılır [155,156]. Serbest radikal polimerizasyonları, Şekil 2.10'da [156] gösterildiği gibi işleyen zincir polimerizasyon süreçleridir. Her polimer molekülü, bir monomerin, aktif merkez olarak bilinen terminal serbest radikal reaktif bölgeye eklenmesiyle büyür. Monomer eklenmesiyle birlikte, aktif merkez yeni oluşturulan zincir ucuna transfer olur. Bu süreç son derece hızlı bir şekilde gerçekleşir, makromolekülü büyütür ve aktif merkez, bir sonlandırma reaksiyonuyla nötralize edilene kadar devam eder [157].



Şekil 2.10 : Serbest radikal polimerizasyonunun genel mekanizması. (I; başlatıcı).






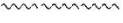

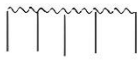
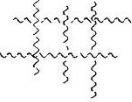
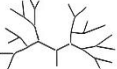
2.5.2.2 İyonik polimerizasyon

İki tür iyonik polimerizasyon vardır: pozitif yüklü aktif merkeze sahip olanlara katyonik polimerizasyon, negatif yüklü aktif merkeze sahip olanlara ise anyonik polimerizasyon adı verilir. Katyonik polimerizasyonlar için en uygun monomerler, 1,1-dialkil, alken, alkoksi ve fenil gibi elektron veren bir substitüent içeren monomerlerdir. Katyonik polimer örnekleri arasında poliizobütülen ve bütül kauçuğu gibi dienlerle yapılan kopolimerler yer alır. Katyonik polimerizasyon sistemlerinde genellikle reaksiyonu başlatmak için, elektrofil haline gelen bir proton kaynağının eşlik ettiği bir mineral asit veya BF_3 , AlCl_3 ve TiCl_4 gibi Lewis asitleri kullanılır [158]. Anyonik polimerizasyonlar, fenil, karboksil, nitril ve dien gibi elektron çeken bir substitüent içeren bir monomer türü gerektirir. Anyonik polimer örnekleri arasında stiren-bütadiyen kauçuğu ve stiren-bütadien-stiren termoplastik elastomer reçineleri gibi bazı stirenik ürünler yer alır. Yaygın olarak kullanılan başlatıcılar ise etil lityum ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Li}$) ve sodyum naftalin ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{Na}$)'dir. İyonik polimerizasyonunun birçok yönü serbest radikal polimerizasyonuna benzer. İyonik polimerizasyon süreçleri, genellikle yan reaksiyonları önlemek ve yüksek molekül ağırlıklı ürünler elde etmek için yüksek düzeyde saflaştırma ve düşük reaksiyon sıcaklığı gerektirir. Ayrıca, bu süreçler yüksek polimerizasyon hızına sahiptir ve kullanılan çözücü türlerine karşı oldukça duyarlıdır [159].

2.5.2.3 Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonu

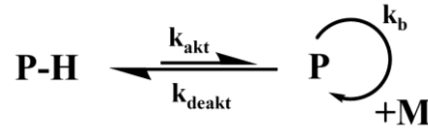
Serbest radikal polimerizasyonu, geniş bir kullanım alanı ve basit işlem koşulları ile uygulanabilen bir polimerizasyon yöntemi olmakla birlikte, polimerlerin moleküler özellikleri üzerinde sınırlı bir kontrol sağlar. Özellikle molekül ağırlığı, polidispersite, bileşim, zincir mimarisi ve belirli fonksiyonel grupların düzenlenmesi gibi kritik parametrelerde istenilen düzeyde hassasiyet sağlanamamaktadır. Bu nedenle, iyi tanımlanmış polimerlerin sentezi açısından yetersiz kalmaktadır. Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonu ise bu kontrolü sağlayarak biyokonjugatlar, organik/inorganik kompozitler ve yüzeye bağlı kopolimerler gibi yeni malzemeler için tasarım fırsatları sunar. Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonunda, polimer zincirlerindeki aktif uçlar sayesinde, reaksiyon ortamındaki monomerler tamamen tükense bile, monomer ilavesiyle polimerizasyon yeniden başlatılabilir. Bu süreç,

farklı monomerlerin eklenmesiyle blok kopolimerlerin sentezlenmesini mümkün kılar (Şekil 2.11) [160].

Kompozisyon:				
				
Homopolimer	Blok Kopolimer	İstatistiksel Kopolimer	Gradyan Kopolimer	Graft Kopolimer
Yapı:				
				
Doğrusal Polimer	Yıldız/Çok Kollu Polimerler	Fırça Yapılı Polimerler	Ağ Yapılı Polimerler	Hiper Dallanmış Polimerler

Şekil 2.11 : Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonu yoluyla elde edilen moleküler yapı örnekleri [160].

Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyon 1990'larda, canlı iyonik polimerizasyonun canlı serbest radikal polimerizasyona adaptasyonunun sağlanmasıyla geliştirildi [161,162]. Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonda, geleneksel serbest radikal polimerizasyonunun aksine, sonlanma ve zincir transfer reaksiyonları meydana gelmemektedir. Böylece geri dönüşümsüz sonlanma en aza indirilir [163]. Kontrollü radikal polimerizasyonu, uykuda olan ancak potansiyel olarak aktif türlerin ayrışma-birleşme (örneğin, iniferter), NMP, katalitik atom (grup) transferi (örneğin, ATRP) ve dejeneratif zincir transferi (örneğin, RAFT) yoluyla bir polimer radikali haline gelmek üzere aktive edilebildiği dönüşümlü bir aktivasyon-deaktivasyon sürecini takip eder [153]. Büyüyen polimer radikaller ile çeşitli uykuda türler arasında dinamik bir denge kurulması tüm kontrollü yaşayan radikal polimerizasyon sistemlerinin merkezinde yer alır (Şekil 2.12) [164].



Şekil 2.12 : Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonunun genel mekanizması.

Kontrollü yaşayan radikal polimerizasyon aşağıda listelenen üç temel tekniğe ayrılmaktadır;

- Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP),

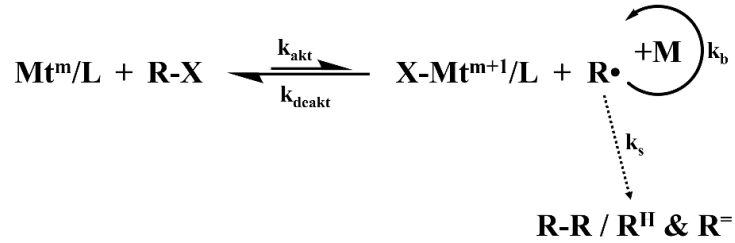
- Nitroksit Aracılı Polimerizasyon (Nitroxide-Mediated Polymerization, NMP),
- Tersinir Katılma-Parçalanma Zincir Transfer Polimerizasyonu (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization, RAFT).

Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP)

1995 yılında Matyjaszewski [165], Sawamoto [166] ve Percec [167] tarafından keşfedilen atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), kontrollü molekül ağırlığı, dar molekül ağırlık dağılımları ve tasarlanabilir moleküler mimarilere sahip iyi tanımlanmış polimerlerin hazırlanmasında en güçlü yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Atom transfer radikal polimerizasyonu ismi, polimer zincirlerinin düzenli büyümesinden sorumlu olan temel reaksiyon adımı olan atom transferi aşamasından gelmektedir. Genellikle ATRP sistemi monomer, başlatıcı ve katalizörden oluşur. Bu sistemde en önemli bileşen, polimerizasyonun yaşayan/kontrollü özelliklerinin anahtarı olan katalizördür. Günümüze kadar Fe, Cu, Mo, Rh, Ru, Co, Ni, Pd gibi çeşitli geçiş metali kompleksleri ATRP sistemlerinde katalizör olarak başarıyla kullanılmıştır [168–171]. İdeal bir ATRP katalizörü şunları sağlamalıdır; (1) istenen molekül ağırlığına ve dar polidispersiteye sahip polimer sentezi; (2) polimerizasyon reaksiyonu için yüksek katalitik aktivite; (3) polimerde çok az miktarda kalan katalizör. Bu gereksinimlerin tam olarak karşılanması hala zorluk teşkil etmektedir.

ATRP tekniği, genellikle halojen türevi olan bir alkil halojenür (R-X; başlatıcı olarak) ile geçiş metali kompleksi (Mt^m/L ; katalizör olarak) arasındaki geri dönüşümlü elektrokimyasal reaksiyona dayanır. Geçiş metali kompleksi (Mt^m/L) alkil halojenür bağının homolitik olarak kopmasını sağlar. Bu süreç, daha yüksek oksidasyon durumundaki metal-halojenür kompleksinin ($X-Mt^{m+1}/L$) ve radikallerin (R^*) oluşmasına yol açar. Oluşan radikaller monomer (M) birimine eklenir ve $R-M^*$ radikali oluşur. Reaksiyonun geri dönüşümlü olması nedeniyle, $R-M^*$ radikale birkaç monomer birimi bağlandıktan sonra, radikaller oksitlenmiş metal kompleksleri ($X-Mt^{m+1}/L$) ile de reaksiyona girerek, alkil halojenür ve daha düşük oksidasyon durumundaki geçiş metali kompleksini (Mt^m/L) yeniden oluşturabilir [172]. Polimerizasyon sürecinde, aktivasyon hız sabiti (k_{akt}), deaktivasyon hız sabitinden (k_{deakt}) daha küçük olduğu için reaksiyon sola doğru ilerleme eğilimindedir (Şekil

2.13). Bu nedenle, monomerler aktif polimer zincirlerine eklendikten sonra sonlanma aşamasına geçmeden radikaller tekrar pasif hale gelir. Bu durum, ortamda bulunan monomerler bitene kadar devam eder. Böylece, kontrollü bir zincir uzaması gerçekleşir.

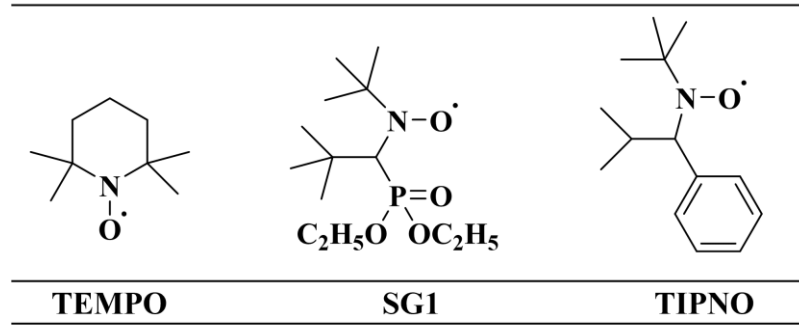


Şekil 2.13 : Atom transfer radikal polimerizasyonunun genel mekanizması.

Nitroksit aracılı polimerizasyon (NMP)

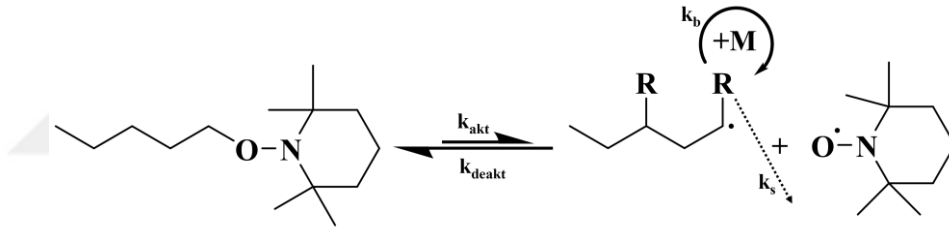
Bir diğer kontrollü yaşayan radikal polimerizasyon sistemi, ATRP'de bulunana benzer geri dönüşümlü bir deaktivasyon işlemiyle polimer büyümesini kontrol etmek için alkoksiaminleri kullanan nitroksit aracılı polimerizasyondur (NMP). NMP, ilk olarak 1980'lerde Solomon ve Rizzardo tarafından [173] bahsedilmiş olmasına rağmen, Georges'in 1993 tarihli makalesinden [174] sonra büyük ilgi görmüştür. NMP, kullanım kolaylığı ve nihai polimerlerde metal kalıntılarının bulunmaması gibi avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, NMP'nin kükürt içermeyen bir kimyaya sahip olması ve dienlerin yanı sıra stiren türevlerinin kontrollü polimerizasyonunda mükemmel bir kontrol sağlaması da önemli özelliklerindedir. Ancak, yüksek sıcaklık gereksinimi, yan reaksiyonlar nedeniyle metakrilatların kontrolündeki zorluklar ve nitroksitler ile alkoksiaminlerin düşük bulunabilirliği gibi dezavantajlar nedeniyle bu teknikle yapılan çalışmalar sınırlı kalmıştır [175].

NMP'de en sık kullanılan başlatıcı TEMPO'dur (2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oksi). Ancak, 2,2,5-trimetil-4-fenil-3-azaheksan-3-nitroksit (TIPNO) ve *N-ter*-bütil-1-dietilfosfeno-2,2-dimetilpropil nitroksit (SG1), TEMPO'ya kıyasla daha hızlı polimerizasyonlar ve daha iyi moleküler ağırlık dağılımları sağlamıştır (Şekil 2.14) [176].



Şekil 2.14 : Nitroksit aracılı polimerizasyonda kullanılan başlatıcılar.

Şekil 2.15’te NMP mekanizması gösterilmektedir. NMP genellikle polimer zincirinin ucundaki C–O bağının doğrudan homolizini içerir. Katalizör olarak birçok metal kullanılabilir ve polimerizasyondan sonra saflaştırma işlemine ihtiyaç duyulmaz. Ancak NMP’nin uygulandığı sıcaklıkların akrilat monomerlerinin kaynama noktalarının üzerinde olması, bu yöntemin akrilat monomerlerinde verimli bir şekilde kullanılmasını engellemektedir [177].

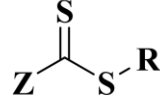


Şekil 2.15 : Nitroksit aracılı polimerizasyonun genel mekanizması.

Tersinir katılma-parçalanma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT)

RAFT polimerizasyon tekniği ilk olarak 1998 yılında CSIRO grup tarafından bildirilmiştir [178]. Polimerizasyon dejeneratif transfer süreçleriyle ilerler ve zincir transfer ajanları (RAFT ajanları olarak adlandırılır) olarak kullanılan bileşikler aracılığıyla kontrol edilir. RAFT ajanları, tiyokarboniltiyo kısmına sahip organik bileşiklerdir ve genel yapıları $[Z-(C=S)S-R]$ (Şekil 2.16) şeklinde gösterilebilir. R ve Z gruplarının yapıları başarılı bir RAFT polimerizasyonu için kritik öneme sahiptir. R grubu polimerik zincirlerin büyümesini başlatırken, Z grubu tiyokarbonil bağına radikal eklenmesi yönünde aktive eder ve daha sonra ortaya çıkan ara radikali stabilize eder. RAFT ajanları, C=S işlevselliğinin yanındaki farklı Z gruplarına bağlı olarak dört sınıfa ayrılır [179,180];

- ditiyoesterler (Z = alkil veya aril),
- tritiyokarbonatlar (Z = SR),
- ksantatlar (Z = O-alkil),
- ditiyokarbamatlar (Z = NR₂) (R = alkil veya H) (Şekil 2.16).

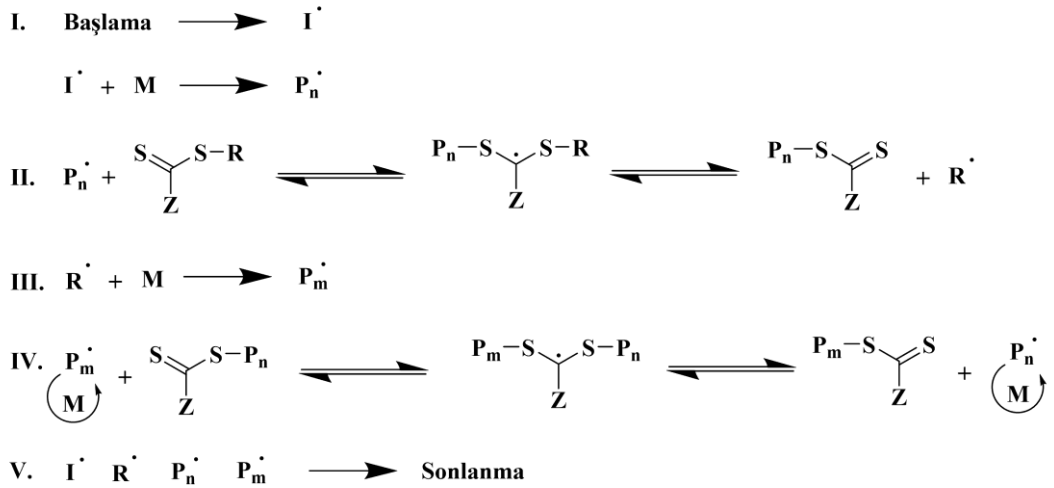


<u>R</u>	<u>Z</u>	<u>RAFT ajanı sınıfı</u>
-CH ₂ CN, -CH ₂ Ph	-Ph	Ditiyoester
-C(CH ₃) ₂ (COOEt)	-C _n H _{2n+1}	
-C(CH ₃) ₂ CN	-NEt ₂	Ditiyokarbamat
-C(CH ₃) ₂ Ph	-OEt	Ksantat
-C(CH ₃) ₂ CN	-SCH ₃	Tritiyokarbonat

Şekil 2.16 : RAFT ajanlarının genel yapısı.

RAFT polimerizasyonunun genel mekanizması Şekil 2.17’de gösterilmektedir [181]. Polimerizasyonun ilk basamağı, bir radikalın oluşturulduğu ve monomerle reaksiyona girdiği başlama adımındır (basamak I). Polimerizasyonun ilk adımında büyüyen polimer zinciri (Pn•), RAFT ajanının reaktif bağına [S=C(Z)SR] hızla eklenerek radikal bir ara madde oluşturur. Basamak II’de radikal ara madde, geri dönüşümlü olarak parçalanarak ya başlangıçtaki büyüyen zincire doğru ilerler ya da yeniden radikal grup (R•) ve polimerik bir RAFT ajanı oluşturur. Daha sonra radikal R• monomerlerle reaksiyona girerek polimerizasyonu yeniden başlatır ve büyümekte olan yeni bir polimer zinciri oluşturur (basamak III). Başlangıçtaki RAFT ajanı tamamen tükendikten sonra, reaksiyon ortamında yalnızca polimerik RAFT ajanı mevcut olur ve aktif olarak büyümekte olan polimer zincirleri ile polimerik RAFT ajanı arasında denge (basamak IV) sağlanır. Bu denge zincir dengesi olarak adlandırılır ve aktif ve uykuda olan zincirler arasındaki hızlı değişim, tüm zincirlerin büyüme olasılığının eşit olmasını sağlar ve dolayısıyla dar polidispersiteli polimerlerin üretimine yol açar. Polimerizasyon bittiğinde çoğu zincirler, ¹H-NMR ve UV-vis spektroskopisi ile tanımlanan son grup olarak tiyokarboniltiyo kısmını içerir. Sonlanma aşaması, klasik serbest radikal polimerizasyonlarda olduğu gibi, radikal-radikal sonlanması yoluyla gerçekleşir.

RAFT polimerizasyonu için termal başlatma, RAFT ajanının ultraviyole ışık veya γ radyasyonu ile doğrudan fotokimyasal uyarılması ve organik başlatıcıların ayrışması gibi birçok farklı başlatma kaynağı bildirilmiştir. Bununla birlikte, radikal başlatıcıların termal ayrışması, bu tür bileşiklerin ticari olarak bulunabilmesi nedeniyle en yaygın olarak benimsenen başlatma yöntemidir. Polimerizasyon sıcaklığı genellikle 60–80 °C aralığındadır ve bu, iyi bilinen başlatıcı azobis(izobütironitril) (AIBN)'nin optimum ayrışma sıcaklığı aralığına karşılık gelir.



Şekil 2.17 : Tersinir katılma-parçalanma zincir transfer polimerizasyonunun genel mekanizması.

Konvansiyonel serbest radikal polimerizasyonu ile polimerize edilen monomerlerin büyük çoğunluğu RAFT yöntemiyle de polimerize edilebilmektedir. Stiren türevleri, akrilat ve akrilamidler, metakrilatlar, metakrilamidler ve vinil esterler RAFT polimerizasyonunda kullanılan tipik monomer sınıflarıdır [182–184]. RAFT polimerlerindeki işlevsellikler yalnızca monomer seçimiyle sınırlı değildir; polimerik zincir uç grupları tarafından da ortaya çıkarılabilir. RAFT polimerleri, RAFT ajanının R veya Z grubu tarafından veya polimerizasyon sonrası modifikasyonlar sonucunda ortaya çıkan zincir sonu işlevsellikleri gösterebilir [185,186]. RAFT ayrıca karmaşık polimerik mimarilerin mühendisliği için çok yönlü bir araçtır. Rastgele (istatistiksel), gradyan, aşırı ve blok kopolimerler dahil olmak üzere çeşitli kopolimerlerin sentezi kolayca gerçekleştirilebilir [187–189].

2.6 Halka Açılma Polimerizasyonu (ROP)

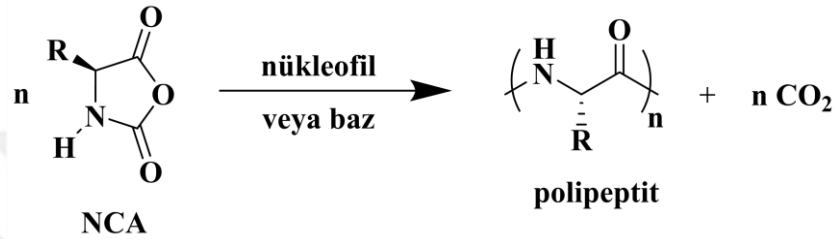
Halka açılma polimerizasyonu, bir polimer zincirinin terminal ucunun reaktif bir merkez gibi davrandığı ve diğer siklik monomerlerin, uzun bir polimer zinciri oluşturmak üzere halka sistemini açarak reaksiyona girdiği bir zincir büyüme şeklidir [190]. Polimer zincirinin terminal ucundaki reaktif merkez iyonik, katyonik veya radikal olabilir. Bu halkalı monomerler genellikle halkada alkenler, alkanlar veya heteroatomlar bulundurur. Polimerizasyon yeteneği halka yapısının türüne ve büyüklüğüne bağlı olarak değişir [191]. Halka açma polimerizasyonu, polyesterler, polisiloksanlar ve poliamidler de dahil olmak üzere ticari açıdan önemli birçok polimerin üretiminde uygulanmıştır [192]. Kondenzasyon polimerizasyonunun aksine, bu yöntem son yan ürünlerin uzaklaştırılmasını gerektirmez ve yüksek molekül ağırlıklı polimerler birkaç dakika içinde elde edilebilir. Bu yöntemin ana dezavantajı, monomerlerden birinin (diol veya diasit), ek çözücüler ve bir katalizör gerektiren siklik formuna dönüştürülmesi gerekliliğidir. Geleneksel olarak polimerizasyon için kullanılan kimyasal yöntemler, yüksek sıcaklık (150–280 °C) ve çevre için toksik olan metal katalizörler gerektirir [193].

N-Karboksianhidrit Halka Açılma Polimerizasyonu (NCA-ROP)

Biyolojik sistemler, karmaşık ancak son derece düzenli yapılar oluşturma yeteneğine sahip proteinler üretirler. Bu dikkat çekici malzemeler, özelliklerini yapılarındaki amino asit monomerlerinin dizilim ve bileşimlerinden alan polipeptid kopolimerlerdir. Son zamanlarda, biyoteknoloji (örneğin, yapay dokular ve implantlar), biyomineralizasyon (örneğin, dayanıklı, hafif ve düzenli inorganik kompozitler) ve analiz (örneğin, biyosensörler ve tıbbi tanı) gibi alanlarda kullanılacak ürünler elde etmek amacıyla bu doğal polimerlerin hazırlanması için sentetik yollar geliştirmeye yönelik ilgi artmıştır [194,195].

Oligopeptit ve polipeptitlerin sentezinde monomer olarak α -amino asit-N-karboksianhidritlerin (NCA'lar) kullanımı ilk olarak Leuchs tarafından 1906 yılında bildirilmiştir. Uzun polipeptit zincirlerinin sentezi için en ekonomik ve hızlı işlem NCA'ların polimerizasyonudur (Şekil 2.18). Bu yöntemde en basit reaktifler kullanılır ve yüksek verimde, büyük miktarda yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin hazırlanmasına olanak tanır [196]. 1940'ların sonlarından bu yana, NCA

polimerizasyonları yüksek molekül ağırlıklı polipeptitlerin büyük ölçekli hazırlanmasında kullanılan en yaygın teknik olmuştur [197]. Bununla birlikte, başlarda NCA polimerizasyonlarındaki kontrol seviyesinin düşük olması, doğal proteinlerin dizi özgülüğüne ve monodispersitesine sahip olmayan homopolimerler, rastgele kopolimerler veya aşı kopolimerlerinin elde edilmesine neden olmuştur [198]. Son yıllarda ise, NCA'ların kontrollü polimerizasyonu yoluyla iyi tanımlanmış yapılara sahip çok bloklu polipeptitler veya polipeptit içeren hibrit malzemelerin oluşturulması için çeşitli metal ve organo-katalizörler geliştirilmiş ve kullanılmıştır [199,200].



Şekil 2.18 : α-amino asit-N-karboksianhidritlerin (NCA) polimerizasyonunun genel gösterimi.

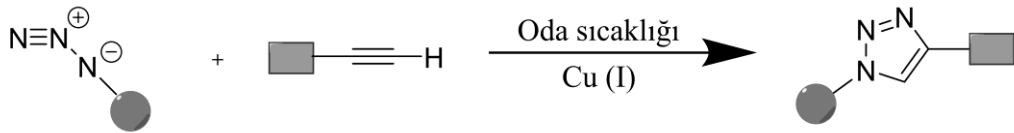
2.7 Klık Kimyası

"Klık kimyası" terimi, ilk kez 2001 yılında K. Barry Sharpless ve çalışma arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır ve heteroatom bağlantıları aracılığıyla kullanışlı yeni bileşiklerin hızlı sentezini sağlayan güçlü, son derece güvenilir ve seçici bir dizi reaksiyonun geliştirilmesini ifade eder [201]. Bu reaksiyonlar, genellikle azidler, alkinler veya siklooktinler içeren belirli bir kimyasal bağ yoluyla iki molekülün birleşmesini içerir. Son yıllarda klık reaksiyonları özel kimyasal, farmasötik, biyomoleküler, biyomedikal ve polimer uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Klık kimyası, karmaşık moleküllerin sentezlenmesine ve çeşitli alanlarda önemli uygulamaları olan yeni malzemelerin, ilaçların ve diğer ürünlerin geliştirilmesine yol açmıştır.

Klık kimyası, hem küçük hem de büyük ölçekli uygulamalarda güvenilir bir şekilde çalışan, çok yüksek verim sağlayan ve yalnızca non-kromatografik yöntemlerle uzaklaştırılabilen zararsız yan ürünler oluşturan güçlü bir yöntem olarak pek çok avantaj sunmaktadır [202]. Günümüzde klık reaksiyonları dört genel kategoriye ayrılmaktadır [203];

- (1) Siklokatılma reaksiyonları (yaygın olarak azid-alkin klik reaksiyonu ve Diels–Alder (DA) klik reaksiyonu),
- (2) Tiyol-klik reaksiyonları (bunlar arasında tiyol-en/in, tiyol-epoksi ve tiyol-izosiyanat klik reaksiyonları ve tiyol-Michael katılma reaksiyonu yer alır),
- (3) Amino-klik reaksiyonları (aza-Michael katılma reaksiyonu ve amino-epoksi halka açılma reaksiyonu gibi), ve
- (4) Non-aldol tipi karbonil klik reaksiyonları (imin, hidrazin ve oksim karbonil-kondensasyonlarını içerir).

Klik kimyasının amiral gemisi olan bakır katalizli azid-alkin siklokatılma reaksiyonu (CuAAC), 2002 yılında Sharpless [204] ve Meldal [205] tarafından birbirinden bağımsız olarak rapor edilmesinden bu yana, klik özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Azidler ile terminal alkinler arasındaki siklokatılma reaksiyonunun Cu(I)-katalizli versiyonunun, katalizsiz versiyonuna göre 10^7 kat daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Cu(I) ile terminal alkinler arasındaki etkileşim, terminal alkinleri daha iyi bir 1,3-dipolarofil yaparak azidlerle olan reaksiyonunu hızlandırır. Cu(I) katalizli reaksiyon oldukça bölgesel seçici olup yalnızca 1,4-adduktları oluşturur. Ayrıca, bu reaksiyon oda sıcaklığında ve çok daha hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir (Şekil 2.19).

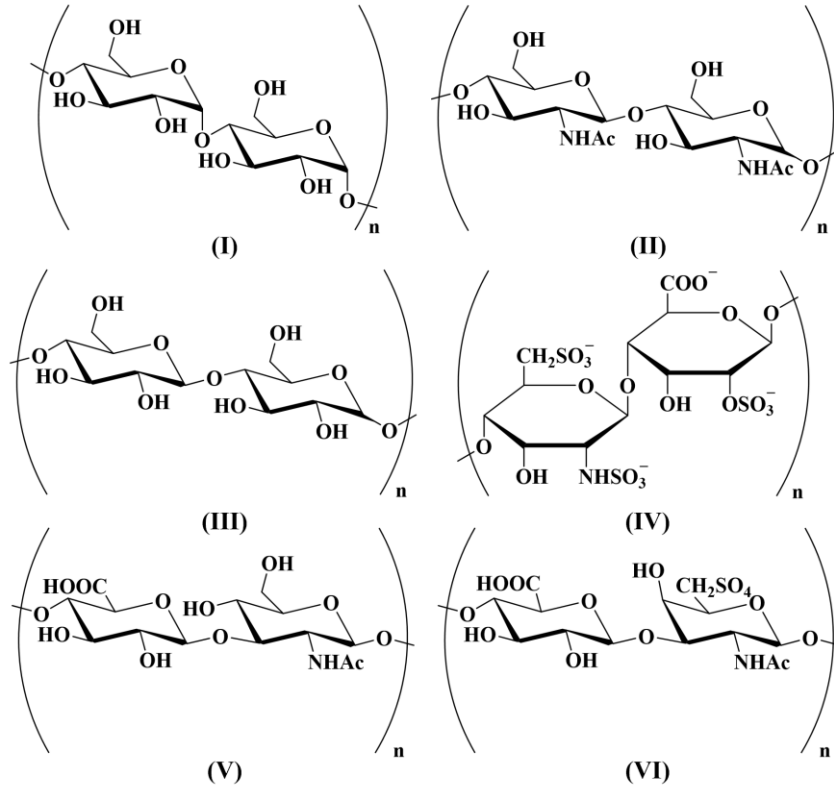


Şekil 2.19 : CuAAC klik reaksiyonu genel mekanizması.

Klik kimyası, bilinen farmakoforlara benzemeyen yeni yapılar oluşturma yeteneğinin yanı sıra, kompleks karbonhidratlar ile peptitler gibi kimyasal olarak oldukça farklı iki molekülü veya biyopolimerlerle floresan boyaları kovalent olarak bir araya getirmeyi de basitleştirir. Bu sebeple klik kimyası başlangıçta organik sentez için genel bir kavram olarak varsayılmış olsa da, bu stratejinin biyokonjugasyon, ilaç keşfi, polimerler ve radyokimya gibi araştırma alanlarında potansiyel uygulamaları giderek artmaktadır.

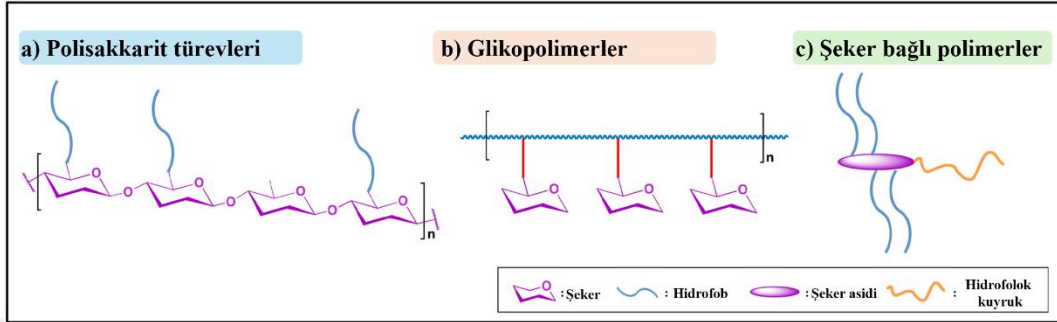
2.8 Glikopolimerik ilaç taşıyıcı sistemler

Doğada bol miktarda bulunan karbonhidratların halka yapısı ilk olarak 1930'lu yıllarda Haworth ve arkadaşları tarafından aydınlatıldı [206]. Kısa bir süre sonra polisakkaritler keşfedildi ve bunların her canlı organizmada; bitki ve hayvanda mevcut olduğu ortaya çıktı. Polisakkaritler doğanın enerji kaynağı (nişasta ve glikojen) olmasından, yapısal materyaller (selüloz, kitin, kolajen ve proteoglikanlar) sağlamaya kadar çok çeşitli biyolojik işlevler sergiler (Şekil 2.20, I-III). Karbonhidratların günümüzde daha da geniş çeşitlilikte biyolojik roller üstlendiği bilinmektedir. Örneğin, sülfatlanmış polisakkarit heparin (Şekil 2.20, IV) kan pıhtılaşmasında önemli bir rol oynar [207], eklemlerde kayganlaştırıcı görevi olan hyaluronik asit (Şekil 2.20, V) ise 1980'lerde plastik göz içi lenslerin implantasyonunda kullanılmıştır [208]. Ayrıca, hyaluronik asit ve bir diğer sülfatlanmış polisakkarit kondroitin sülfat (Şekil 2.20, VI) antiinflamatuvar aktivite göstermektedir ve osteoartrit ve romatoid artrit tedavisinde araştırılmıştır [209].



Şekil 2.20 : Polisakkaritlerin yapıları. (I) Nişasta, (II) kitin, (III) selüloz, (IV) heparin, (V) hyaluronik asit, (VI) kondroitin sülfat.

Şeker bazlı polimerik taşıyıcı sistemler, şeker bileşenlerinin rollerine göre üç ana tipe ayrılabilir [210]: (i) şekerin ana polimer yapısını oluşturduğu polisakkarit türevleri, (ii) şeker ünitelerinin yan dallar olarak bağlandığı şeker işlevselleştirilmiş polimerler (örneğin, glikopolimerler) ve (iii) şekerin dallanma veya omurga yapısı olarak kullanıldığı şeker bağlı polimerler (Şekil 2.21).



Şekil 2.21 : Şeker bazlı polimerik taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi ve sınıflandırılması [210].

Glikopolimerler, kovalent olarak bağlanmış, sarkık karbonhidrat kısımlarına sahip sentetik bir polimerik omurgadan oluşan makromoleküler yapılardır. İlk olarak 1950'lerin sonu ve 1960'ların başında rapor edilmiştir [211–213], ancak biyolojik aktivitelerinin keşfi ve canlı radikal polimerizasyon tekniğinin ortaya çıkışı, bu alanla ilgili ilgiyi büyük ölçüde artırmıştır. Polimerik omurganın sağladığı malzeme özellikleri ile karbonhidratların biyolojik aktivitelerinin birleşimi, glikopolimerik bileşiklerin klinik tanı, hedeflenmiş ilaç taşıma sistemleri, afinite kromatografisi ve biyolojik analizler gibi çeşitli alanlarda kullanılmasına olanak tanımıştır [214]. Bu uygulamalar, çok çeşitli fonksiyonlara sahip iyi tanımlanmış yapıları verimli bir şekilde üreten glikopolimerlerin yeni sentez yöntemlerine olan talebi büyük ölçüde artırmıştır. Glikopolimerlerin sentezi için iki genel yöntem bulunmaktadır. Bunlar, önceden oluşturulmuş polimer omurgalarının karbonhidrat türevleri ile polimerizasyon sonrası modifikasyonu ve glikozillenmiş monomerlerin polimerizasyonudur [215,216]. Modern, yüksek kaliteli ve kontrollü polimerizasyon teknikleri, örneğin RAFT, NMP, ATRP, halka açılma polimerizasyonu (ROP) ve halka açılma metatez polimerizasyonu (ROMP), zincir uzunlukları üzerinde yüksek kontrol sağlayarak dar molekül ağırlığı dağılımlarına sahip çeşitli yapılarda fonksiyonel polimerlerin üretilmesine olanak tanımaktadır [217].

Polimerik omurga, bileşimin malzeme özelliklerinden sorumludur. Farklı düzenlemelerde (blok, istatistiksel, gradyan vb.) çeşitli monomerik birimlerden oluşabilir. Bu nedenle, polimer omurgası, son malzemenin film oluşturma, termal direnç, biyobozunurluk, esneklik, çözünürlük davranışı ve dış uyaranlara (pH veya sıcaklık değişimi) yanıt verme gibi fiziksel özelliklerinin uyarlanmasına olanak tanır. Ayrıca, polimerik omurga, ek işlevler sağlayan ilave fonksiyonel gruplarla da modifiye edilebilir. Bu gruplar; görüntüleme amaçlı boya ve radyoaktif işaretleyiciler, tedavi açısından önemli metal iyonlarını (örneğin, PtII iyonları) bağlayan kompleksleştirici yapılar, biyobozunur bir bağlayıcı aracılığıyla eklenmiş ilaçları içeren kontrollü ilaç taşıma sistemlerini ve biyotin veya avidin gibi yüzeye bağlanma birimlerini içerebilir [218].

Glikopolimerin ikinci kısmı, materyalin biyolojik özelliklerini ayarlamaktan sorumlu olan yan dal şeklindeki şeker gruplarından oluşur. Doğal olarak oluşan glikokonjugatların, karbonhidrat birimleri aracılığıyla birçok biyolojik işlevde yer alan tanıma bölgeleri olarak hayati roller oynadığı bulunmuştur [219]. Şeker grupları, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu, hücreler arası tanıma, kanser gelişimi, hücre yapışması ve farklılaşması, immünolojik tanıma ve mikroorganizmalar arası iletişim gibi çeşitli süreçlerde önemli bir rol oynar [220]. Belirli hücrelerin, bakterilerin veya virüslerin farklı şekerlere yönelik özel etkileşimler sergilediği kanıtlanmıştır. Bu etkinliklerin özgüllüğü, karbonhidrat tanıyıcı proteinler aracılığıyla sağlanır [221].

Glikopolimerler için glikoz, galaktoz, mannoz, arabinoz, riboz, trehaloz, fruktoz, sialik asit veya fukoz gibi şekerler kullanılmaktadır. Belirli kanser türlerinin yüksek seviyelerde belirli hidrolitik enzimler, örneğin ön ilaçtan biyolojik olarak aktif bileşiği serbest bırakabilen galaktosidazlar, içermesi durumunda kullanılan şeker türü önemli olabilir. Diğer yandan, fruktoz glikopolimerleri, GLUT-5 (spesifik fruktoz taşıyıcısı) proteinini aşırı eksprese eden meme kanseri hücrelerinde iyi bir hücre içine alım elde etmek için kullanılırken, glikoza dayalı glikopolimerlerin, GLUT-1'in aşırı eksprese edildiği beyni hedeflemek için ideal araçlar olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [222–224]. Fruktoz bazlı glikopolimerler ve paklitaksel [225], doksorubisin [226], platin bazlı ilaçlar, rutenyum ilaçları [227], kurkumin [228] gibi ilaçlarla yapılan çalışmalarda, hücre alımı artırarak ilaç taşımına yardımcı olmuş ve böylece daha düşük dozda yüksek toksisiteye yol açmıştır.

2021 yılında yapılan bir çalışmada, poli(metilmetakrilat-*b*-(2-metakriloksietoksi)benzaldehit-*b*-fruktometakrilat) çinko(II)ftalosiyanın/Dox (P(MMA-*b*-MAEBA-*b*-FrucMA)-ZnPc/Dox) glikokonjugatında, ZnPc-N₃ bileşiği ile glikopolimer konjuge edilmiş olup, ayrıca pH duyarlı imin bağı aracılığıyla P(MAEBA) ünitelerine Dox bağlanmıştır (kısaca GNP_s-ZnPc/Dox olarak adlandırılır). GNP_s-ZnPc/Dox'un hücresel alımını ve antikanser etkinliğini belirlemek amacıyla *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Serbest Dox ile karşılaştırıldığında, glikopolimerle tedavi edilen insan meme kanseri hücreleri GLUT5'i hedef alarak daha yüksek antitümör aktivitesi göstermiştir [229].

Diğer bir çalışmada, amonafid-konjuge glikopolimerlerin oksim ligasyonu yoluyla nanokristallerin yüzeyine aşılmasıyla bir glikopolimer/nanokristal hibrit ilaç taşıyıcı sistemi hazırlanmıştır. Poli(1-*O*-metakrilolil-2,3:4,5-di-*O*-izopropiliden-β-d-fruktopiranoz)-*b*-poli(3-vinilbenzaldehit-*ko*-metilmetakrilat) glikopolimeri ile antikanser ilaç olan amonafid imin bağı ile bağlanmış, elde edilen amonafid-konjuge glikopolimerler daha sonra oksim ligasyonu yoluyla aminooksi-fonksiyonelleştirilmiş nanokristallerin yüzeyine aşılmasıdır. Hazırlanan hibrit ilaç taşıma sisteminin, amonafidi meme kanseri hücrelerine etkili bir şekilde ulaştırabildiği ve bu hücrelerin canlılığını önemli ölçüde inhibe edebildiği raporlanmıştır [230].

2.9 Teranostik Nanopartiküller (TNP)

Teranostik nanopartiküller, teşhis ve tedavi özelliklerini tek bir yapıda birleştirerek hastaya özel, kişiselleştirilmiş tedavi olanağı sunan çok fonksiyonlu nanosistemlerdir. Tedavi sırasında teşhis ve tedaviye yanıtı değerlendirme fırsatı sağlayarak, tek bir yaklaşımla etkili bir tedavi sürecinin oluşturulmasına olanak tanır. Görüntüleme ajanları ile farmasötik ajanların birlikte uygulanması, tedavi stratejisinin gerçek zamanlı olarak izlenmesini amaçlamaktadır. İdeal bir teranostik nanopartikül, insanlar için güvenli olmalı, hedeflenen bölgede hızlı ve seçici olarak birikebilme özelliği göstermelidir [231]. Bunlarla birlikte hastalığın biyokimyasal ve morfolojik karakterizasyonu hakkında bilgi verebilmeli, yeterli miktarda ilacı/ilaçları sağlıklı organlara zarar vermeden verimli bir şekilde hedeflenen bölgeye dağıtabilmeli ve saatler içinde vücuttan atılmalı veya biyolojik olarak toksik olmayan yan ürünlere parçalanabilmelidir [232].

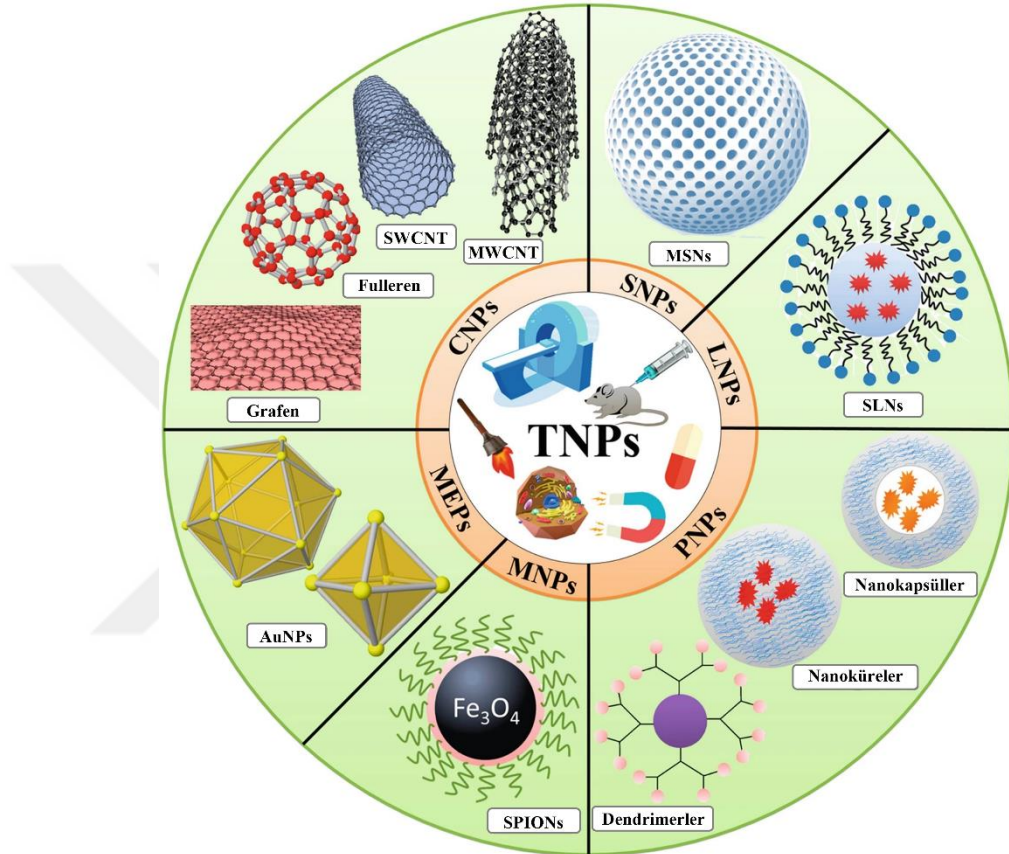
Teranostik terimi, terapi ve tanısal görüntüleme yöntemlerini birleştiren bir materyali tanımlamak amacıyla ilk kez 1998 yılında John Funkhouser tarafından ortaya atılmıştır [233]. Ancak bu yaklaşım, 50 yıldan uzun bir süredir tiroid hastalıklarının görüntülenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır. 1941'de Saul Hertz, ^{131}I 'i ilk defa hipertiroidizm hastalarında ve ardından tiroid kanseri hastalarında terapötik olarak uygulayan kişi olmuştur [234]. 1951 yılında ise ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), sodyum iyodür (^{131}I)'in tiroid hastalıkları olan bireylerde kullanımını onaylamıştır.

Biyolojik uygulamalar için nanopartiküller geliştirmek amacıyla kullanılan yenilikçi nanomalzemelerin sentezi ve mühendisliği, kanser hastalıklarında tanı ve tedaviyi önemli ölçüde artırmaya katkıda bulunmuş ve teranostik platformlarda kullanılacak sistemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Teranostik platformlar için nanopartiküllerin tasarımı genellikle iki veya daha fazla inorganik bileşenin, iki veya daha fazla organik bileşenin veya en azından her iki bileşen türünden birinin, optik ve elektriksel özellikler, termal kararlılık, manyetizma ve UV koruma özellikleri gibi belirli fizikokimyasal özelliklere sahip bir kombinasyonuna dayanır. Ortaya çıkan nanopartikül, bileşenlerinin basit bir karışımı değil, benzersiz özelliklere sahip bir nanoplatformdur.

Teranostik amaçlarla kullanılan çeşitli nanopartikül türleri bulunmaktadır (Şekil 2.22) [235]. Bunlar; karbon bazlı nanopartiküller (CNPs), metalik nanopartiküller (MEPs), manyetik nanopartiküller (MNPs), polimerik nanopartiküller (PNPs), lipid nanopartiküller (LNPs) ve silika bazlı nanopartiküller (SNPs) olarak sınıflandırılabilir.

Teranostik sistemlerde en sık kullanılan biyolojik görüntüleme ajanlarından biri de yarı iletken kuantum noktalarıdır (QD'ler). Bu yarı iletken nanokristaller, çeşitli biyolojik görüntüleme uygulamalarında analiz edilebilen ve kullanılabilen, izlenebilir sinyaller üreten Stokes kaymalı fotoluminesans sergileyebilir [236]. Ancak, QD'ler, fotoluminesans üretmek için ultraviyole (UV) ışığa ihtiyaç duymaktadırlar. UV veya daha kısa dalga boyuna sahip ışınımın kullanımındaki sınırlamalar ve riskler şunlardır; (I) dokuya sınırlı penetrasyon derinliği [237]; (II) ışığın saçılması ve otofloresan etkiler nedeniyle düşük sinyal-gürültü oranı; ve (III) kısa dalga boylu ışınımın uzun süreli maruz kalma sonucunda dokunun ve çevresindeki hücrelerin zarar görmesi veya ölmesi [238]. Son zamanlarda, düşük enerjili uyarım ışığını, örneğin yakın kızılötesi (NIR), yüksek enerjili emisyonlara dönüştürebilen, upconversion luminesans (UCL) özelliklerine sahip yeni nanoyapılar geliştirilmiştir [238]. Upconversion

nanopartiküllerin (UCNP) uygulamaları, diğer nanoyapılara kıyasla birçok avantaja sahiptir. Örneğin, NIR (700–1100 nm) uyarımı ile derin doku penetrasyonu sağlaması, NIR uyarım aralığında ışık saçılımının azalması ve otofloresansın olmaması nedeniyle daha iyi sinyal-gürültü oranı sağlanarak algılama hassasiyetinin önemli ölçüde artırılması ve NIR ışığının hücreler ve dokular üzerinde fotohasar riskini azaltması [239,240].



Şekil 2.22 : Kanser teşhis ve tedavisinde kullanılan farklı teranostik nanopartiküllerin şematik gösterimi [235]. (SWCNT: Tek duvarlı karbon nanotüp, MWCNT: çok duvarlı karbon nanotüp, AuNPs: altın nanopartiküller, SPIONs: süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller, SLNs: katı lipid nanopartikülleri, MSNs: mezoporöz silika nanopartiküller)

Genel olarak UCNP'ler üç bileşenden oluşur: kristalin bir konakçı matris, duyarlılaştırıcı olarak görev yapan bir soğurucu katkı maddesi (örneğin Yb^{3+} , Nd^{3+}) ve aktivatör görevi gören yayıcı katkı maddesi (örneğin Er^{3+} , Tm^{3+} ve Ho^{3+}) [241]. Örnek vermek gerekirse, duyarlılaştırıcı olarak Yb^{3+} içeren UCNP'ler 980 nm'de NIR ışığını emerken, Nd^{3+} içerenler 800 nm'de NIR ışığını emer. Aktivatörler açısından bakıldığında $NaYF_4:Yb^{3+},Er^{3+}$ ve $NaYF_4:Yb^{3+},Tm^{3+}$ UCNP'lerin 980 nm'de uyarılma sonucu sırasıyla yeşil/kırmızı ışık ve UV/mavi ışık yaydığı görülmektedir [242].

UCNP'lerin sentezlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan UCNP sentez yöntemleri şunlardır: termal dekompozisyon, hidrotermal/solvotermal, sol-jel, termoliz, eş çöktürme (kopresipitasyon) [238]. Termal dekompozisyon yönteminde, metalik öncüller yüksek kaynama noktalı bir çözücüde (genellikle oleik asit veya oktadeken) çözülür ve yüksek sıcaklıklarda ayrışmaya bırakılır. Hidrotermal/Solvotermal yöntemde, metal tuzlarının su veya diğer çözücüler içinde yüksek sıcaklık ve basınç altında kristalleşmesi sağlanır. Bu iki yöntemde, saf ve yüksek kristalli ürünler elde etmek için yüksek basınç ve sıcaklık uygulanır. Sol-jel yönteminde, metal oksit veya metal tuzlarının hidrolizi ve yoğunlaşmasıyla UCNP'lerin sentezlenmesi sağlanır. Kopresipitasyon yönteminde ise, homojen bir çözeltide pozitif ve negatif yüklü iyonların çökeltme reaksiyonu ile bir araya gelerek tekdüze UCNP'lerin oluşması sağlanır.

Kristal matrisli lantanit (Ln) katkılı UCNP'ler, yanıp sönmeyen parlama, yüksek biyoyoumluluk, düşük sitotoksisite ve en aza indirilmiş fotoağartma gibi özellikleri nedeniyle görüntüleme ve ilaç/gen iletimi uygulamaları için iyi adaylardır. Yüzey modifikasyonu ve fonksiyonelleştirme kolaylığı, bu nanopartiküllerin kemoterapi, gen terapisi, fotodinamik terapi, fototermal terapi ve protein bazlı terapi gibi çeşitli biyomoleküllere veya reaktiflere bağlanmasına olanak tanır [243,244].

Bir çalışmada [245], grafen oksitler (GO) başlangıçta PEG ile modifiye edilip ardından PEG'e PEI bağlanarak NGO-PEG-PEI ilaç taşıyıcı sistemi geliştirilmiştir. Bu süreçte, amino-fonksiyonlandırılmış UCNP'ler (UCNPs-NH₂), 3,3'-ditiyodipropiyonik asit ile tepkimeye sokulmuş ve ardından PEI ile reaksiyona girerek GO ve UCNP'ler arasında disülfid bağı oluşturulmuştur. GO yüzeyinde bol miktarda aromatik grup bulunması, Dox'un $\pi-\pi$ etkileşimleri yoluyla nanopartiküllere yüklenmesini sağlamıştır. GO'nun fototermal tedavi potansiyeli sayesinde, nanokompozit çözeltisinin sıcaklığı, 808 nm NIR lazer ile 3 dakika içinde hızla 65 °C'ye ulaşmıştır. Fototermal tedavi ile Dox bazlı kemoterapinin bu kombinasyonu, hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde üstün sonuçlar elde edilmesini sağlamış, ayrıca nanosistem biyogörüntüleme amacıyla da başarılı olmuştur.

Bir diğer çalışmada [246], UCL nanoparçacıklarına manyetik özellik kazandırmak için UCNP ve Fe₃O₄ nanopartikülleri birleştirilmiştir. Elde edilen nanoparçacıklar, ilaç taşıma ve çok modlu biyogörüntüleme için araştırılmıştır. Fe₃O₄ nanopartiküllerini UCNP'lerin içine kapsüllemek için, UCNP'ler mSiO₂ ile kaplanmış ve Fe₃O₄

nanopartikülleri $mSiO_2$ 'nin gözenekli yapısına yüklenmiştir. Hazırlanan $NaYF_4:Yb,Er@mSiO_2@Fe_3O_4-PEG$ (MFNP'ler) aynı anda UCL ve MRI görüntüleyebilirken, ilaç taşıyıcısı manyetik olarak hedeflenebilmektedir. Sentezlenen MFNP'lerin geri döndürülemez partikül kümelenmelerini engellemek, sudaki stabilitesini arttırmak ve biyouyumluluğunu iyileştirmek için süksinimidil karbonatla sonlandırılmış-PEG kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, MFNP'lerin hem çift modlu UCL/MRI için bir kontrast madde olarak kullanılabileceğini hem de manyetik hedefleme yoluyla Dox'un hedef bölgeye taşınmasına yardımcı olabileceğini göstermektedir.

2.10 Fototermal Terapi ile Kanser Tedavisi (PTT)

Fototermal terapi, esas olarak fotosensitizör olarak da bilinen ışık emici bir maddeye dayanan, radyo frekansı, mikrodalgalar, yakın kızılötesi veya görünür ışık gibi elektromanyetik radyasyonla uyarıldığında enerjiyi emebilen ve ısıya dönüştürebilen minimal invaziv, lokal bir tedavi yöntemidir. Biyolojik ortamlarda, aşırı ısınmış bir ortam hipertermiye yol açabilir ve bu durum, protein agregasyonu ve denatürasyonu, sitozolün buharlaşması ve canlı hücrelerin lizisi gibi çeşitli zararlı etkilere neden olabilir [247]. Perez-Hernandez ve ark. (2015) fototermal tedavinin nekrotik hücre ölümü yerine içsel yolu aktive ederek programlanmış hücre ölümünü indüklediğini belirlemiştir [248]. Bu nedenle fototermal tedavi kanser tedavisinde güvenilir ve güçlü bir tedavi yöntemidir. Fototermal ajanlar çeşitli kategorilere ayrılmaktadır; (i) indosiyanın yeşili ve heptametin siyanin gibi organik boyalar; (ii) organik yarı iletken polimerik nanopartiküller ve porfirin-lipit konjugat yapılar olan porfizomlar gibi organik nanopartiküller; (iii) altın nanopartiküller; (iv) karbon nanotüpler ve grafen oksit gibi karbon bazlı nanoyapılar; ve (v) metal oksit nanopartiküller ve kuantum noktaları gibi diğer inorganik materyaller [249]. Fototermal ajanlar arasında organik nanomalzemeler, genellikle iyi biyouyumluluğa ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahiptir; ancak düşük fototermal dönüşüm verimliliği, zayıf fototermal kararlılık ve karmaşık sentez gibi doğal sınırlamalara da sahiptirler. Buna karşılık, inorganik nanomalzemeler genellikle mükemmel NIR ışık emilimi, dar emisyon spektrumları gibi optik özellikleri sayesinde yüksek fototermal verimlilik ve fotostabilite sunar. Ayrıca, karboksilik, hidroksil ve epoksi grupları gibi farklı fonksiyonel gruplarla sentez kolaylığı ve yüzey modifikasyonu gibi avantajlar sunan yapısal özelliklere

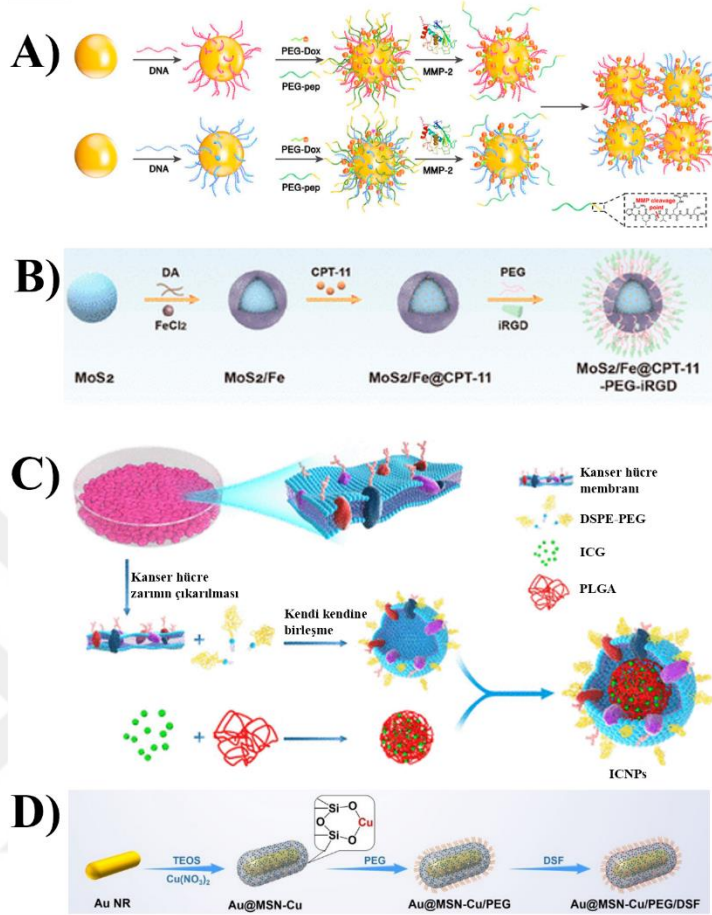
sahiptirler. Ancak, biyolojik olarak parçalanamayan yapıları ve olası uzun vadeli toksisiteleri bu malzemelerin dezavantajları arasında yer almaktadır [250].

Yang ve arkadaşları [251], görüntüleme rehberliğinde kombine tedavi amacıyla matriks metalloproteinaz (MMP) yanıtı AuNP'lere (Şekil 2.23A) dayalı bir nanoplatform bildirmiştir. AuNP'ler tamamlayıcı DNA zincirleri ile aşılındı, doksorubisin ile bağlandı ve sırasıyla ısıya dayanıksız (termo-labil) bir bağlayıcı ve bir MMP-parçalanabilir peptit aracılığıyla PEG ile kaplandı. Nanoprobolar sağlıklı dokularda iyi izole edilmiş halde kaldılar, ancak MMP'nin bol olduğu koşullar altında hızla agregatlar oluşturmuştur. DNA hibridizasyonu ile indüklenen nanoproboların bir araya getirilmesi, tümör bölgesinde uzun süre tutulma ve güçlü yakın kızılötesi (NIR) emilim sağlamış; bu da derin doku görüntüleme ve tedavi için avantajlı olmuştur. Sentezlenen nanoplatform NIR ışınım altında lokal sıcaklık artışına yanıt olarak doksorubisin hızla serbest bırakılarak sinerjik bir kemo-fototermal tedavi sağlanmıştır.

Li ve diğerleri [252], 40-48 °C aralığında etkili bir fototermal terapi sağlamak amacıyla MoS₂ nanopartiküllerini çekirdek olarak kullanmış, yüzeylerini dopamin (DA) ile modifiye ettikten sonra CPT-11 (irinotekan, topoizomera 1 inhibitörü) ve Fe²⁺ iyonları ile yüklemişlerdir (Şekil 2.23B). Bu nanoplatform, tümör özgüllüğünü artırmak amacıyla PEG ve iRGD ile de modifiye edilmiştir (MoS₂/Fe@CPT-11-PEG-iRGD). Nanoplatform, tümör hücreleri tarafından spesifik olarak alındığında, lazer ve asit ile tetiklenen CPT-11 salınımı hücre içi H₂O₂ seviyesini artırmış, nanoplatformdan salınan Fe²⁺ iyonları lipid ROS üretimini katalize etmiş ve ferroptosis sürecini aktive etmiştir. Bu mekanizmalar doğrultusunda, MoS₂/Fe@CPT-11-PEG-iRGD nanoplatformunun, PTT, ferroptosis ve kemoterapinin kombine etkisi ile tümör hücre ölümünü tetiklediği ve *in vivo* tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir.

Chen ve arkadaşları [253], teranostik bir nanoplatform olarak kanser hücresi zarıyla kaplanmış ve ICG yüklü nanopartikül (ICNP) sistemi geliştirmiştir (Şekil 2.23C). Bu nanopartikül sistemi hazırlanırken, PEG'lenmiş fosfolipitler (DSPE-PEG) kanser hücresi zarı ile hibrit hale getirilmiş ve ardından ICG yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerik çekirdeği bu zarla kaplanmış. Çekirdek-kabuk yapısına sahip olan bu nanoplatform, iyi bir fototermal verimlilik sunmuş ve kanser hücresi zarlarının homolog özelliklerini taşıdığı için kanser hücrelerine özgü bir hedefleme göstermiştir.

NIR lazer ile uyarıldığında, ICNP'ler ksenogreftlenmiş tümörlerin ortadan kaldırılmasında oldukça etkili bir fototermal tedavi sunmuştur.



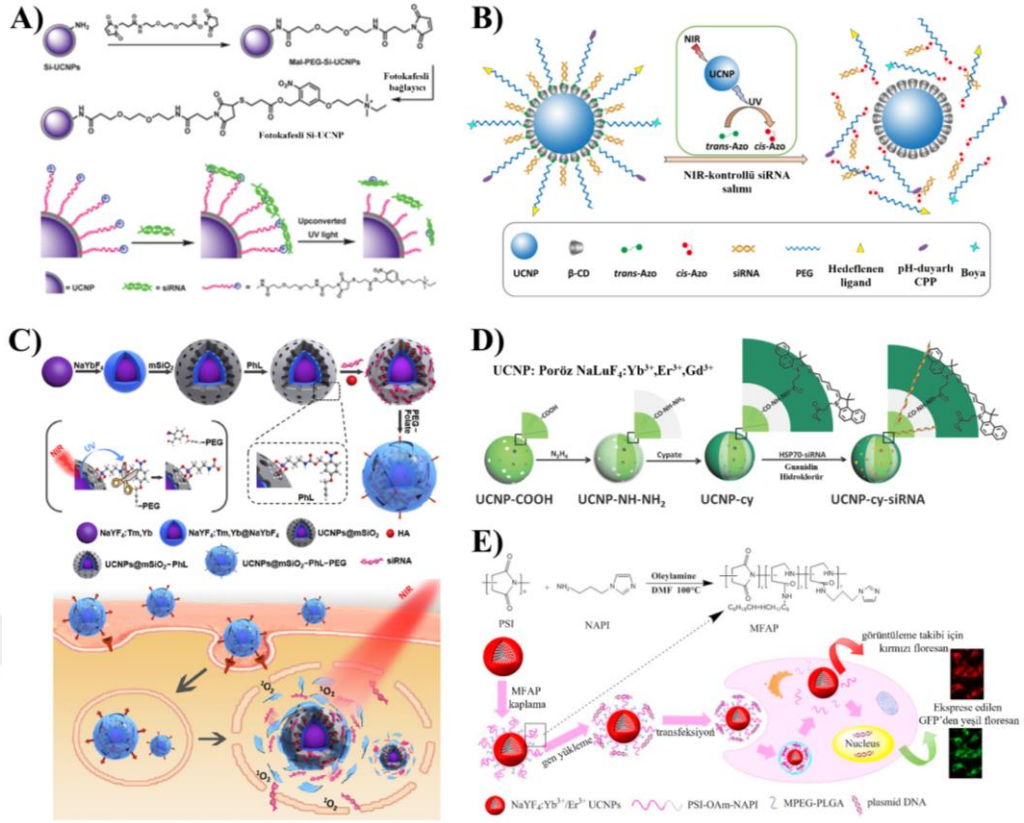
Şekil 2.23 : A) Tümör bölgesinde PTT'yi artırmak için AuNP'lerin MMP ile indüklenen agregasyonunun şematik gösterimi [251]. B) MoS₂/Fe@CPT-11-PEG-iRGD nanoplatformunun sentez süreci [252]. C) İndosiyanin yeşili (ICG) yüklü ve kanser hücre zarı kaplı nanopartikülün (ICNP) hazırlanmasının şematik gösterimi [253]. D) Au@MSN-Cu/PEG/DSF nanoplatform sentezinin şematik gösterimi [254].

Zhou ve diğerleri [254], şekil 2.23D'de gösterildiği gibi fototermal olarak tetiklenen bir nanoplatform (Au@MSN-Cu/PEG/DSF) geliştirmiştir. Lazer ışınımı altında, Au@MSN-Cu/PEG/DSF, mükemmel bir fototermal dönüşüm kapasitesi göstererek disülfiramın (DSF) serbest bırakılmasını sağlamış ve in situ olarak Cu²⁺ ile şelatlanarak yüksek sitotoksisiteye sahip bis(dietilditiokarbamat)bakır (CuET) bileşimini oluşturmuştur; bu da hücre apoptozuna yol açmıştır. Ayrıca, oluşan Cu⁺ türleri toksik mitokondriyal protein agregasyonunu teşvik ederek hücrelerde cuproptozise yol açmıştır. Fototermal tedavi ile sinerjik etki gösteren Au@MSN-Cu/PEG/DSF, tümör hücrelerini etkili bir şekilde öldürebilmiş ve tümör büyümesini %80'e varan bir oranda engelleyebilmiştir.

2.11 Gen Terapisi ile Kanser Tedavisi

Gen tedavisi genel olarak, bir gen ürününün ifadesini değiştirmek veya canlı bir hücrenin biyolojik özelliklerini manipüle etmek için genetik materyalin uygulanması ve bu değişikliklerin belirli hastalıkları tedavi etmeyi amaçlamasıdır [255]. Gen tedavisinde yabancı genetik materyal (DNA veya RNA gibi) bir taşıyıcı aracılığıyla hedef hücrelere girer ve ardından gen düzenleme, gen ekspresyonu veya gen susturulması gerçekleşir [256].

Son zamanlarda, çoklu ilaç direncini ortadan kaldırmak ve kemoterapinin etkinliğini artırmak amacıyla kemoterapötiklerin ve nükleik asitlerin bir arada taşınmasına yönelik stratejiler geliştirilmektedir [257–259]. siRNA ve miRNA gibi oligonükleotid tedavileri genellikle spesifik yolları düzenleyen genleri susturmaya odaklanır, böylece kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaçlara karşı direnci azalır ve sitotoksik etkinlik artar [260–263]. Şu ana kadar sınırlı sayıda FDA onaylı oligonükleotid ilaç piyasaya sunulmuştur [264]. Bu durumun başlıca nedenleri; çıplak siRNA ve miRNA'nın RNA enzimleri tarafından hızla parçalanması nedeniyle hedef tümör bölgesine ulaşamaması, düşük stabiliteye sahip olması ve hedef dışı etkileşimlere girmesidir [265,266]. Bu nedenle siRNA temelli gen tedavilerinde çeşitli biyoyumlu taşıyıcı nanoplatformlar kullanılmaktadır [267–269]. Anti-apoptotik bir protein olan Bcl-2, meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde aşırı miktarda üretilmektedir [270]. Bu aşırı ekspresyon, hücrelerin kemoterapötiklere yanıt olarak apoptozu başlatmasını önleyerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar ve tümör metastazına neden olur. Bu nedenle, Bcl-2 inhibisyonu terapötik bir hedef olarak araştırılmaktadır. Dox ve Bcl-2 siRNA'nın dendrimer modifiyeli mezogözenekli silika nanopartiküller aracılığıyla hedef bölgeye taşınması, Dox ve Bcl-2 siRNA'nın ayrı ayrı verilmesine kıyasla önemli ölçüde artmış tümör hücresi apoptozu ile sonuçlanmıştır [271]. Benzer şekilde, düşük doz doksorubisin ve sisplatin ile bir BH-3 mimetik ilacının kombinasyonu, kemoterapi direncini aşmak ve kanser hücrelerini kemoterapik ajanlara karşı duyarlı hale getirmek için etkili bir şekilde uygulanmıştır [272]. Başka bir çalışmada, Bcl-2 siRNA ve Dox'un kitosan bazlı bir taşıyıcı sistem aracılığıyla taşındığı ve bunun hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak artan tümör inhibisyonu gösterdiği bildirilmiştir [273].



Şekil 2.24 : A) siRNA yüklü katyonik fotokafesli Si-UCNP'lerin sentez süreçleri ve NIR uyarımı ile siRNA salımının şematik gösterimi [274]. B) Azobenzenin NIR ile tetiklenen trans-cis fotoizomerizasyonu ve bunu takiben siRNA salımının gösterimi [275]. C) UCNP nanokapsüllerinin sentezi ve NIR kontrollü siRNA iletiminin şematik çizimi [276]. D) UCNP-cy-siRNA sentezinin şematik gösterimi [277]. E) MFAP kaplı gen nanokapsüllerinin sentezi ve gen iletiminin gerçek zamanlı lüminesans takibinin şematik gösterimi [278].

Yang ve arkadaşları, Şekil 2.24A'da gösterildiği gibi siRNA taşıyıcı sistemi olarak silika kaplı upconversion nanopartikülleri (Si-UCNP'ler/siRNA) geliştirdiler. Bu çalışmada, hedef gen ekspresyonunun susturulmasını sağlamak amacıyla NIR ışığına duyarlı siRNA salımı ve bu taşıyıcı sistemin konakçı canlı hücrelerdeki dağıtımını ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir [274]. Yb³⁺/Tm³⁺ katkılı NaYF₄ nanokristalleri üzerine amino grupları içeren silika kaplama yapılmış ve siRNA yüklemesi için katyonik fotokafesli bir bağlayıcı ile modifiye edilmiştir. Negatif yüklü siRNA, katyonik bağlayıcı ile elektrostatik olarak etkileşerek etkin bir şekilde yüklenmiş ve NIR ışığı ile hedef hücrelerde başarılı bir şekilde salınmıştır. Optimal yükleme oranı (15:1) ile yüksek hücresel alım sağlanmış, NIR ışığı uyarımı ile siRNA'nın serbest bırakılması ve hedef genin susturulması gerçekleştirilmiştir. Bu nanoplatformun, kontrollü siRNA iletimi için güvenli bir yöntem olduğu ve canlı hücrelerde fotohasarı minimuma indirdiği gösterilmiştir.

Chen ve ark., siRNA taşıyıcısı olarak işlev gören ve NIR kontrollü salım yapabilen UCNP-(CD/Azo)-siRNA/PEG-GE11/TH/Cy5 nanotaşıyıcısı geliştirmişlerdir (Şekil 2.24B) [275]. $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ ’den oluşan amin fonksiyonlu UCNP’lerin (NH_2 -UCNP) yüzeyi β -siklodekstrin (CD) ile işlevselleştirilmiş ve ardından azobenzen ile konjüge edilmiş siRNA ve PEG ile modifiye edilmiştir. Bu modifikasyon, canlı hücrelerde siRNA’nın mekânsal ve zamansal olarak aktive edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. NIR ile aktive edilen UCNP’ler, azobenzenin trans-cis fotoizomerizasyonu sayesinde UCNP-(Azo/CD)-PEG NP’lerinden siRNA salımını hassas bir şekilde kontrol etmiştir. Ayrıca, hem 2D tek katmanlı hücre modelinde hem de 3D MCTS modelinde NIR ışığı tarafından kontrol edilen gen baskılanması gözlemlenmiştir.

Zhang ve ark. (Şekil 2.24C), NIR ışığı ile etkili siRNA iletimi ve kontrollü salımı için UCNP’ler kullanarak foto-yırtılabilir polimer bantla sarılmış nanokapsül (UCNPs@mSiO₂-PhL-PEG) tasarlamışlardır [276]. Modifiye UCNP’lerin ve NIR ışınımının etkilerini araştırarak, bu sistemin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretmek ve siRNA salımını sağlamak üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Hücre içindeki ROS üretimi, siRNA’nın endozomal kaçışını destekleyerek gen tedavisi verimliliğini artırırken, aynı zamanda organelleri tahrip ederek hücre apoptozunu tetiklemiştir. Foto-yırtılabilir bantla sarılmış nanokapsüller, RNAi verimliliğini önemli ölçüde artırarak *in vivo* ortamda hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini spesifik bir şekilde inhibe etmiştir.

Wang ve diğerleri, Şekil 2.24D’de gösterildiği üzere, Yb^{3+} , Er^{3+} ve Gd^{3+} ile doplanmış cypate ile konjüge edilmiş gözenekli NaLuF₄’ü sentezlemiş ve onkoterapiye rehberlik etmesi için bu nanosistemin upconversion ışınımı/manyetik rezonans çift modlu moleküler görüntüleme potansiyelini test etmiştir [277]. Cypate-konjüge edilmiş upconversion nanopartikülleri (UCNP-cy) ile ısı şok proteini 70 (HSP70) genine karşı siRNA (UCNP-cy-siRNA) yüklenmesi, hücre hasarını artırmaktadır. UCNP-cy-siRNA, gen susturması ve fototermal tedavinin sinerjik etkileri sonucunda *in vivo* olarak dikkat çekici antitümör etkinlik sergilemiş, düşük ilaç dozu ve minimal yan etkilerle etki göstermiştir.

Bai ve arkadaşları, pozitif yüklü, amfifilik ve biyoyumlu bir polimerle kaplanan UCNP’leri kullanarak, upconversion ışınımı eşliğinde gen dağıtımının gerçek zamanlı takibini sağlamak amacıyla UCNPs@MFAP/pDNA kompleksi adı verilen çok

fonksiyonlu bir nanokapsül geliştirmişlerdir (Şekil 2.24E) [278]. UCNP'lerin kırmızı ışınımı, nanovektörün konumunu gerçek zamanlı izlemek için kullanılırken, plasmid DNA'nın yeşil floresan proteini genin etkili bir şekilde iletimini ve başarılı transfeksiyonunu sağlamıştır. Sonuç olarak, elde edilen nanokapsüller düşük sitotoksiste, geniş bir pH aralığında yüksek stabilite ve önemli düzeyde gen yükleme kapasitesi göstermiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalar, pDNA'nın başarılı bir şekilde gen transferini ve dağıtım sürecinin gerçek zamanlı UC ışınımı ile takibini ortaya koymuştur.

2.12 Kombinasyon Kanser Tedavisi

Son yıllarda malzeme bilimi ve mühendisliği ile teknolojiye ilerlemeler, kanser tedavisinde yeni tedavi seçeneklerinin ortaya çıkmasına neden oldu. Bunların içerisinde fototermal terapi, gen terapisi, fotodinamik terapi ve immünoterapi bulunmaktadır. Bu tedaviler, invaziv olmama, yüksek hassasiyet ve özgüllük, sağlıklı doku ve organlara verilen hasarın azaltılması ve minimal ilaç direnci gibi benzersiz avantajlar sunmaktadır. Uygun bir kombinasyon, farklı tedavileri tek bir platformda entegre etmeli ve birbirlerinin etkilerini artırmalı, böylece bireysel tedavilerin etkilerinden daha ağır basan, güçlendirilmiş bir sinerjik etki yaratmalıdır. Bu konsept, fototermal MoS₂ nanopartikülü ve gen vektörü olarak kullanılan 5. nesil (G5) poli(amidoamin) dendrimerlerin entegrasyonu ile geliştirilmiş G5-MoS₂ adlı fototermal gen taşıyıcısını içeren, Bcl-2 siRNA ile yapılan bir antikanser gen terapisi ve fototermal tedavi çalışması örneği ile açıklanabilir [279]. *In vitro* hücre canlılık testi verileri, lazer ışınımı altında G5-MoS₂/Bcl-2 siRNA polipleksleri ile tedavi edilen hücrelerin yaşama oranının %21,0 olduğunu göstermektedir; bu oran, yalnızca fototermal tedavi (%45,8) veya yalnızca gen tedavisi (%68,7) uygulanan diğer gruplara göre çok daha düşüktür. Kombinasyon tedavisinden elde edilen sonuçlar, iki ayrı tedavi yöntemine kıyasla dikkat çekici bir sinerjik etki göstermiştir. Bu sinerjik etkiyi gösteren bir diğer örnek [280], meme kanseri hücrelerine yönelik çok işlevli bir nanoterapötik sistem olarak altın nanorodlarla fototermal terapi ve siPKM2 ile gen tedavisinin birlikte uygulanmasını içermektedir. Gen tedavisi ve PTT ayrı ayrı uygulandığında hücre canlılığı yaklaşık %60'a düşerken, bu terapötik uygulamalar birleştirildiğinde daha yüksek bir öldürme etkinliği göstererek hücre canlılığı %20'lere düşmüştür. Ayrıca başka bir çalışmada [281], altın nanorodlar (kullanılarak HeLa

hücrelerine karşı miR-192'nin fototermal olarak verilmesi %100'lük kayda değer bir öldürme etkisi gösterirken, buna karşın bireysel tedavi %50'den fazla verimliliğe ulaşamamıştır.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Malzemeler ve Kullanılan Cihazlar

3.1.1 Malzemeler

3-Bromopropilamin hidrobromür (Sigma-Aldrich, %98,0), sodyum azid (Merck, \geq %99,0), potasyum hidroksit (Isolab, \geq %85,0), magnezyum sülfat (Isolab, \geq %85,0), sodyum metoksit (Merck, \geq %96,0), susuz metanol (Sigma-Aldrich, %99,8), elementel kükürt (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), benzil klorür (Merck, \geq %99,0), dietileter (Sigma-Aldrich, \geq %99,5), hidroklorik asit (HCl, Merck, EMPLURA \geq %32,0), sodyum hidroksit (ACS Reagent, \geq 97 pellet), potasyum ferrisiyanür (Sigma-Aldrich, %99,0), 4,4'-azobis(4-siyano pentanoik asit) (Sigma-Aldrich, \geq %98,0), etil asetat (EtOAc, Isolab, \geq 99,7% LC-MS için), n-hekzan (Isolab, \geq %96,0), trimetilsillil propargil alkol (Merck, \geq %99,0), 4-dimetilaminopiridin (DMAP, Sigma-Aldrich, ReagentPlus, \geq 99%), tetrahidrofuran (THF, Sigma-Aldrich, \geq %99,9), disikloheksil karbodiimid (DCC, Sigma-Aldrich, \geq %99,0), sülfürik asit (Merck, EMPROVE, %95-98), D-fruktoz (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), aseton (Isolab, \geq %99,5), diklorometan (Sigma-Aldrich, HPLC için \geq %99,8), piridin (EMSURE ACS Reagent, Merck, \geq %99,5), metakrilik anhidrit (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), 3-hidroksitiramin hidroklorür (Sigma-Aldrich, \geq %98,0), metakriloil klorür (Sigma-Aldrich, \geq %99,9), trietilamin (Et3N, Sigma-Aldrich, \geq %99,0), *ter*-butildimetilsillil klorür (Sigma-Aldrich, %97,0), 1,8-diazabisiklo[5.4.0]undek-7-en (DBU, Sigma-Aldrich, %98,0), asetonitril (Merck, likit kromotografi için \geq %99,9), kloroform (Sigma-Aldrich, \geq %99,4), klorotrimetilsilan (Merck, %98,0), dimetilsülfoksit (DMSO, Merck, ACS reagent, \geq %99,9), amonyum klorür (NH₄Cl, Sigma-Aldrich, \geq %99,5), furfural (Sigma-Aldrich, %99,0), p-toluensülfonik asit (Merck, ACS reagent, \geq %98,5), benzen (Merck, \geq %99,0), etilen glikol (Merck, %99,8), amonyum bikarbonat (NaHCO₃, Sigma-Aldrich, \geq %99,9),

maleik anhidrit (Sigma-Aldrich, %99,9), toluen (Merck, EMSURE, analiz için), petrol eteri (Sigma-Aldrich, \geq %99,5), etanolamin (Sigma-Aldrich, \geq %98,0), L-Lizin (Merck, \geq %98,0), *ter*-bütanol (ACS Reagent, \geq %99,0), di-*ter*-bütül-dikarbonat (Merck, \geq %99,0), sodyum bisülfat (Sigma-Aldrich, ReagentPlus, \geq %99,0), sikloheksilamin (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), trifosgen (Sigma-Aldrich, %98,0), α -pinene (Sigma-Aldrich, %99,0), *N*-Boc-L-lisin (Merck, \geq %99,0), difosgen (Sigma-Aldrich, %98,0), dimetilformamid (DMF, Sigma-Aldrich, \geq %99,8), 2,2'-azobis(2-metilpropionitril) (AIBN, Sigma-Aldrich, \geq %99,8), floresein O-metakrilat (Sigma-Aldrich, \geq %95,0), tetra-*n*-bütülamonyum florür (TBAF, Sigma-Aldrich, \geq %99,0), N,N,N',N'',N'''-pentametil dietilen triamin (PMDETA, Sigma-Aldrich, %99,0), bakır bromür (CuBr, Merck, %99,9), nötral alümina (Al₂O₃, Sigma-Aldrich), trifloroasetik asit (TFA, Sigma-Aldrich, Reagentplus® %99,0), susuz demir(III) klorür (FeCl₃, Sigma-Aldrich, Reagent %97,0), demir sülfat heptahidrat (FeSO₄.7H₂O, Sigma-Aldrich, %98,0), amonyum hidroksit (Merck, \geq %99,0), etanol (Isolab, \geq %99,5), demir(III) klorür hegzahidrat (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), sodyum oleat (Alfa Aesar, \geq %99,0), oleik asit (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), 1-oktadeken (Merck, %95,0), itriyum(III) oksit (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), iterbiyum(III) oksit (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), erbiyum(III) oksit (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), sodyum trifloroasetat (Sigma-Aldrich, %98,0), itriyum klorür (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), iterbiyum klorür (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), erbiyum klorür (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), itriyum asetat (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), iterbiyum asetat (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), erbiyum asetat (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), iterbiyum(III) klorür hegzahidrat (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), erbiyum(III) klorür hegzahidrat (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), iterbiyum asetat (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), erbiyum asetat (Sigma-Aldrich, \geq %99,0), amonyum florür (NH₄F), hegzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB, Sigma-Aldrich, \geq %99,0), tetraetil ortosilikat (TEOS, Merck, %98,0), moleküler sieve (4Å, Merck) ve amonyum nitrat (NH₄NO₃, Sigma-Aldrich, %98,0) satın alındı ve saflaştırılmadan kullanıldı.

Diyaliz membranı (3.5 kDa) Repligen'den alındı. Doksorubisin hidroklorür (Dox) Deva Holding A.Ş. tarafından temin edildi. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliyum bromid (MTT), fosfat bovine serum tampon çözeltisi (PBS, tablet 100 mL için) invitrogen'den temin edildi. DMEM/F12 (1:1) (1X) (Gibco, MA, ABD), %0.25 trypsin ve %0.02 EDTA (PAN-Biotech, Bavyera, Almanya), direct-zol RNA Saflaştırma Kiti (Zymo Research, Irvine, CA, ABD), anti-apoptotik ve pro-apoptotik

genler (Bcl-2, Bcl-X, MCL-1, BAX, BAD, NOXA ve ACTB) (Tablo 3.1), ksilazin (Rompun, Bayer Healthcare SA, Kiel, Almanya), ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye), Bcl-2 poliklonal antikor (PA5-27094/ 1:50), Bax monoklonal antikor (6A7-MA5-14003/ 1:100), AEC çözeltisi (Thermo Scientific Fisher REF: TA-125-HA) satın alındı ve kullanıldı.

Tablo 3.1 : Seçilen anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin listesi (sırasıyla referans gen, anti-apoptotik ve pro-apoptotik genler), mRNA erişim numaraları, primerler ve ampikon boyutları (bp, baz çifti).

Gen Sembolü	Gen Adı	Erişim Numarası	İleri Primer	Ters Primer	bp
ACTB	Actin beta	NM_001101	CATGTACGTTGC TATCCAGGC	CTCCTTAATGTC ACGCACGAT	250
Bcl-2	B-hücreli lenfoma 2	NM_000633	TGTGGCCTTCTT TGAGTTC	CGGTCAGGTA CTCAGTCATC	108
Bcl-X	B-hücreli lenfoma-ekstra büyük	NM_001191	GAGCTGGTGGT TGACTTTCTC	TCCATCTCCGAT TCAGTCCCT	119
MCL-1	İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşması	NM_001197 320	TCGAGTGATGA TCCATGTTTTTC	TAACTAGCCAG TCCCGTTTTGT	182
BAD	Bcl-2 hücre ölümünün ilişkili agonisti	NM_004322	AGTCGCCACAG CTCCTACC	CACAAACTCGT CACTCATCCTC	156
BAX	Bcl-2 ilişkili X, apoptoz düzenleyici	NM_001291 428	TCTGACGGCAA CTTCAACTG	TTGAGGAGTCTC ACCCAACC	188
NOXA	Forbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein 1	NM_001382 615	TGATATCCAAA CTCTTCTGC	ACCTTCACATTC CTCTCAA	142

3.1.2 Kullanılan cihazlar

Reaksiyonlar, HEIDOLPH Labortechnique ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile gerçekleştirilmiş, ardından elde edilen ürünlerin çözücüleri HEIDOLPH Labaroto döner buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırıldı. Saflaştırma süreçlerinin tamamlanmasının ardından ürünlerin kurutulması VACUCELL vakum inkübatörü ile sağlandı. ¹H-NMR analizleri, 500 MHz Bruker NMR cihazında, CDCl₃ ve DMSO-*d*₆ çözücüleri kullanılarak yapıldı. Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektrumları, platin-ATR aksesuarı (ZnSe kristali) ile donatılmış ALPHA Bruker spektrometresinde kaydedildi. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizleri, bir pompa ve Viscotek VE 3580 refraktif indeks (RI) dedektöründen oluşan Viscotek GPCmax VE 2001 Autosampler sistemi ile gerçekleştirildi. Sistem, seri olarak bağlanmış üç Viscotek

GPC kolonu (T3000, LT4000L, LT5000L) ve bir Viscotek koruma kolonu (CLM3008) içermektedir. Ölçümler 35 °C'de, 1,0 mL/dakika akış hızında gerçekleştirilmiş ve çözücü olarak THF kullanılmıştır. Dedektör, dar molekül ağırlığı dağılımına sahip PS standartları ile kalibre edildi, veriler ise Viscotek OmniSEC 4.7.0 yazılımı kullanılarak değerlendirildi. DMF-GPC analizleri, TOSOH EcoSEC/GPC sistemi ile yürütüldü. Bu sistemde, kırılma indeksi (RI), UV, dinamik ışık saçılımı (DLS) için Wyatt Dynapro Nanostar, ve çok açılı lazer ışığı saçılım dedektörü (MALLS dedektörü, Wyatt Teknoloji, Santa Barbara, CA, ABD) bulunmaktadır. Mobil faz olarak, N,N-Dimetilformamid (0,01 M LiBr/DMF) kullanılmış ve analizler 50 °C'de, 0,5 mL/dakika akış hızında gerçekleştirildi. DMF-GPC analizleri için TSKgel HHR guard kolonu, G3000 HHR ve G5000 HHR kolonlarından (7,8 mm ID x 30 cm) yararlanıldı. Nanopartiküllerin ortalama boyutları ve boyut dağılımları, 633 nm dalga boyunda çalışan ve 25 °C'de ölçüm yapan bir Malvern NanoZSP dinamik ışık saçılım (DLS) spektrometresi ile belirlendi. Bu ölçümler, dH₂O içinde 173° ölçüm açısında gerçekleştirildi.

3.2 Başlatıcıların ve Momomerlerin Sentezi

3.2.1 Halka açılma polimerizasyonunda kullanılan başlatıcı 1-azido-3-amino propan sentezi

Halka açılma polimerizasyonunda kullanılacak olan 1-azido-2-amino propan bileşiği literatürde tarif edilen prosedüre göre sentezlendi [276]. Bunun için 3-bromopropilamin hidrojen bromür (4 g, 30.8 mmol) ve sodyum azid (6 g, 92.3 mmol) 30 mL deiyonize su ile çözülerek 80 °C'de geri soğutucu ve azot atmosferi altında 24 saat karıştırıldı. Reaksiyon süresi sonunda karışım buz banyosu içerisine alınarak sıcaklık 10 °C'ye düşürüldü ve çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı. Sonrasında karışıma deiyonize su (150 mL) ve potasyum hidroksit (4 g, 0.1 mol) ilave edilerek organik faz 50 mL dietileter ile 3 kez ekstrakte edildi. Ürün magnezyum sülfat üzerinden kurutularak süzgeç kağıdı ile süzüldü. Çözücü vakum altında uzaklaştırılarak açık sarı renkli sıvı ürün elde edildi. Elde edilen ürün vakum distilasyonu ile ileri bir saflaştırma yapılarak halka açılma polimerizasyonunda (ROP) kullanılmak üzere, üzerine molekül eleği eklendikten sonra -20 °C'de muhafaza edildi. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz,

CDCl₃, δ): 3.37 (q, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.81 (t, 2H, CH₂N₃), 1.64 (t, 2H, CH₂NH₂); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 49.16 (CH₂N₃), 39.32 (CH₂NH₂), 32.42 (CH₂CH₂CH₂).

3.2.2 RAFT ajanının sentezi

Polimer sentezinde başvurulan trimetilsillil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) RAFT ajanının sentezi literatüre uygun olarak üç aşamada gerçekleştirildi [282].

3.2.2.1 Di(tiyobenzoil) disülfid sentezi

250 mL'lik 3 boyunlu balon içerisine sodyum metoksit (%30'luk metanol içerisinde, 40 g, 0.22 mL), susuz metanol (50 mL, 1.25 mmol), elementel kükürt (6.4 g, 0.20 mmol) ilave edildi. Sonrasında benzil klorür (12.6 g, 0.1 mol) 1 saatlik sürede damlatma hunisi ile karışıma eklendi. Sistem 67 °C'de azot atmosferi ve geri soğutucu altında 10 saat karıştırıldı. 10 saat sonunda reaksiyon karışımı buz banyosu içerisinde 7 °C'ye soğutuldu. Çöken tuz süzgeç kağıdı ile süzülde, ardından karışım çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı. Ürün, 500 mL deiyonize su ve 200 mL dietileter ile 3 kez ekstrakte edildi. Su fazındaki pembe renk organik faza geçene kadar %36'lik hidroklorik asit (HCl) eklendi ve ekstrakte edildi. Ardından deiyonize su ve 1 M sodyum hidroksit (NaOH) ile 3 kez daha ekstrakte edildi. Böylelikle tepkimeye girmeyen sodyum ditiyobenzoat su fazına alındı. Organik faza, 500 mL suda çözülmüş 17 g potasyum ferrisiyanür (K₄[Fe(CN)₆]) 1 saat sürede damlatma hunisi ile ilave edildi. Meydana gelen koyu pembe katı çökelti vakum altında gooch krozesine süzülde ardından vakum etüvünde kurutuldu. Koyu pembe renkli 21.20 g katı ürün %73 verim ile sentezlendi. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 8.15-7.39 (m, 10H, fenil); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 223.2, 134.8, 129.3, 128.7, 127.8.

3.2.2.2 4-Siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) sentezi

4-Siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) sentezinde öncü bileşik olan, di(tiyobenzoil)disülfid yukarıda anlatılan yöntem kullanılarak başarı ile sentezlendi. Sonrasında, 250 mL'lik iki boyunlu balona di(tiyobenzoil) disülfid (8 g, 26.10 mmol) ve 4,4'-azobis(4-siyano pentanoik asit) (11.6 g, 41.38 mmol) ilave edilerek etil asetat (200 mL) ile çözüldü. Karışım azot atmosferi ve geri soğutucu kullanılarak 80 °C'de 18 saat karıştırıldı. Daha sonra tepkime çözücüsü vakum altında uzaklaştırılarak elde

edilen ürün kolon kromatografisi (silika jel 60 Å, 70-230 mesh) ile etil asetat:hekzan (1:4) eluent sistemi kullanılarak izole edildi. İzole edilen pembe katı ürün etil asetat:hekzan (1:3, v/v) karışımında kristallendirildi. RAFT polimerleşme tekniğinde kullanılacak olan ajanın saflığı, hazırlanması planlanan polimerlerin dar molekül ağırlığı dağılımına sahip olması açısından önem taşımaktadır. Elde edilen pembe renkli ürün uygun saklama koşullarında (-20 °C) muhafaza edildi (verim: 4.67 g, %64). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 7.90-7.40 (m, 5H, fenil), 2.73-2.45 (m, 4H, CCH₂CH₂C=O), 1.95 (s, 3H, CCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 222.20, 177.27, 144.51, 133.12, 128.63, 126.71, 118.41, 45.63, 33.04, 29.58, 24.20.

3.2.2.3 Trimetilsillil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) raft ajanı sentezi

250 mL'lik 2 boyunlu balonda trimetilsillil propargil alkol (1.28 g, 0.0136 mmol), CPADB (3 g) ve 4-dimetilaminopiridin (1.38 g, 10.73 mmol) tetrahidrofuran (THF, 100 mL) içerisinde çözüldü. Ardından disikloheksil karbodiimid (DCC, 2.81 g, 13.61 mmol), THF'te (20 mL) çözümlenerek ilave edildi. Karışım argon atmosferi altında 25 °C'de gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon sonunda oluşan üre süzülürdü. Çözücü vakum altında uzaklaştırılarak ürün kolon kromatografisi (silika jel 60 Å, 70-230 mesh) ile etil asetat:hekzan (1:6) eluent sistemi kullanılarak saflaştırıldı (verim: 2.80 g, %67). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 7.90-7.40 (m, 5H, fenil), 2.00 (s, 3H, CCH₃), 0.25 (s, 9H, trimetilsillil); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 222.20, 170.76, 144.54, 133.04, 128.59, 126.69, 118.43, 98.41, 92.67, 53.31, 45.70, 33.25, 29.65, 24.15, 0.33.

3.2.3 Monosakkarit monomerinin sentezi

Meme kanserine hedeflemeyi ve UCNP'lerin biyoyumluluğunu sağlayacak fruktoz ünitesi taşıyan metakrilat monomerlerinin sentezi literatürdeki benzer metotlar kullanılarak gerçekleştirildi [283]. Genel prosedür olarak 5 hidroksil gruplarından 4'ü izopropiliden grupları ile korunur. Daha sonra korunmuş şekerlerin metakrilik anhidrit ile reaksiyonu pridin ve 4-dimetil aminopridin (DMAP) varlığında gerçekleştirilerek metakrilat ünitesi fruktoz bileşiğine kazandırılır.

3.2.3.1 1,2:4,5-di-*O*-İzopropiliden- β -D-fruktopiranoz (*iprFr*₁) sentezi

Reaksiyon sülfürik asit (H₂SO₄) katalizörlüğünde gerçekleştirilmektedir. 1000 mL'lik çift boyunlu balona D-fruktoz (36 g, 200 mmol) eklendikten sonra aseton (700 mL) içerisinde çözüldü ve H₂SO₄ (3,5 mL) eklenerek oda sıcaklığında azot gazı altında 1.5 saat boyunca karıştırıldı. Ardından, tepkime karışımına önceden deiyonize suda (100 mL) çözülmüş sodyum hidroksit (11 g, 275 mmol) ilave edildi. Aseton vakum altında uçurulduktan sonra, karışım diklorometan (100 mL) ve deiyonize su ile ekstrakte edildi. Organik faz Mg₂SO₄ ile kurutularak süzüldü. Diklorometan vakum altında uzaklaştırıldıktan sonra, ürün dietileter (170 mL) ile çözüldü. Sonrasında önceden ısıtılmış hekzan (500 mL) içerisine dökülerek kristallendirildi (verim: 14.38 g, %28). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 4.19-3.96 (m, 6H), 3.65 (d, 1H), 1.52- 1.36 (s, 12H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 111.85, 109.40, 104.53, 77.30, 73.33, 72.28, 70.37, 60.71, 27.93, 26.40, 26.26, 25.94.

3.2.3.2 3-*O*-Metakrilolil-1,2:4,5-di-*O*-izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (*iprFr*₁MA) sentezi

1000 mL'lik çift boyunlu balona diklorometan (500 mL), piridin (30 mL, 371 mmol), 4-dimetilaminopiridin (5 g, 41 mmol) ve 1,2:4,5-di-*O*-izopropilamin- β -D-fruktopiranoz (15 g, 57.5 mmol) koyularak, azot gazı altında karıştırıldı. Karıştırma esnasında 0 °C'de metakrilik anhidrit (11 mL, 74 mmol) damla damla ilave edildi ve reaksiyon oda sıcaklığında 48 saat boyunca karıştırıldı. Tepkime süresi sonunda ürün, doygun sodyum bikarbonat çözeltisi (500 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz magnezyum sülfat ile kurutularak çözücü vakumda uçuruldu. Ürün kolon kromatografisi (silika jel 60 Å, 70-230 mesh) ile etil asetat:hekzan (1:4) çözücüsü kullanılarak izole edildi. Çözücü karışımı vakum altında uzaklaştırılarak beyaz katı ürün elde edildi (verim: 15.56 g, %82). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 6.21 (dq, 1H), 5.63 (p, 1H), 5.19 (d, 1H), 4.35 (dd, 1H), 4.25 (ddd, 1H), 4.12 – 4.06 (m, 2H), 3.96 (d, 1H), 3.83 (d, 1H), 1.98 (dd, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.36 (s, 3H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 165,07; 134,32; 124,46; 107,52; 107,19; 99,90; 69,15; 68,65; 68,39; 63,36; 59,64; 24,92; 24,23; 23,79; 22,36; 16,88.

3.2.3.3 2,3:4,5-di-*O*-İzopropiliden- β -D-fruktopiranoz (*iprFr*₂) sentezi

1000 mL'lik çift boyunlu balona D-fruktoz (36 g, 200 mmol) konuldu, aseton (700 mL) ve H₂SO₄ (35 mL) ile çözülerek oda sıcaklığında azot altında karıştırıldı (1.5 saat). Süre sonunda sodyum hidroksit (110 g, 2.75 mol) deiyonize su (500 mL) ile çözülerek karışıma ilave edildi. Aseton vakum altında uçurularak karışım diklorometan (100 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz magnezyum sülfat ile kurutularak süzüldü. Diklorometan vakum altında uzaklaştırılarak ürün dietileter (170 mL) ile çözüldü. Sonrasında hafif ısıtılan hekzan (500 mL) içerisine dökülerek kristallendirildi (verim: 15.80 g, %30). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 4.63 (dd, 1H), 4.36 (d, 1H), 4.26 (ddd, 1H), 3.94 (dd, 1H), 3.79 (dd, 1H), 3.78 – 3.62 (m, 2H), 1.56 (ks, 3H), 1.50 (ks, 3H), 1.42 (ks, 3H), 1.37 (ks, 3H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 109.04, 108.49, 103.06, 70.91, 70.78, 70.04, 65.41, 61.23, 26.43, 25.73, 25.32, 23.95.

3.2.3.4 1-*O*-Metakriloil-2,3:4,5-di-*O*-izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (*iprFr*₂MA) sentezi

1000 mL'lik çift boyunlu balona 2,3:4,5-di-*O*-izopropilamin- β -D-fruktopiranoz (15 g, 57.5 mmol), piridin (30 mL, 371 mmol), 4-dimetilaminopiridin (5 g, 41 mmol) ilave edildikten sonra kimyasallar diklorometanda (500 mL) çözüldü. Sonrasında buz banyosuna konulan tepkime karışımı 0 °C'de karıştırıldı. Karıştırma esnasında metakrilik anhidrit (11 mL, 74 mmol) yavaş bir şekilde damlatma hunisi ile karışıma ilave edildi ve reaksiyon oda sıcaklığında 48 saat boyunca karıştırıldı. 48 saat sonunda ürün, doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi (500 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz magnezyum sülfat ile kurutularak çözücü vakum altında uçuruldu. Ürün kolon kromatografisi (silika jel 60 Å, 70-230 mesh) ile etil asetat:hekzan (1:4) eluent sistemi kullanılarak izole edildi. Renksiz sıvı ürün elde edildi (verim: 15.4 g, %81). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 6.17 (dq, 1H), 5.62 (dd, 1H), 4.64 (dd, 1H), 4.50 (dd, 1H), 4.40 (dd, 1H), 4.27 (ddd, 1H), 4.17 (dd, 1H), 3.96 (dd, 1H), 3.79 (dt, 1H), 1.99 (dt, 3H), 1.56 (ks, 3H), 1.50 (ks, 3H), 1.41 (ks, 3H), 1.37 (ks, 3H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 165.05, 134.31, 124.45, 107.51, 107.18, 99.89, 69.14, 68.64, 68.38, 63.35, 59.63, 24.90, 24.22, 23.79, 22.35, 16.87.

3.2.4 N-(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomerinin sentezi

Dopamin metakrilamid monomerinin sentezi için dört farklı prosedür denendi. Bu denemeler ve elde edilen sonuçları sırasıyla aşağıda anlatılmaktadır.

Birinci prosedürde; 3-hidroksitiramin HCl (0.01 mL, 2 g), metakriloil klorür (0.012 mL, 1.172 mL), trietilamin (0.015 mL, 2.09 mL) ve THF (60 mL) iki boyunlu 100 mL'lik balona alındı. 3-hidroksitiraminin çözünmesi için karışıma deiyonize su (1.8 mL) eklendi. Reaksiyon gece boyunca azot altında karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon sonlandırılarak, çözücü rotary evaporatörde uzaklaştırıldı. Ardından diklorometan/deiyonize su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz magnezyum sülfat ile kurutularak çözücü vakum altında uçuruldu. Ürün kolon kromatografisi (silika jel 60 Å, 70-230 mesh) ile etil asetat çözücüsü kullanılarak saflaştırılmaya çalışıldı. Kolon kromatografisi sonrası 4 fraksiyon elde edildi. Fraksiyonlar, ¹H-NMR analizi ile tespit edildi ve dopamin metakrilamidin oluşmadığı tespit edildi.

İkinci prosedürde; ilk olarak dopamin trimetilsilil sentezi denendi. 3-hidroksitiramin HCl (14.3 mmol, 2.72 g), *t*-butildimetil silil klorür (41.5 mmol, 6.25 g), ve 1,8-diazabisiklo[5.4.0]undek-7-en (DBU, 44 mmol, 6.5 mL) 100 mL'lik iki boyunlu balonda konulup asetonitril (55 mL) içerisinde azot gazı altında çözüldü. Tepkime ilk olarak buz banyosunda 4 saat, ardından 20 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra asetonitril rotary evaporatör ile uçuruldu. Kalan madde soğutulmuş kloroform ile iki kere yıkanarak vakum filtrasyonu ile süzüldü. 12 saat boyunca -18 °C'de bekletilerek beyaz çökelti oluşturuldu. Ürünün ¹H-NMR analizi sonucunda dopamin bileşiğinin dimetil *ter*-butil silil grubu ile korunma reaksiyonunun verimsiz gerçekleştiği tespit edildi.

Üçüncü prosedürde; tasarlanan 2. prosedür çalışmayınca, reaksiyon farklı çözücü ortamında daha reaktif olan trimetil silil ile tekrar edildi. 3-Hidroksitiramin HCl (3 mmol, 0.569 g), klorotrimetilsilan (7 mmol, 0.887 g), trietilamin (8 mmol, 1.115 mL) ve THF/DMSO (70 mL/4 mL) azot altında ve oda sıcaklığında 22 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon sonunda karışıma doygun NH₄Cl çözeltisi (100 mL) eklendi ve ekstraksiyon yapıldı. Organik faz magnezyum sülfat ile kurutularak, çözücü vakum altında uçuruldu. Ürün, ¹H-NMR analizi ile doğrulandı. Sentezlenen dopamin trimetilsilil (5,7 mmol, 1,7 g), metakriloil klorür (8 mmol, 0,835 g), trietilamin (11,4 mmol, 1,156 g) ve metanol (60 mL) ile azot gazı altında gece boyunca karıştırıldı.

Daha sonra metanol rotary evaporatör ile uçurularak etilasetat/deiyonize su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz magnezyum sülfat ile kurutularak çözücü vakum altında uçuruldu. Ürünün ¹H-NMR analizi yapıldı ve daha önce sillillenen uçların açılarak, -OH gruplarının açığa çıktığı belirlendi. Bu nedenle tekrar trimetilsillil reaksiyonu konuldu. Elde edilen ürün kolon kromatografisi (silika jel 60 Å, 70-230 mesh) ile etil asetat:hekzan (1:3) çözücüsü kullanılarak izole edildi. Kolon sonrası 4 fraksiyon elde edildi. Fraksiyonların ¹H-NMR analizi yapıldı fakat istenilen ürünün elde edilemediği, metakrilatlama sırasında koruma grubunun hidroliz olduğu ¹H-NMR analizi sonrasında tespit edildi.

Dördüncü prosedürde [284]; 3-hidroksitiramin HCl (5 g, 26 mmol,) ve susuz metanol (60 mL), azot gazı altında 250 mL'lik üç boyunlu balona alınarak karıştırıldı. Ardından trietilamin (3,75 mL, 27 mmol) eklendi. Reaksiyona 0 °C'de metakriloil klorür (3,6 mL, 36 mmol) eklendi. Karışıma ikinci kez trietilamin (3,75 mL, 27 mmol) eklendi. Reaksiyon 16 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Metanolün fazlası rotary evaporatör ile çözüldüden uzaklaştırıldı. Oluşan yoğun rezidü etil asetat (3x100 mL) ile ekstrakte edildi. Organik faz ayrıca HCl çözeltisi (1M, 3x100 mL) ile ekstrakte edildi ve ardından doymuş NaCl çözeltisi ile yıkandı. Bunu takiben organik faz magnezyum sülfat ile tamamen kurutuldu. Süzülen çözelti hacmi 75 mL oluncaya kadar rotary evaporatörde konsantre edilerek bir gece dondurucuda bekletilerek *N*-(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) çökeltisinin oluşması sağlandı. Beyaz kristal ürün filtre edilip, soğuk etil asetat ile yıkandı ve kurutuldu (verim: 5,75 g, %41). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 8.66-8.55 (2H), 7.83 (1H), 6.48-6.44 (2H), 6.30 (1H), 5.48 (1H), 5.16 (1H), 3.08 (2H), 2.41 (2H), 1.70 (3H); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ): 167.84, 145.50, 143.95, 140.50, 130.75, 119.69, 116.43, 41.44, 35.05, 19.12.

3.2.5 2-(4-Formil- 1,3-diokso- 1,3,3a,4,7,7a –hekzahidro -2H-4,7-epoksisoindol-2-il) etilmetakrilat monomerinin sentezi (MiMA)

İlaç salımı yapabilme özelliğine sahip furan korumalı maleimid fonksiyonel grubu taşıyan monomerin sentezi dört basamakta gerçekleşmektedir [285,286]. Metakrilat fonksiyonlitesi metakriloil klorür ile trietilamin varlığında gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonuyla bileşiğe kazandırılmaktadır.

3.2.5.1 2-(Furan-2-il)-1,3-dioksolan sentezi (FurKet)

100 mL'lik çift boyunlu balona furfural (4 g, 50 mmol,), *p*-toluensülfonik asit (0.039 g, 0.25 mmol) ve susuz magnezyum sülfat (4.81 g, 50 mmol) konuldu. Ardından 50 mL benzen eklenip, Dean-Stark adaptörü bağlandı. Tepkime karışımı azot atmosferine alındı. Damlatma hunisine etilen glikol (4.96 g, 100 mmol) ve 10 mL benzen koyularak damla damla reaksiyona eklendi. Daha sonra reaksiyon sıcaklığı 100 °C'ye çıkartıldı ve gece boyunca karıştırıldı. Sonrasında reaksiyon oda sıcaklığına getirildi ve tepkime karışımına NaHCO₃ (0.034 g, 0.5 mmol,) eklendi. Yarım saat karıştırıldıktan sonra çözelti, tabanı NaHCO₃ ile kaplanmış krozedden süzüldü. 3 kere diklorometan (10 mL) ile yıkandı. Ardından iki kere diklorometan/deiyonize su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz magnezyum sülfat ile kurutulularak süzüldü, sonrasında çözücü vakum altında uçuruldu. Sıvı ve koyu kahverengi renkli madde elde edildi. Maddeyi saflaştırmak için vakum distilasyonu yapıldı. Vakum distilasyonunda 0,12 mbar/50 °C'de hafif sarı öncü madde alındı. Ardından 0.090 mbar/55 °C'de daha viskoz şeffaf madde alındı (verim: 3.1 g, %53). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 7.42 (1H), 7.83 (1H), 6.45 (1H), 6.35 (1H), 5.92 (1H), 4.12 (2H), 3.99 (2H), 2.41 (2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 151.40, 143.21, 110.17, 108.81, 97.71, 65.17.

3.2.5.2 (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-epoksiso-benzofuran-1,3-dion sentezi (FurKetMi)

Azot atmosferinde, çift boyunlu balonda maleik anhidrit (8.23 g, 84 mmol), toluende (50 mL) çözüldü. Ardından bir önceki aşamada sentezlenen 2-(furan-2-il)-1,3-dioksolan (9.67 g, 70 mmol) reaksiyona eklendi. Sıcaklık 80 °C'ye yükseltildi ve gece boyunca geri soğutucu sisteminde yapıldı. Tepkime sonlandırıldıktan sonra toluen vakum altında uçuruldu. Kalan koyu kahverengi, bulamaç halindeki yapı sırasıyla petrol eteri ve dietileter ile yıkanarak reaksiyona katılmayan ketal uzaklaştırıldı (verim: 12.01, %73). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 6.62 (2H), 5.50-5.43 (2H), 4.15-4.06 (4H), 3.35-3.29 (2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 169.54, 167.76, 137.55, 136.56, 100.04, 92.91, 82.60, 66.02, 51.71, 48.94.

3.2.5.3 (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-2-(2-hidroksietil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoksisoindol-1,3(2H)-dion sentezi (FurKetMiOH)

Bir önceki basamakta elde edilen FurKetMi (6.71 g, 28 mmol) üç boyunlu balona alındı ve metanolde (100 mL) çözüldü. Metanol (30 mL) içindeki etanolamin (3 mL, 42 mmol) damlatma hunisine alındı. Reaksiyon azot gazı altına ve buz banyosunda iken, etanolamin damla damla çözeltiye ilave edildi. Damlatma işlemi bittikten ve reaksiyon 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra sıcaklık 80 °C'ye çıkarıldı. Gece boyunca geri soğutucu sisteminde tepkime karıştırıldı. Tepkime sonlandırıldıktan sonra çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Diklorometan/deiyonize su ile iki kere ekstraksiyon yapılarak, organik faz magnezyum sülfat ile kurutuldu. Ardından vakum altında diklorometan uzaklaştırıldı. Hafif pembe renkli ve katı ürün elde edildi (verim: 4.90 g, %61). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 6.57-6.51 (2H), 5.42-5.36 (2H), 4.12-4.03 (4H), 3.75-3.73 (4H), 3.05-3.01 (2H), 2.37 (-OH, 1H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 176.09, 174.81, 136.87, 136.25, 100.41, 91.80, 81.37, 66.10, 60.27, 50.31, 47.77, 41.83.

3.2.5.4 2-((3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etil metakrilat sentezi (MiMA)

4-(1,3-Dioksolan-2-il)-2-(2-hidroksietil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoksisoindol-1,3(2H)-dion (3.90 g, 14 mmol) üç boyunlu balon içerisinde diklorometanda (150 mL) çözüldü. Reaksiyon azot gazı altındayken trietilamin (5 mL, 42 mmol) eklendi. Ardından karışım buz banyosunda soğutuldu ve damlatma hunisi içindeki 30 mL diklorometan ile metakriloil klorür (2 mL, 21 mmol) damla damla eklendi. Damlatma işlemi bittikten sonra reaksiyon oda sıcaklığında gece boyunca karıştırıldı. Ertesi gün reaksiyon sonlandırıldı ve diklorometan/deiyonize su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz magnezyum sülfat ile kurutularak vakum altında çözücü uzaklaştırıldı. Ürün kolon kromatografisi (silika jel 60 Å, 70-230 mesh) ile etil asetat:hekzan (1:2) eluent sistemi kullanılarak izole edildi. Çözücü karışımı vakum altında uzaklaştırılıp koyu kahverengi viskoz ürün elde edildi. Madde etilasetat ile çözülüp hekszanda çöktürüldü. Gece boyunca -18 °C'de bekletildi. Beyaz katı ürün elde edildi (verim: 4 g, %82). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 6.55-6.47 (2H), 6.05-5.54 (2H), 5.35-5.30 (2H), 4.28 (2H), 4.13-3.99 (4H),

3.80 (2H), 3.00 (2H), 1.89 (3H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ): 175.47, 173.87, 167.04, 136.99, 135.95, 126.22, 100.39, 91.057, 81.44, 66.05, 60.84, 50.35, 47.98, 37.91, 18.24.

3.2.6 Lizin monomerinin sentezi

siRNA taşıma görevini üstlenecek lizin monomeri *t*Boc-koruma grubu ile aşağıdaki yöntem kullanılarak sentezlendi [287].

3.2.6.1 *N-N*-Di-(*ter*-Bütoksikarbonil)-L-Lizin (*t*Boc-Liz) sentezi

Üç boyunlu balon içerisinde deiyonize su (62.5 mL) ve NaOH (2.27 g, 56.7 mmol) çözüldü. Ardından azot atmosferi altında L-Lizin (7.22 g, 49.4 mmol) karışıma eklendi. Buz banyosuna alınan reaksiyona damla damla *ter*-bütanol (50 mL) ve di-*ter*-bütül-dikarbonat (27 g; 123 mmol) 15 dakika ara ile 4'er parça halinde ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon süresi sonunda karışım, etil asetat ve sodyum bisülfat çözeltisi ile ekstrakte edildi. Çözücü vakum altında uçurularak sarı renkli viskoz ürün elde edildi ve 4 gün boyunca 25 °C'de vakum etüvünde kurutuldu. Kurutulan ürün dietil eter (50 mL), sikloheksilamin (13 mL) ile 15 dakika karıştırılarak, yaklaşık 750 mL hekzan içerisinde çöktürüldü. Oluşan beyaz katı ürün süzülerek 1 gece 25 °C'de vakum etüvünde kurutuldu. Ürün etilasetat ve 1 M H₂SO₄ çözeltisi ile yeniden ekstrakte edildi. Organik faz MgSO₄ ile kurutularak çözücü vakum altında uzaklaştırıldı. Beyaz köpük şeklinde 17 g ürün elde edildi. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ): 7,00 (1H, -NH-), 6.79 (1H, -NH-), 3.82 (1H, αCH₁), 2.87 (2H, -CH₂NH-), 1.60 (2H, -CH₂-), 1.37 (4H, -CH₂CH₂-;18H, -O-C-(CH₃)₃); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ):174.6, 155.9, 78.25,77.67, 53.81, 30.77, 29.43, 28.61, 28.55, 21.10.

3.2.6.2 *N*-(*ter*-Bütoksi karbonil)-L-Lizin *N*-karboksianhidrit sentezi (*t*Boc-Liz-NCA)

Bir önceki basamakta sentezlenen *N-N*-Di-(*ter*-bütoksikarbonil)-L-Lizin (8.5 g), tamamen kurutulmuş 3 boyunlu bir balona alındı ve etilasetatta (100 mL) çözüldü. Tüm reaksiyon azot gazı altında gerçekleştirildi. Karışıma trietilamin (1.125 mL, 8.1 mmol) eklendi ve 10 dakika sonra trifosgen (2.30 g, 7.7 mmol) damla damla damlatma hunisi ile tepkimeye eklendi. Damlatma işlemi bittikten sonra reaksiyon 5 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Sonrasında -18 °C'ye alınarak gece boyu bekletildi. Buzluktan

alındığında beyaz çökeltinin oluştuğu gözlemlendi. Çökelti süzülerek ayrıldı. Kalan çökelti, iki defa soğuk deiyonize su (100 mL) ile iki keredede soğuk %0,5'lik NaHCO₃ (suda) (100 mL) ile ekstraksiyon yapıldı. Organik faz MgSO₄ ile kurutuldu ve çözücününün 2/3'ü vakum altında uzaklaştırıldı. Kalan kısım heksanda çöktürüldü ve süzüldü. Katı kısım vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen ürün hafif yapışkan özellikli, beyaz katı maddedir.

Yukarıda anlatılan trifosgenle halka kapama reaksiyonu sonucu çok düşük verim elde edildiği için, *N*-karboksianhidritleme (NCA) aşaması trietilamin yerine α -pinene (11 mL) koyularak denendi. Trifosgen (5.44 g), etil asetat (130 mL) yukarıdaki protokole uygun olarak eklendi ve 45 °C'lik yağ banyosunda 5 saat boyunca reaksiyon gerçekleşti. Fakat -18 °C'de bekletilmesine rağmen çökme gerçekleşmediği için reaksiyona devam edilemedi.

Bu prosedürler birkaç kez tekrar edilmesine rağmen istenilen saflıkta ve miktarda monomer elde edilemedi. Bu yüzden, *N*-karboksianhidritleme reaksiyonu ticari olarak satın alınan *t*Boc- koruma grubuna sahip lizin ile tekrar edildi. *N*-Boc korumalı lizin (9.8 g, 39.8 mmol) üç boyunlu balona alındı ve 1 saat boyunca schlenk hattında kurutuldu. Ardından susuz THF (300 mL) ile azot gazı altında süspanse edildi. Karışıma klorotrimetilsilan (9.9 mL, 79 mmol) ve trietilamin (11 mL, 79 mmol) eklendi. İki saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra difosgen (4.8 mL, 39.8 mmol) eklenip reaksiyon sıcaklığı 50 °C'ye çıkarıldı ve iki saat refluks yapıldı. Oda sıcaklığında gece boyunca karıştırılmaya devam edildi. Daha sonra filtre kağıdı ile süzüldü ve çözücü vakum altında uçuruldu. Bunun sonucunda beyaz katı madde oluştu. Bu madde susuz THF ile çözülüp heksanda çöktürüldü. Bir saat boyunca 4 °C'de bekletildi ve ardından gooch krozesinden süzüldü. Daha sonra tekrar THF ile çözülüp heksanda çöktürüldü. Sonuçta beyaz renkli katı madde elde edildi (verim: 5,6, %52). Elde edilen ürünün kimyasal yapısı NMR ile karakterize edildi. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ): 9.08 (1H), 6.80 (1H), 4.43 (1H), 2.90 (2H), 1.75-1.46 (18H); ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ): 175.16, 172.17, 156.08, 77.87, 57.50, 31.11, 29.34, 28.74, 22.08.

3.3 Polimerizasyon Reaksiyonları

Bütün organik bileşiklerin başarı ile sentezlenmesinden sonra polimerlerin hazırlanmasına geçilmiştir. Bu bağlamda, polilizin polimeri halka açılma

polimerizasyon yöntemiyle [288] triblok glikopolimer ise tersinir katılma-parçalanma zincir transfer (RAFT) polimerleşme tekniği [288] ile hazırlanmıştır.

3.3.1 ω -Azido fonksiyonlu *N-ter*-bütiloksikarbonil-L-lizin polimerinin sentezi (P(*t*Boc-Liz)-N₃)

Halka açılma polimerizasyonu ile P(*t*Boc-Liz)-N₃ peptid polimerinin sentezi [M]:[I]=[50]:[1] oranında gerçekleştirildi. Polimerizasyonda kullanılacak malzemelerin hepsinin çok kuru olmasına dikkat edildi. Bu amaçla, 25 mL'lik Schlenk reaktörü vakum hattına takılarak alevle yakıldıktan sonra 1 saat kurutuldu. Reaktöre argon atmosferi altında 1 g *t*Boc-Liz-NCA ilave edilerek kuru DMF (9.5 mL) ile çözüldü. Sonrasında önceden hazırlanmış 1-azido-3-amino propan bileşiğinin DMF içerisindeki stok çözeltisinden (0.134 mL/10 mL DMF) 500 μ L ilave edilerek oda sıcaklığında Ar atmosferi altında 0 °C'de 4 gün karıştırılmaya bırakıldı. Polimerizasyon süresi sonunda DMF vakum altında uçuruldu. Homopolimer THF ile çözülerek dietileterde çöktürüldü. İşlem üç kez tekrar edildi. Beyaz katı polimer vakum etüvünde oda sıcaklığında kurutuldu ve -80 °C'de muhafaza edildi. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.2 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7 epoksiisindol-2-il)etil metakrilat) homopolimerizasyonu (PMiMA)

Polimerizasyon [M]:[RAFT]:[I]= 40:1:0,125 oranında gerçekleştirildi. MiMA monomeri (2 g), sillil korumalı alkin fonksiyonlu RAFT ajanı stok çözeltisi ((0.302 g/ 5 mL), 0.920 mL) ve 2,2'-Azobis(2-metilpropionitril) stok çözeltisi [(AIBN, 0.1 mg/ 10 mL), 0.293 mL] asetonitril (3.547 mL) içerisinde çözülerek 10 mL'lik vialle koyuldu. Homojen olarak karıştırıldıktan sonra çözeltiye 45 dakika boyunca azot gazı verildi. Ardından reaksiyon 70 °C'lik yağ banyosunda 7 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra çözücü uzaklaştırıldı. Az miktarda asetonitrilde çözülüp dietileterde çöktürüldü. Bu işlem 2 kez tekrarlanarak tepkimeye girmeyen monomerin polimerden uzaklaştırılması sağlanmış oldu. Pembe renkli katı ürün vakum etüvünde, oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.3 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etilmetakrilat-*blok-N*-(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid) diblok polimerizasyonu P(MiMA-*b*-DopMA)

Diblok polimerizasyon [M]:[MacroRAFT]:[I]= 33:1:0.135 oranında gerçekleştirilmiştir. PMiMA homopolimeri (0.5 g), DopMA monomeri (1.43 g), AIBN stok çözeltisi [(0.1 mg/ 10 mL), 0.261 mL], asetonitril (3.244 mL) içerisinde çözülerek 10 mL'lik vialde koyuldu. Homojen olarak karıştırıldıktan sonra çözeltiliye 45 dakika boyunca azot gazı verildi. Ardından 70 °C'lik yağ banyosunda 8.5 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra çözücü uzaklaştırıldı. Az miktarda asetonitrilde çözülüp metanolde çöktürüldü. 2. kez asetonitrilde çözüldü ve dietileterde çöktürüldü. Sonuçta pembe renkli katı ürün oluştu ve ürün vakum etüvünde oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.4 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3^a,4,7,7^a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etilmetakrilat-*blok-N*-(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid)-*blok-3-O*-metakriloil-1,2:4,5-di-*O*-izopropiliden- β -D-frukto-piranoz) triblok kopolimerizasyonu (P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-iprFr₁MA))

Polimerizasyon [M]:[Makro-RAFT]:[I]= 200:1:0.175 oranında gerçekleştirilmiştir. Diblok kopolimer (P(MiMA-*b*-DopMA), 0.21 g), iprFr₁MA monomeri (2.773 g), AIBN stok çözeltisi [(0.1 mg/ 10 mL), 0.121 mL] ve floresein O-metakrilat (10 mg) asetonitril (3.5 mL) - toluen (3.5 mL) karışımında çözülüp 15 mL'lik vialde koyuldu. Homojen olarak karıştırıldıktan sonra çözeltili 45 dakika boyunca azot gazı altında degas edilmiştir. Ardından 70 °C'lik yağ banyosunda 8 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra toluen uzaklaştırıldı. Ardından soğutulmuş metanolde çöktürüldü. 2. kez THF'de çözülüp soğutulmuş dietileterde çöktürüldü. Ürün vakum etüvünde, oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.5 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3^a,4,7,7^a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-yl)etilmetakrilat-*blok*-N-(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid)-*blok*-1-O-metakriloil-2,3:4,5-di-O-izopropiliden- β -D-frukto-piranoz) triblok kopolimerizasyonu (P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA))

Polimerizasyon [M]:[MakroRAFT]:[I]=200:1:0.175 oranında gerçekleştirilmiştir. Diblok kopolimer (P(MiMA-*b*-DopMA), 0.20 g), *ipr*Fr₂MA monomeri (2.529 g), AIBN stok çözeltisi [(0.1 mg/ 10 mL), 0.121 mL], floresein O-metakrilat (10 mg) asetonitril (3.5 mL) - toluen (3.5 mL) karışımında çözülüp 15 mL'lik vialde koyuldu. Homojen olarak karıştırıldıktan sonra çözelti 45 dakika boyunca azot gazı altında degas edilmiştir. Ardından 70 °C'lik yağ banyosunda 8 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra toluen uzaklaştırıldı. Ardından soğutulmuş metanolde çöktürüldü. 2. kez toluende çözüldü ve soğutulmuş dietileterde çöktürüldü. Ürün vakum etüvünde, oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.6 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA) Triblok kopolimerinin trimetilsillil grubu hidrolizi

P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA) Triblok kopolimeri (0.7 g) THF (20 mL) içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında TBAF (0.025 mL, 1 M) çözeltisi ilave edilerek, azot atmosferi altında 3 saat karıştırıldı. Daha sonra çözücünün fazlası uçuruldu ve polimer soğuk metanolde çöktürüldü. Ardından ürün vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.7 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA) Triblok kopolimerinin trimetilsillil grubu hidrolizi

P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA) Triblok kopolimeri (0.7 g) THF (20 mL) içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında TBAF (0.025 mL, 1 M) çözeltisi ilave edilerek, azot atmosferi altında 3 saat karıştırıldı. Daha sonra çözücünün fazlası uçuruldu ve polimer soğuk metanolde çöktürüldü. Ardından ürün vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.8 Klık reaksiyonu ile tetrablok kopolimerin sentezi P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₁MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) (P1)

P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₁MA) (0.56 g, 0.011 mmol) alkin fonksiyonlu triblok kopolimer ve P(*t*Boc-Liz)-N₃ polimeri (0.134 g, 0.013 mmol), PMDETA (0.01 mL, 0.045 mmol) 6 mL DMF içinde çözülerek 25 mL'lik schlenk reaktöre koyuldu. En son CuBr (0.003 g, 0.022 mmol) konularak vakum hattı kullanılarak degas edildi. Reaksiyon 35 °C'lik yağ banyosunda 48 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra tepkime karışımı nötral alümina (Al₂O₃) dolgulu kolondan geçirilerek bakır fazlası uzaklaştırıldı. Vakum altında DMF'in fazlası uçurularak soğuk metanolde çöktürüldü. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Ürün vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.9 Klık reaksiyonu ile tetrablok kopolimerin sentezi P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₂MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) (P2)

P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₂MA) (0.56 g, 0.0097 mmol) alkin fonksiyonlu triblok kopolimer, P(*t*Boc-Liz)-N₃ polimeri (0.116 g, 0.011 mmol), PMDETA (0.01 mL, 0.045 mmol), 6 mL DMF içinde 25 mL'lik schlenk reaktöre koyuldu. En son CuBr (0.003 g, 0.022 mmol) koyularak Schlenk line kullanılarak degas edildi. Reaksiyon 35 °C' lik yağ banyosunda 48 saat boyunca karıştırıldı. Daha sonra tepkime karışımı Al₂O₃ dolgulu kolondan geçirilerek bakır fazlası uzaklaştırıldı. Vakum altında DMF'in fazlası uçurularak soğuk metanolde çöktürüldü. Ürün vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.10 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₁MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin izopropiliden ve *terbüt*iloksikarbonil grubu hidrolizi

P1 Kopolimerdeki şeker segmentinin taşıdığı izopropiliden, MiMA monomerinden gelen ketal ve lizin polimerinin taşıdığı *terbüt*oksi grupları trifloroasetik asit (TFA) varlığında gerçekleştirilen asidik hidrolizle tek aşamada uzaklaştırıldı. Genel bir prosedür olarak; P1 kopolimeri (0.4 g) kloroform (15 mL) ve deiyonize su (2 mL) içerisinde çözüldü ve azot atmosferinde TFA (0.342 mL) ilave edilerek oda sıcaklığında gece boyu karıştırıldı. Ertesi gün polimer diyaliz membrana alınarak deiyonize su içerisinde 48 saat boyunca diyaliz edildi. Ardından ürün liyofilizatörde kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.11 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin izopropiliden ve *ter*bütüloksikarbonil grubu hidrolizi

Tetrablok kopolimerdeki şeker segmentinin taşıdığı izopropiliden, MiMA monomerinden gelen ketal ve lizinden kaynaklanan *ter*bütoksi grupları trifloroasetik asit (TFA) ile gerçekleştirilen asidik hidrolizle tek aşamada uzaklaştırılmıştır. Yukarıda anlatılan TFA hidroliz prosedürü P2 kopolimeri için tekrar edildi. P2 kopolimeri (0.5 g) kloroform (15 mL) ve deiyonize su (2 mL) içerisinde çözüldü ve azot atmosferinde TFA (0.412 mL) ilave edilerek oda sıcaklığında gece boyu karıştırıldı. Ertesi gün polimer diyaliz membrana alınarak deiyonize su içerisinde 48 saat boyunca diyaliz edildi. Ardından ürün liyofilizatörde kurutuldu. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.4 Kemoterapötik İlaç (Doksorubisin, Dox) Taşıyan Tetrablok Kopolimerin Hazırlanması

3.4.1 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₁MA)-*b*-P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin konjugasyonu (P1/Dox)

Doksorubisin etken maddesi kimyasal olarak imin bağıyla tetrablok kopolimerine kazandırıldı [289]. Bu amaçla, Doksorubisin.HCl (Dox, 20 mg) ve P1 kopolimer (0.1 g) DMSO (5 mL) içerisinde çözüldü. Ardından trietilamin (0.06 mL) eklendi ve gece boyunca karanlıkta karıştırıldı. Daha sonra deiyonize suya karşı, 6-8 kDa'lık diyaliz membranı ile 3 gün diyaliz edildi. Böylece reaksiyona girmemiş Dox ve trietilamin diyaliz yöntemi ile uzaklaştırıldı. İlaç yüklenmiş polimerin çözeltisi liyofilizatörde uzaklaştırıldı. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.4.2 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi (P2/Dox)

Dox (25 mg) ve P2 kopolimer (0.1 g) DMSO (5 mL) içerisinde çözüldü. Ardından trietilamin (0.06 mL) eklendi ve gece boyunca karanlıkta karıştırıldı. Daha sonra deiyonize suya karşı, 6-8 kDa'lık diyaliz membranı ile 3 gün diyaliz edildi. Böylece reaksiyona girmemiş Dox ve trietilamin diyaliz yöntemi ile uzaklaştırıldı. İlaç yüklenmiş polimerin çözeltisi liyofilizatörde uzaklaştırıldı. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.5 Manyetik Nanoparçacıkların (Fe₃O₄) Sentezi

Susuz demir (III) klorür (FeCl₃, 1 mmol, 0.2 g), demir sülfat heptahidrat (FeSO₄.7H₂O, 1.2 mmol, 0.336 g) ve deiyonize su (5 mL) iki boyunlu 100 mL'lik balona alındı. Yarım saat azot gazı altında karıştırıldı. Ardından reaksiyona %25'lik amonyum hidroksit (2.5 mL) çözeltisi eklendi ve 30 dakika boyunca 80 °C'de reaksiyon sürdürüldü. Daha sonra %10 oleik asit eklenerek 1 saat boyunca karıştırıldı. Üst faz organik faz, alt faz su fazı olmak üzere iki fazlı bir karışım oluştu. Su fazı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Manyetik ayırma ile oleik asit kaplı magnetit nanokristalleri toplandı ve 80 mL etanolle yıkandı. Ardından santrifüj yapılarak etanol uzaklaştırıldı ve 20 mL kloroform ile dispers edildi. İlk denemede çok büyük nanoparçacıklar elde edildiği için benzer reaksiyon koşulları tekrar edildi. Ancak istenilen büyüklükte parçacıklar elde edilemedi.

Daha küçük nanoparçacıklar elde etmek için başka bir prosedür [290] daha denendi. Bu prosedüre göre, demir(III) klorür heksahidrat (40 mmol, 10.8 g), sodyum oleat (120 mmol, 36.5 g) üç boyunlu 500 mL'lik balona alınarak etanol (80 mL), deiyonize su (60 mL), hekzan (140 mL) karışımında çözüldü. Karışım yarım saat azot altında, oda sıcaklığında karıştırıldı ve ardından sıcaklık 70 °C'ye çıkarıldı. Reaksiyon 4 saat devam ettikten sonra oda sıcaklığına getirildi ve deiyonize su (30 mL) ile 3 kere ekstraksiyon yapıldı. Organik faz (hekzan) rotari evaporatörde uçurularak yoğun kıvamlı, koyu kahverengi sıvı madde elde edildi. Elde edilen 36 g maddenin 9 g'ı reaksiyonun devamı için kullanıldı. Demir-oleat kompleksi (10 mmol, 9 g) ve oleik asit (5 mmol, 1.425 g) 100 mL'lik üç boyunlu balona koyuldu. 1-oktadeken (50 g) eklenerek oda sıcaklığında homojen çözelti haline gelene kadar karıştırıldı. Ardından sıcaklık yavaşça 300 °C'ye çıkartıldı. Bu sıcaklıkta bir saat karıştırıldıktan sonra reaksiyon oda sıcaklığına getirildi. Karışıma etanol (125 mL) eklenerek oluşan nanokristaller santrifüjle ayrıldı. Daha sonra kloroform ile dispers edildi ve DLS ölçümü yapıldı. Sonuç olarak yaklaşık 4 nm büyüklüğünde nanokristaller elde edildiği saptandı.

Yapılan diğer bir prosedürde yukarıdaki protokolün yalnızca ikinci aşaması değiştirildi. Önceden sentezlenen demir-oleat kompleksi (10 mmol, 9 g) 100 mL'lik üç boyunlu balonda oleik asit (5 mmol, 1.425 g) ile birleştirildi. Ardından 1-oktadeken (50 g) eklenerek oda sıcaklığında homojen çözelti haline gelene kadar karıştırıldı.

Reaksiyon sıcaklığı 270 °C'ye getirilerek 3 gün boyunca karıştırıldı. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra karışıma etanol (125 mL) eklenerek oluşan nanokristaller santrifüjle ayrıldı. Daha sonra kloroform ile dispers edildi ve DLS ölçümü yapıldı. Sonuç olarak aynı parçacık büyüklüğünde nanokristallerin elde edildiği tespit edildi.

Su içerisinde dispers olabilen manyetik nanoparçacık sentezlemek için 1:2 mol oranında Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarını içeren bir birlikte çöktürme (ko-presipitasyon) yöntemi kullanıldı [291]. $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.6 g, 3.0 mmol) ve $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (1.62 g, 6.0 mmol), 10 mL deiyonize suda çözüldü ve 20 dakika boyunca N_2 atmosferi altında tutuldu. Daha sonra, %25'lik sulu amonyum hidroksit (NH_4OH) çözeltisi (10 mL), karışıma azot gazı altında damla damla (pH 10 olarak ayarlandı) eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca kuvvetlice karıştırıldı. Reaksiyon sıcaklığı 80 °C'ye çıkarıldı ve 45 dakika daha karıştırıldı. Sistem oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, elde edilen siyah çökelti alındı ve üç kez deiyonize su ile yıkandı. Manyetik nanoparçacıklar harici bir mıknatıs ile ayrıldı ve vakum altında kurutuldu. Daha sonra su ile dispers edildi ve DLS ölçümü yapıldı.

3.6 Upconversion Nanopartiküllerin (UCNP) Hazırlanması

3.6.1 $NaYF_4:Yb^{3+}/Er^{3+}$ UCNP' nin hazırlanması

İlk prosedür olarak [292], itriyum(III) oksit (Y_2O_3 , 0.975 mmol), iterbiyum(III) oksit (Yb_2O_3 , 0.25 mmol), erbiyum(III) oksit (Er_2O_3 , 0.025 mmol), trifloroasetik asit (TFA, 65 mmol), 8.8 mL deiyonize su üç boyunlu 100 mL'lik balonda çözüldü. Oluşan bulanık karışımdan, vakum altında 80 °C'de su ve TFA fazlası yarım saat içerisinde uzaklaştırıldı. Vakum kesilerek, reaksiyon 100 °C'ye çıkartıldı ve sodyum trifloroasetat ($NaCOOCF_3$, 2.50 mmol), oleik asit (OA, 23.75 mmol) ve oktadeken (ODE, 23.43 mmol) eklendi. Bir saat karıştırıldıktan sonra sıcaklık 330 °C'ye çıkartıldı. Bir saat karıştırıldı ve nanopartiküllerin sentezi tamamlandı. Nanopartiküller etanolle yıkanarak heksanda dispers edildi. DLS analizi ile boyut ve polidispersite indeksine bakıldı. Ancak nanopartikül boyutu istenilenden büyük olduğu için reaksiyon tekrar edildi.

Yukarıda anlatılan reaksiyon koşulu başarılı olmadığından, sonraki denemelerde distile su eklenmeyip, TFA miktarı (100 mmol) arttırıldı. Sonuç olarak daha küçük

boyutlu nanopartiküller elde edildi, ancak istenilen şekil ve boyutta nanopartiküller elde edilemediği için farklı prosedürler denendi.

Diğer bir prosedür olarak [293]; itriyum klorür (YCl_3 , 0.78 mmol), iterbiyum klorür ($YbCl$, 0.2 mmol), erbiyum klorür ($ErCl_3$, 0.02 mmol) 6 mL oleik asit ve 15 mL oktadeken içerisinde 2 boyunlu 100 mL'lik balonda karıştırıldı. Bu karışım 160 °C'ye ısıtıldı ve homojen olana kadar karıştırıldı. Ardından tekrar oda sıcaklığına getirildi. 10 mL metanol içerisinde çözülmüş NaOH (2.5 mmol) ve NH_4F (4 mmol) çözeltisi balon içerisindeki karışıma yavaşça eklendi ve yarım saat karıştırıldı. Daha sonra çözelti içerisindeki metanolü uzaklaştırmak için 100 °C'de degas edildi ve sistem 300 °C'ye ısıtılarak argon gazı altında 1 saat karıştırıldı. Karışım soğutulduktan sonra nanopartiküller etanol ile yıkanarak hexan ile dispers edildi. Bu aşama 3 kere tekrar edildi .

Yukarıdaki prosedürler dışında diğer bir prosedür [294] olarak; itriyum asetat (YAc, 0.78 mmol), iterbiyum asetat (YbAc, 0.2 mmol), erbiyum asetat (ErAc, 0.02 mmol) 6 mL oleik asit ve 15 mL oktadeken içerisinde 2 boyunlu 100 mL'lik balonda karıştırıldı. Bu karışım 160 °C'ye ısıtıldı ve homojen olana kadar karıştırıldı. Ardından tekrar oda sıcaklığına getirildi. 10 mL metanol içerisinde çözülmüş NaOH (2.5 mmol) ve NH_4F (4 mmol) çözeltisi balon içerisindeki karışıma yavaşça eklendi ve yarım saat karıştırıldı. Daha sonra çözelti içerisindeki metanolü uzaklaştırmak için 100 °C'de degas edildi ve sistem 310 °C'ye ısıtılarak argon gazı altında 1 saat karıştırıldı. Karışım soğutulduktan sonra nanopartiküller etanol ile yıkanarak hexan ile dispers edildi. Bu aşama 3 kere tekrar edildi. Nanopartiküllerin boyutu ve polidispersite indeksi DLS ve HR-TEM ile analiz edildi. Sonuç olarak istenen boyut ve şekilde nanopartiküllerin elde edildiği görüldü.

3.6.2 Sitrat kaplı UCNP sentezi (UCNP-C)

Suda dağılabilir UCNP'ler elde etmek için, literatürde anlatılan yöntem izlenerek ligand değişim prosedürü uygulandı [295]. Hekzanda dispers edilmiş oleat kaplı UCNP'ler, 0.1 M trisodyum sitrat (pH 4) çözeltisi ile 3 saat boyunca 700 rpm'de karıştırıldı. Daha sonra sulu/organik sistem ayırma hunisine aktarıldı ve sitrat kaplı $NaYF_4:Yb^{3+},Er^{3+}$ UCNP'leri içeren sulu faz izole edildi. Nanopartiküller asetonla çöktürüldü ve 15 dakika santrifüj edildi. Organik çözücü uzaklaştırıldı ve kalan nanopartiküller, kalan oleik asidi gidermek için pH 7'de 5 mL trisodyum sitrat

çözeltisinde yeniden dağıtıldı. Dispersiyon 2 saat daha karıştırıldı. Son olarak, sitrat kaplı UCNP'ler asetonla çöktürüldü, aseton ve suyla üç tur yıkamaya tabi tutuldu ve santrifüjlenerek toplandı. Sitrat kaplı UCNP'ler daha sonra daha ileri deneyler için 2 mL suda dağıtıldı.

3.7 Tetrablok Polimer Kaplı UCNP Nanoprobunun Hazırlanması (UCNP@P-Dox)

5 mg UCNP-C ve 10 mg P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz)/Dox tetrablok kopolimer çözeltileri, 1 mg/mL konsantrasyonlarda deiyonize suda ayrı ayrı hazırlandı. Daha sonra, polimer çözeltisi UCNP-C çözeltisine damla damla eklendi ve oda sıcaklığında bir gece boyunca 500 rpm'de karıştırıldı. Ardından, nanopartiküller üç kez su ve etanol ile yıkandı ve ardından 10000 rpm'de santrifüjlemeye tabi tutuldu. Son olarak oda sıcaklığında vakum altında kurutuldu. Hazırlanan UCNP@P-Dox nanopartikülleri TEM ile analiz edildi. UCNP@P-Dox nanoprobunun hazırlanmasında P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz)/Dox (P2/Dox) polimeri kullanıldı.

3.8 Manyetik Özellikli Glikopeptid Biyonanoprobaların Hazırlanması (UCNP@MP-Dox)

Manyetik özellikli Fe₃O₄ nanopartikülleri, tetrablok kopolimerlerdeki katekol (DopMA'daki) gruplarına bağlanarak tetrablok kopolimere manyetik özellik kazandırıldı [296]. Bunun için bir önceki aşamada elde edilen UCNP@P-Dox nanopartikülleri (10 mg) ve Fe₃O₄ (5 mg) 15 mL deiyonize suya (pH 8.5 ayarlı) eklendi ve karışım 10 dakika boyunca sonikasyona tabi tutuldu. Reaksiyon karışımını oda sıcaklığında 500 rpm hızında bir gece boyunca karıştırdıktan sonra, üretilen manyetik nanopartiküller harici bir mıknatıs kullanılarak izole edildi. Daha sonra, manyetik nanopartiküller üç kez su ve etanol ile yıkandı ve ardından oda sıcaklığında vakum altında kurutuldu. Hazırlanan UCNP@MP-Dox nanopartikülleri FTIR, DLS ve TEM ölçümleri ile karakterize edildi.

3.9 UCNP@MP-Dox Nanopartiküllerden Dox Salım Deneyi

Sentezlenen ilaç yüklenmiş nanopartiküllerin salım profilleri, uygun fizyolojik ortamlarda (kanser hücresinin endosomal pH değeri olan 5.5'te ve normal fizyolojik pH değeri olan 7.4'de) diyaliz membran yöntemi ile NIR ışık olmadan incelendi [297]. Bu amaçla diyaliz sistemlerinden belli zaman aralıklarıyla alınan örneklerin 490 nm'de UV-Vis absorbansları ölçüldü ve daha önceden yapılmış kalibrasyon grafiğinden derişim değerine geçildi.

3.10 siRNA Taşıyan Biyonanoproların Hazırlanması ve Salım Profillerinin İncelenmesi (UCNP@MP-Dox/siRNA)

UCNP@MP-Dox taşıyıcı sistemine hücrelerin apoptotik direnç göstermelerini önlemek amacı ile siRNA yüklendi. Tetrablok kopolimerdeki polizinin pozitif yükleri ile siRNA'nın eksi yüklerinin fiziksel olarak etkileşmesi sonucu elde edilen poliplekslerin kompleksleşme yüzdesi (azot/fosfat:N/P oranı) agoroz jel elektroforez metodu ile belirlendi [298].

3.11 Hazırlanan Teranostik Biyonanoproların *In Vitro* Çalışmalarla Test Edilmesi

3.11.1 Hücrelerin büyütülmesi

In vitro çalışmalar için MCF-7 (östrojene duyarlı) meme kanser hücre hatları ve 3T3/NIH (ATCC® CRL-1658) sağlıklı "mouse fibroblast hücresi" hücre hattı kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları, aseptik koşullar (37 °C'de, %10 CO₂'li ortam), %10 FBS, 100 U/mL penisilin ve 100 U/mL streptomisin içeren uygun besi ortamı kullanılarak yapıldı. Hücre besi yeri olarak, meme kanseri hücre hattı için D-MEM/F-12, sağlıklı hücre hattı için de RPMI1640 kullanıldı. Hücreler T-flasklarda %100 nemli inkübatörde büyütüldü. Hücrelerin gelişimi her gün mikroskop ile gözlemlenerek besi ortamları yenilendi.

3.11.2 Sitotoksikite çalışmaları

Kemoterapötik ilaç ve/veya siRNA taşıyan teranostik biyonanoproların 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 değişen konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde test edilmesiyle belirlendi. İlgili hücre hatları 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 37 °C’de gece boyu bekletildi. Ertesi gün hücelere farklı konsantrasyonlardaki malzemeler eklendi ve MTT analiz kitine uygun şekilde prosedür takip edilerek inkübasyon sonrası spektrofotometre ile ölçümü yapıldı. Her bir konsantrasyon için ölçüm en az 3 kere tekrar edilmiş olan veriler kıyaslanarak konsantrasyona bağlı grafiği çizildi ve relatif % hücre canlılığı ve IC₅₀ değeri tespit edildi. Ayrıca kontrol grubu olarak; ilaç taşımayan nanopartiküllerin toksisite değerleri incelendi [299].

3.11.3 Hücre içi alım çalışmaları

Biyonanoproların hücre içine girme etkinliği flow sitometri ile ölçüldü. Hücreler 6 bölmeli kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Çeşitli oranlarda biyananoprolar eklendikten sonra 6-12-24 saat 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücreler tripsin-EDTA ile toplanarak FBS içermeyen taze besiyerine alındı. Flow sitometre cihazı kullanılarak hücelere girmeyi başaran taşıyıcı sisteminin yüzdesi belirlendi [300]. Elde edilen verilere bağlı olarak hücre içi alımın, iki hücre tipi içinde aynı dozlar değerlendirilerek zamana bağlı değişimi gözlemlendi ve optimal çalışma konsantrasyonları belirlendi.

3.11.4 Biyananoproların apoptoz çalışmaları

Teranostik biyananoproların meme kanseri hücreleri üzerine olası apoptotik ve nekrotik etkilerin belirlenebilmesi için flow sitometri yöntemi ile apoptoz deneyleri yapıldı. İlgili hücre hatlarında apoptoz veya nekroza uğramış hücreleri belirlemek için Annexin V-FITC (yeşil fluoresans) ve non-vital boya olan propidium iodide (kırmızı fluoresans) ile boyanarak ikili boyama analizi literatürde belirtildiği gibi uygulandı [299]. Hücre hatları Dox (kontrol), siRNA (kontrol), UCNP@MP-Dox, UCNP@MP-siRNA ile UCNP@MP-Dox/siRNA biyananoprolarla 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile yapıştıkları yüzeyden kaldırılarak, soğuk PBS ile yıkandı ve kültür tüpüne aktarılarak Annexin V-FITC ile 2-8 °C’de 30 dakika, PI ile 5 dakika boyandı. Flow sitometre cihazı ile ölçümler alındı. Apoptotik etkinin varlığı “Erken Apoptotik Profil” üzerinden değerlendirildi.

3.12 Hazırlanan Teranostik Biyonanoproların *In Vivo* Çalışmalarla Test Edilmesi

In vivo çalışmalar için hazırlanan protokol, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu (etik kurul onay numarası: 2018/23) tarafından belirlenen hayvan bakım ve kullanım kurallarına göre gerçekleştirildi.

3.12.1 Meme tümör modelinin oluşturulması

Meme kanseri modeli, Tekeredeli İ. ve ark.'nın 2013 yılında Cell dergisinde bildirdikleri model oluşturma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlgili referans çalışmada; model organizma olarak Atimik dişi nude fareler kullanıldı (Tür adı; NCr nu/nu ve Jackson lab kodu; JAX stock #002019). Proje kapsamında model oluşturulma aşamalarında; 6-8 haftalık farelere östrojen reseptör pozitif MCF7 hücreleri 7×10^6 sayıda, sağ meme dokusuna enjekte edildi ve tümör büyümesini artırmak için 17β -östradiol gavaj yoluyla uygulandı [301]. Modelin oluşumu için bu referans makaledeki süreç uygulandı ve başarılı sonuç elde edildi.

3.12.2 Hazırlanan UCNP'lerin antikanser tedavisinde etkinliğinin incelenmesi

Teranostik biyonanoproların antikanser tedavisindeki etkinliğinin belirlenmesinde gerçekleştirilecek işlemlere ait deney grupları aşağıdaki gibidir:

Grup 1b. Negatif kontrol, tümör oluşturulmamış,

Grup 2b. Pozitif kontrol, tümör oluşturulmuş fakat tedavi uygulanmamış,

Grup 3b. Sadece Dox uygulanmış,

Grup 4b. Sadece siRNA uygulanmış,

Grup 5b. Dox-siRNA uygulanmış,

Grup 6b. UCNP@P-Dox uygulanmış,

Grup 7b. UCNP@P/siRNA uygulanmış,

Grup 8b. UCNP@P-Dox/siRNA uygulanmış.

3.12.3 *In vivo* biyodağılım ve farmakokinetik çalışmaları

Biyodağılım çalışmasında enjekte edilen ikili taşıma sisteminin kan içerisinde dolaşım süresi, hedefli bir şekilde tümöre gidip gitmeyeceği, diğer organlara dağılımı ve

birikmeye neden olup olmadığı, vücuttan atılma hız ve süresi, kısa ve uzun zamanda toksik bir etki yaratıp yaratmadığı gözden geçirildi.

Bu aşamada tetrablok kopolimerdeki fruktoz üniteleri içeren teranostik biyonanoproların hedeflenen MCF-7 meme kanseri modeli oluşturulmuş tümör dokusuna ulaşım ulaşımadığı belirlendi. Biyodağılım sürecinde, örnek enjeksiyonundan hemen önce, 30 dakika, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 9 saat, 12 saat ve 24 saat sonra IVIS Lumina Series III canlı hayvan görüntüleme sistemi ile görüntüleri alındı.

3.12.4 Histopatolojik antikanser etkilerinin değerlendirilmesi

Histopatolojik değerlendirmeler amacı ile her gruptan altı denek olmak üzere toplam yirmi dört denekten alınan tümöral kitlelerden hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Rutin laboratuvar işlemlerinin ardından kesitler, Mayer hemotoksilen ile boyanarak ışık mikroskobu (Olympus Bx53) altında incelendi ve Cell ^P programı (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3.4) vasıtasıyla fotoğrafları çekildi [302].

3.12.4.1 İmmunohistokimyasal boyama (IHC)

Avidin-Biotin Peroksidaz yöntemi olarak uygulandı. Kesitlere deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinin uygulanmasının ardından kesitler endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda (H₂O₂) 20 dk. süreyle inkübe edildi. Antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması amacıyla mikrodalga yöntemi uygulandı (sitrata buffer solüsyonu pH 6, 800 Watt, 10 dk.). Nonspesifik boyamaları engellemek amacıyla kesitlere 30 dk. süreyle non immun serum (Thermo Scientific Histostain IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF:TP-125-HL) uygulandı. Takibinde PBS'de seyreltilmiş Bcl-2 poliklonal antikoru, (PA5-27094/ 1:50) ve BAX monoklonal antikoru (6A7-MA5-14003/ 1:100) ile muamele edilen kesitler bir gece boyunca buzdolabında (4 °C) inkübe edildi. Ardından kesitler biyotinize sekonder antikor (Thermo Scientific Histostain IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF:TP-125-HL) ve peroksidaz bağlanmış Strep Avidin (Thermo Scientific Histostain IHC Kit, HRP, broad spectrum, REF:TP-125-HL) ile 30 dk. süresince oda ısısında bekletildi. Takibinde renk ortaya çıkarıcı substrat olarak AEC solüsyonu (Thermo Scientific Fisher REF: TA-125-HA) damlatıldı ve Mayer Hematoksilen ile boyanıp ve immun mount ile kapatıldı. Kapatma işleminin ardından hazırlanan

preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus Bx53) incelendi ve Cell ^P programı (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3.4) ve fotoğraflandı.

3.12.4.2 İmmunofloresan boyama

İndirekt immunofloresan methodu kullanıldı. Yapılan boyamalarda işaretli primer antikorlar Bcl-2 Polyclonal Antibody, (PA5-27094/ 1:50) ve BAX Monoclonal Antibody (6A7-MA5-14003/1:100) kullanıldı. Sekonder antikor olarak floresan işaretli (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Secondary Antibody, Alexa Fluor 488-A-11008) ve (Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Secondary Antibody, Alexa Fluor 555-A-21422) kullanıldı.

Çalışma kapsamında ikili immunofloresan boyama tekniği kullanıldı. Boyamalarda kesitlerin deparafinizasyonu ve hidrasyonu yapıldıktan sonra %3'lük H₂O₂ ile 20 dk. inkübe edilip, sonra kesitler sitrat buffer çözeltisine alınarak 10 dk. mikrodalga fırında kaynatıldı. Kesitlere normal serum uygulandıktan sonra, primer antikorlar ile gece boyunca buzdolabında +4 °C'de inkübe edildi. Sonra uygun floresan işaretli sekonder antikorlar karıştırılarak hazırlanıp bu karışımda oda ısısında 30 dk. inkübe edildi. Sekonder antikor uygulandıktan sonra floresan işaretin bozulmaması için tüm işlemler karanlık ortamda yapıldı. Sekonder antikor inkübasyonundan sonra kesitler distile su ile yıkanıp 5 dk. DAPI (ab104139) ile muamele edildikten sonra üzerine lamel kapatılarak floresan mikroskop altında incelendi.

Tümör alanındaki mitotik indeksi hesaplarırken Rudolph vd. (1998) [303] ve Çavuşoğlu vd. (2018) [304] yapmış olduğu hesaplamalara benzer şekilde mitotik aktivitenin en yüksek olduğu 10 alan belirlendi, daha sonra bu alanlardaki mitoz uğramış hücreler sayıldı ve toplam hücreye oranının 100 ile çarpılması sonucunda mitotik indeks hesaplandı.

(Mitotik indeks: Bir tümör dokusunda mitotik aktivitenin en yüksek olduğu 10 farklı tümör alanında sayılan mitoz sayısının toplam hücre sayısına oranıdır.)

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY:IBM Corp.) programları kullanılmıştır ve istatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile belirlenirken, grupların tek yönlü varyans analizi ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar ortalama ±

standart hata (SE) olarak verildi. Sonuçların değerlendirmesinde $P<0,05$ ifadesi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

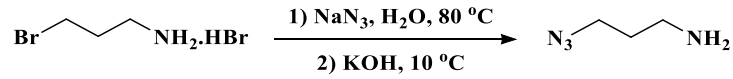
BAX ve Bcl-2 immunohistokimyasal boyamaların istatistiki analizlerinde, immunohistokimyasal yöntemle boyanan doku örnekleri mikroskop altında iki bağımsız patolog tarafından analiz edildi. BAX ve Bcl-2 immunohistokimyasal boyanmaların analizi Carcangiu vd. (1990) [305] tarafından beyan edilen yöntem ile yapıldı. İmmunpozitif hücrelerin yüzdesi ve yoğunluğu dikkate alındı. Sitoplazmik immun boyanma yüzdesi 0-%25 arası ise 1, %26-%75 arasında ise 2, %76'dan büyükse 3 olarak değerlendirildi. Boyama yoğunluğu ise yok veya zayıf: 1; güçlü: 2 ve çok güçlü: 3 şeklinde puanlandı. Her iki parametrenin toplamı tüm denekler için hesaplanıp gruplardaki hayvan sayılarına bölünerek grupların immünohistokimyasal skoru belirlendi ve istatistiki olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Başlatıcıların ve Monomerlerin Sentezi

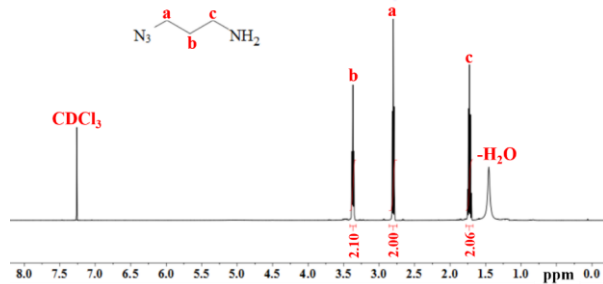
4.1.1 Halka açılma polimerizasyonunda kullanılan başlatıcı 1-azido-3-amino propan sentezi

Halka açılma polimerleşme reaksiyonunda başlatıcı olarak kullanılacak olan 1-azido-3-amino propan bileşiği yer değiştirme reaksiyonu ile elde edilmiştir. 3-bromopropil amin.HCl (1 eq.) ve sodyum azid (3 eq.) deiyonize su içinde çözüldü ve 80 °C’de gece boyu karıştırıldı. Ertesi gün çözücüsü vakum altında uzaklaştırıldı ve 3 kere dietiler ile ekstrakte edildi. MgSO₄ üzerinden kurutulduktan sonra vakum altında çözücü uzaklaştırıldı ve vakum destilasyonu ile saflaştırıldı. Ürün %75 verimle elde edildi ve -20 °C’de muhafaza edildi.



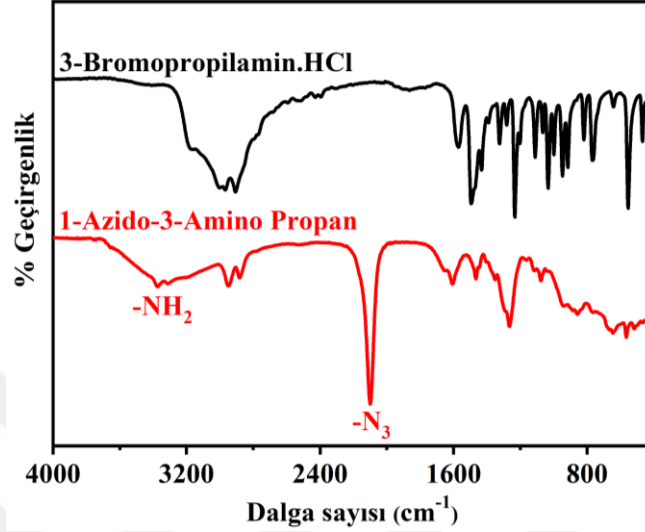
Şekil 4.1 : 1-Azido-3-amino propan sentezi.

Elde edilen ürün ¹H-NMR spektroskopisi ve FTIR analizleri ile karakterize edildi. Şekil 4.2’deki ¹H-NMR spektrumuna göre azid grubuna bağlı metilen protonlarının 3.9 ppm’den 3.4 ppm’e kayması bileşiğin başarıyla sentezlendiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4.2 : 1-Azido-3-amino propan bileşiğinin ait ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃).

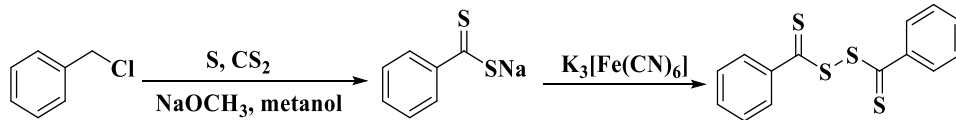
Ayrıca Şekil 4.3'te 1-azido-3-amino propan ile öncü bileşiği olan 3-bromo-propanamin.HCl bileşiğine ait FTIR spektrumlarının karşılaştırması verilmektedir. 1-azido-3-amino propan bileşiğe ait FTIR spektrumunda azid grubuna ait absorpsiyon pikinin $\sim 2090 \text{ cm}^{-1}$ ve amin grubuna ait absorpsiyon pikinin $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ 'de görünmesi yer değiştirme reaksiyonunun başarıyla olduğunu göstermektedir.



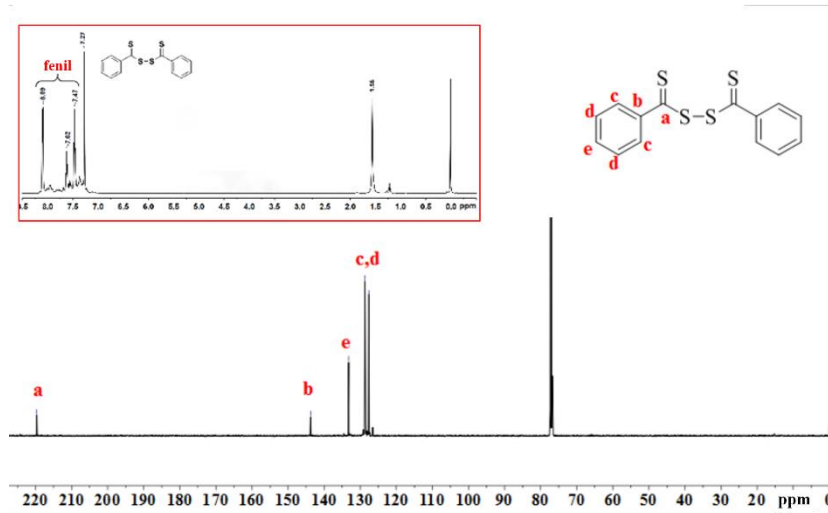
Şekil 4.3 : 3-Bromo-propanamin.HCl (siyah) ve 1-azido-3-amino propan (kırmızı) bileşiklerine ait FTIR spektrumu.

4.1.2 RAFT ajanının sentezi

Trimetilsillil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) RAFT ajanının sentezi üç aşamada gerçekleştirildi. İlk olarak di(tiyobenzoil)disülfid öncü bileşiği sentezlendi (Şekil 4.4) ve elde edilen ürünün kimyasal yapısı $^1\text{H-NMR}$ (Şekil 4.5) analizi ile karakterize edildi. Şekil 4.5 'te verilen $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde di(tiyobenzoil)disülfid bileşiğinin yapısındaki fenil protonlarına ait pikler 7.20-8.15 ppm arasında gözükmektedir. Bu sonuçlar ışığında RAFT ajanı sentezinde ilk öncü bileşik olan di(tiyobenzoil) disülfid bileşiği başarı ile sentezlenmiştir.

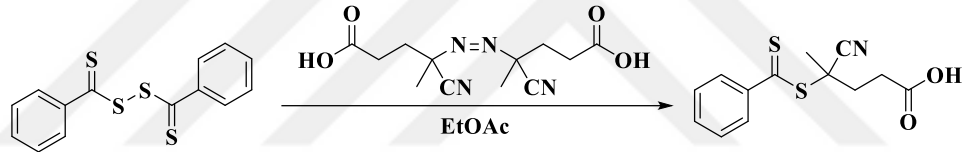


Şekil 4.4 : Di(Tiyobenzoil) disülfid sentezi.



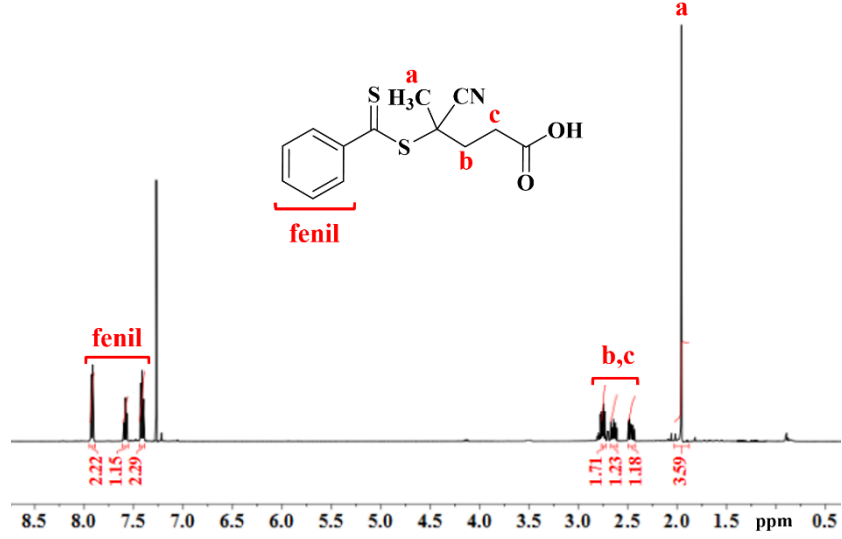
Şekil 4.5 : Di(Tiyobenzoil)disülfid bileşiğinin ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3).

Tez kapsamında kullanılan RAFT ajanı sentezinin 2. basamağında, ilk basamakta sentezlenen bileşik 4,4'-azobis(4-siyano pentanoik asit) ile reaksiyona konulduğunda 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) bileşiği elde edildi (Şekil 4.6).



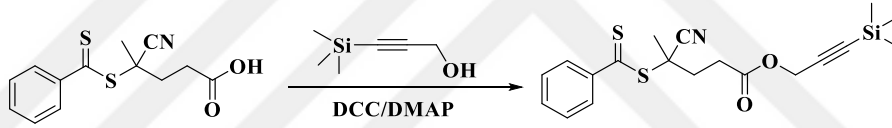
Şekil 4.6 : 4-Siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) sentezi

CPADB bileşiği önce kolon kromatografisi ile etil asetat:hekzan (1:4) eluent sistemi kullanılarak izole edildi. İzole edilen pembe katı ürün etil asetat:hekzan (1:3, v/v) karışımında kristalizasyonla saflaştırıldı. Sentezlenen CPADB bileşiğinin yapısının aydınlatılması için Şekil 4.7'de verilen ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde, (b) ve (c) ile simgelenen $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ grubu protonlarına ait pikler 2.45-2.73 ppm'de ve metil grubu ($-\text{CH}_3$) ve fenil halkası protonlarına ait piklerde sırasıyla 1.95 ppm'de ve 7.40-7.90 ppm arasında görülmektedir. Bu sonuçlara göre CPADB bileşiği başarı ile sentezlenmiştir.



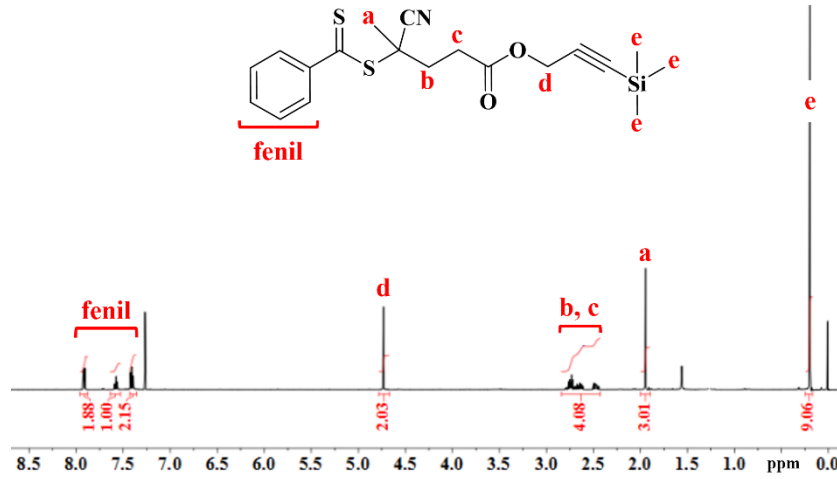
Şekil 4.7 : CPADB bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3).

RAFT ajanı sentezinin 3. basamağında, trimetilsillil propargil alkol ile CPADB reaksiyona girerek trimetilsillil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) RAFT ajanı sentezlendi (Şekil 4.8).



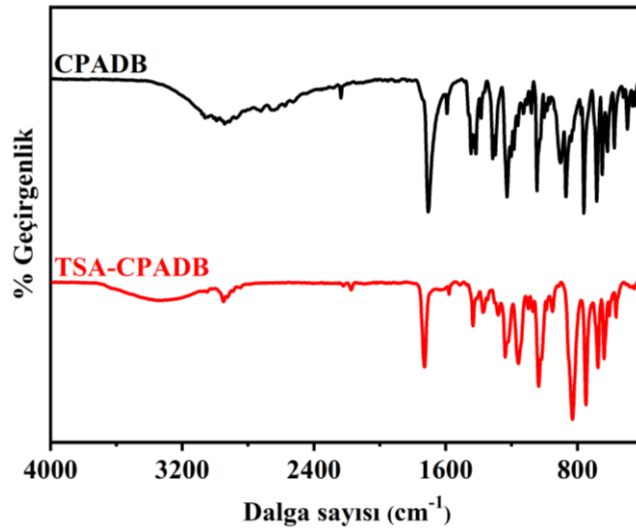
Şekil 4.8 : Trimetilsillil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) RAFT ajanı sentezi.

Ürünün kimyasal yapısı $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisi ile karakterize edildi. Şekil 4.9'da TSA-CPADB bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu incelendiğinde, metilen protonları 2.48-2.72 ppm'de; metil ve benzil halkası protonlarına ait piklerde sırasıyla 1.93 ppm'de ve 7.40-7.90 ppm arasında ve CPADB bileşiğine eklenen trimetilsillil grubuna ait metil protonlarının 0.18 ppm'de bulunmasıyla yapının başarı ile sentezlendiği görülmektedir. Bu sonuçlar ışığında TSA-CPADB bileşiği başarı ile sentezlenmiştir.



Şekil 4.9 : TSA-CPADB bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃).

CPADB ajanının FTIR spektrumunda; 3170-2475 cm⁻¹'de -COOH gerilme titreşiminden dolayı oluşan absorpsiyon bantları, 1745 cm⁻¹'de C=O grubunun (esterin karbonil bağı) gerilme titreşimleri ve 2230 cm⁻¹'de C≡N ve 1425 cm⁻¹'de C=C titreşimleri görülmektedir. TSA-CPADB ajanındaysa; 2850-2940 cm⁻¹'deki bantlar, hem simetrik hem de asimetrik C-H gerilme titreşimlerine, 760 cm⁻¹ ve 840 cm⁻¹'deki bantlar ise trimetilsilil grubunun (-Si-(CH₃)₃) karakteristik piklerine aittir. Ayrıca her iki spektrumda da -C=S ve C-S bantları sırasıyla 1040 cm⁻¹ ve 640 cm⁻¹'de gözlenmektedir.



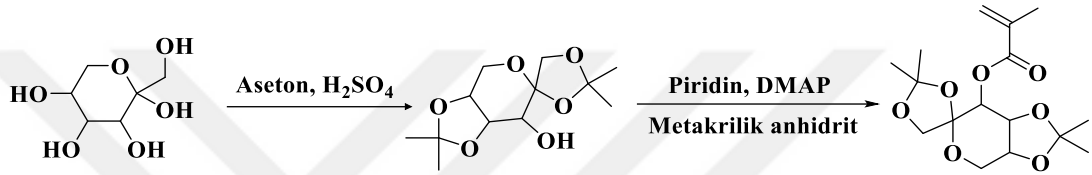
Şekil 4.1 : Trimetilsilil korumalı alkin fonksiyonlu 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (TSA-CPADB) RAFT Ajanı ve öncü bileşiğine ait FTIR spektrumları.

4.1.3 Monosakkarit monomerinin sentezi

4.1.3.1 1-*O*-Metakriloil-1,2:4,5-di-*O*-izopropiliden- β -D-fruktopiranoz

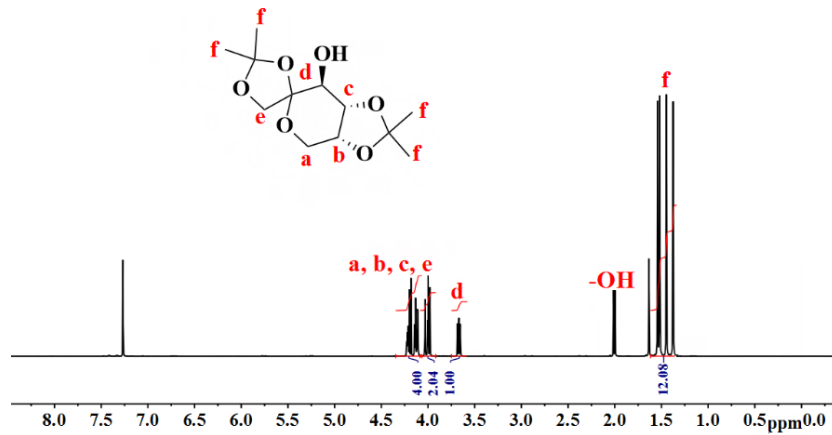
(*iprFr*₁MA) sentezi

Meme kanserine hedeflemeyi ve UCNP'lerin biyoyumluluğunu sağlayacak fruktoz ünitesi taşıyan metakrilat monomerinin sentezi 6 karbonlu bir ketoz olan fruktoz monomerinin sentezi için genel bir prosedür olarak, 5 hidroksil gruplarından 4'ü izopropiliden grupları ile korundu. Daha sonra korunmuş şekerlerin metakrilik anhidrit ile reaksiyonu piridin ve 4-dimetil aminopridin (DMAP) varlığında gerçekleştirilerek metakrilat ünitesi fruktoz bileşiğine kazandırıldı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 : *iprFr*₁MA monomerinin sentezi.

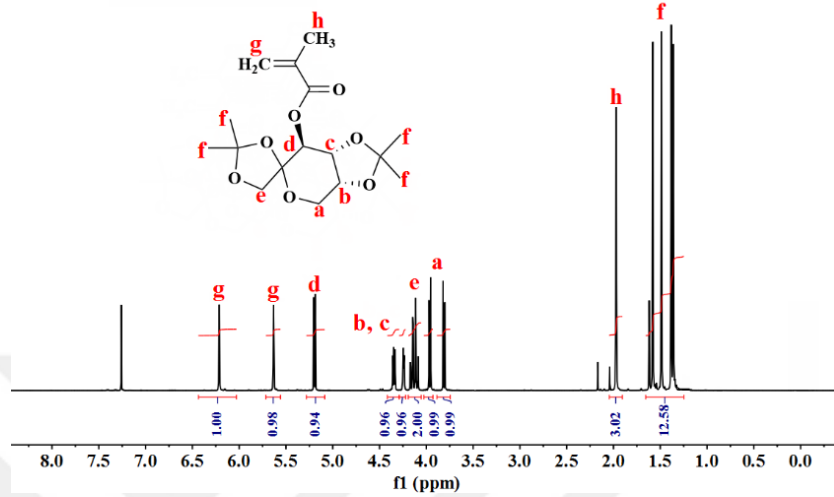
*iprFr*₁ bileşiği için ¹H-NMR spektrumu (Şekil 4.12) incelendiğinde, piran halkasındaki CH₂ protonlarına ait karakteristik pikler 4.18-4.00 (6H), piran halkasının –OH grubuna bağlı CH protonu 3.67 (1H), hidroksil grubu 2.01 (1H), metil grupları ise 1.54 (3H); 1.50 (3H); 1.43 (3H); 1.38 (3H) ppm'de görülmektedir.



Şekil 4.12 : 1,2:4,5-di-*O*-İzopropiliden- β -D-fruktopiranoz (*iprFr*₁) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu(CDCl₃).

Şekil 4.13'teki *iprFr*₁MA monomerine ait ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde, yapıya ait pikler 6.21 ve 5.63 ppm'de (g) protonu, 5.19 ppm'de (d) protonu, 4.35 ppm'de (b) protonu, 4.25 ppm'de (c) protonu, 4.12 – 4.06 ppm'de (e) protonu, 3.96 - 3.83 ppm'de

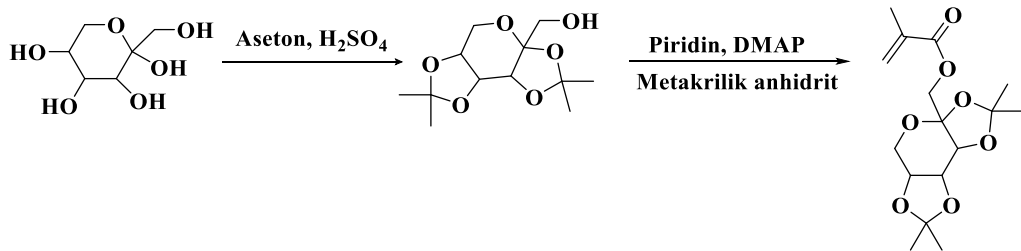
(a) protonu, 1.98 ppm’de (h) protonu, 1.58 - 1.36 ppm’de (f) protonları görülmektedir. Yapıya katılan metil akrilat grubuna ait protonlar 6.21-5.63 ppm’de net bir şekilde görülmektedir. Bu sonuçlara bağlı olarak şeker monomerinin başarı ile sentezlendiği gözlenmektedir.



Şekil 4.13 : 3-*O*-metakriloil-1,2:4,5-di-*O*-izopropiliden-β-D-fruktopiranoz (*iprFr*₁MA) monomerinin ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃).

4.1.3.2 1-*O*-Metakriloil-2,3:4,5-di-*O*-izopropiliden-β-D-fruktopiranoz (*iprFr*₂MA) sentezi

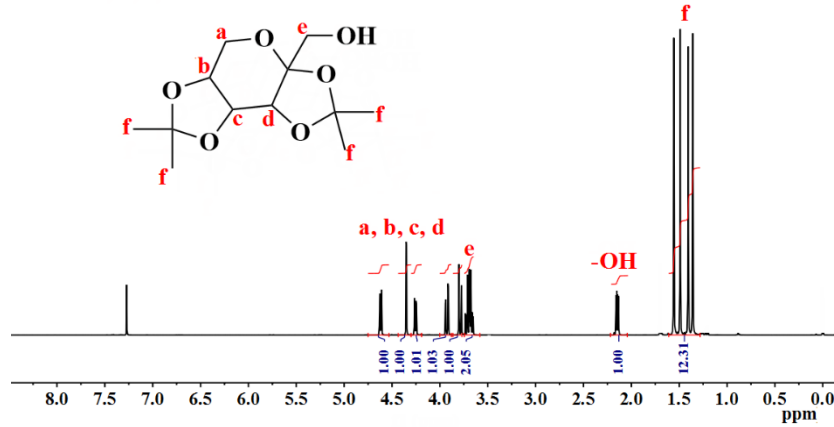
*iprFr*₁MA monomerinin sentezinde uygulanan prosedürdeki gibi öncelikle fruktozdaki 5 hidroksil grubundan 4’ü izopropiliden grupları ile korundu, ardından korunmuş fruktozun piridin ve DMAP varlığında metakrilik anhidrit ile reaksiyonu sonucu fruktoz bileşiğine metakrilat ünitesi kazandırıldı (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 : 1-*O*-Metakriloil-2,3:4,5-di-*O*-izopropiliden-β-D-fruktopiranoz (*iprFr*₂MA) sentezi.

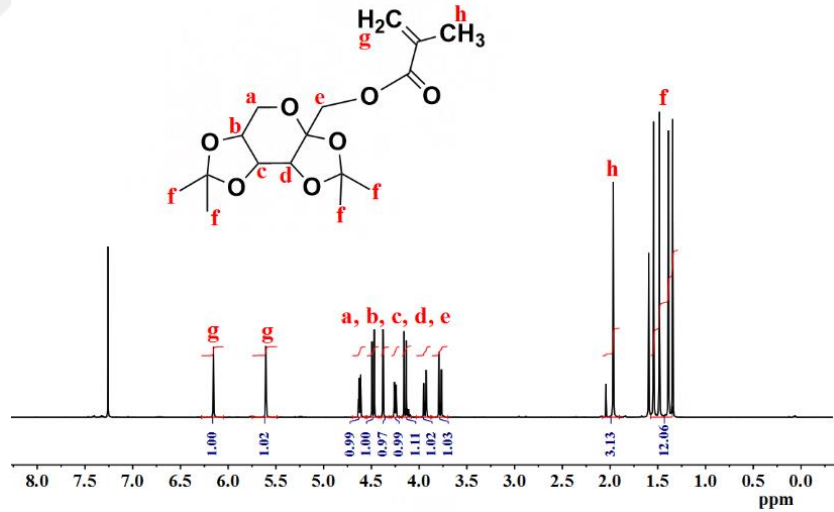
2,3:4,5-di-*O*-İzopropiliden-β-D-fruktopiranoz (*iprFr*₂) bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde, 1.56-1.37 ppm arasında metil gruplarına ait protonların bulunduğu, 2.25 ppm’de –OH grubuna ait proton pikini ve 3.62-3.78 ppm aralığında yapıda (e) ile simgelenen –CH₂ grubuna ait protonlara ait piklerin ve 3.79- 4.63 ppm

aralığında fruktoz halkasına ait protonlara ait piklerin bulunduğu ve yapının başarı ile sentezlendiği görülmektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 : 2,3:4,5-di-O-İzopropiliden- β -D-fruktopiranoz ($iPrFr_2$) monomerinin 1H -NMR spektrumu ($CDCl_3$).

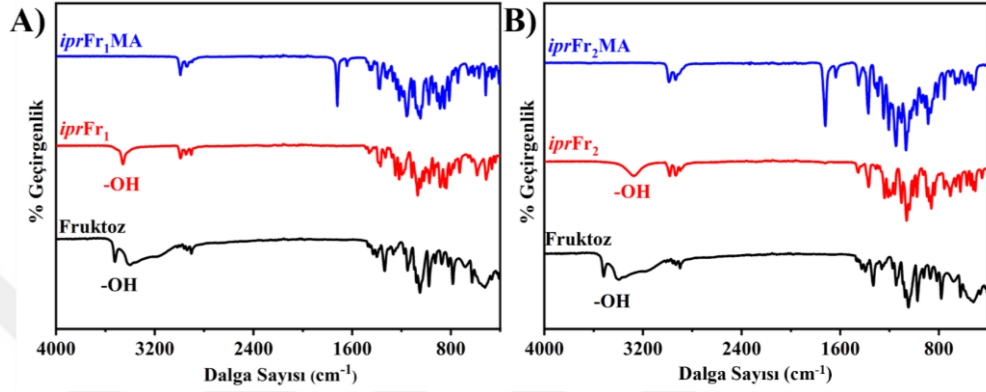
Şekil 4.16' da verilen ilgili spektrum incelendiğinde, monomerik yapıdaki metakrilat grubuna ait vinil protonları 5.61-6.16 ppm aralığında ve metakrilat grubunun metil protonlarına ait pik 1.98 ppm'de net görülmektedir. Böylelikle $iPrFr_2MA$ şeker monomerinin başarı ile sentezlendiği görülmektedir.



Şekil 4.16 : 1-O-Metakrililoil-2,3:4,5-di-O-izopropiliden- β -D-fruktopiranoz ($iPrFr_2MA$) monomerinin 1H -NMR spektrumu ($CDCl_3$).

Ayrıca, $iPrFr_1MA$ ve $iPrFr_2MA$ şeker monomerlerinin başarıyla sentezlendiği FTIR ölçümleri ile kanıtlandı. Buna göre ketalleşme reaksiyonundan sonra şekere ait hidroksil gruplarına ait $2900-3450\text{ cm}^{-1}$ 'deki geniş pik kaybolmuştur. $iPrFr_1$ ve $iPrFr_2$ spektrumlarında şeker ünitesine ait karakteristik bandlar olan; 3513 cm^{-1} -OH gerilme bandını, $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ -CH gerilme bandlarını ve karbonhidratlara özgü

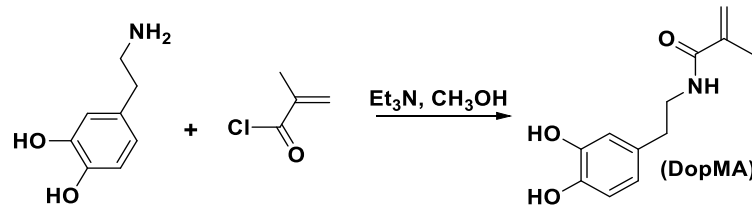
karakteristik C-O ve C-C gruplarına ait titreşim bandları 600-1500 cm^{-1} aralığında görülmektedir. Metakrilatlaşma reaksiyonundan sonra ise fruktozda 3500 cm^{-1} 'de belirgin bir şekilde gözlenen -OH gerilme bandının kaybolmuş ve 2800-3000 cm^{-1} 'de -CH gerilme bandlarının şiddeti artmıştır. Ayrıca -C=O gerilmesine ve -C=C- titreşimine ait bandların belirgin bir şekilde sırasıyla 1650 cm^{-1} 'de ve 1500 cm^{-1} 'de ortaya çıktığı görülmektedir (Şekil 4.17).



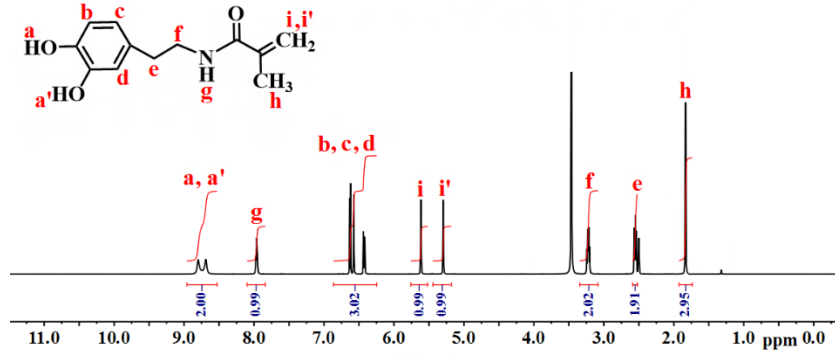
Şekil 4.17 : A) 3-*O*-Metakrilol-1,2:4,5-di-*O*-izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (*iprFr*₁MA) bileşiğinin ve öncülerinin, B) 1-*O*-metakrilol-2,3:4,5-di-*O*-izopropiliden- β -D-fruktopiranoz (*iprFr*₂MA) bileşiğinin ve öncülerinin FTIR spektrumları.

4.1.4 *N*-(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomerinin sentezi

Manyetik nanopartikülleri (Fe_3O_4) taşıma görevini üstlenen tetrablok kopolimerdeki diğer bileşen dopamin metakrilamid monomeridir. 4-(2-aminoetil)benzen-1,2-diol'ün metakrilol klorür ile trietilamin varlığında gerçekleştirilen amidleşme reaksiyonu sonucunda elde edildi (Şekil 4.18) [284]. Ürün $^1\text{H-NMR}$ analizi ile karakterize edilmiştir. (Şekil 4.19).

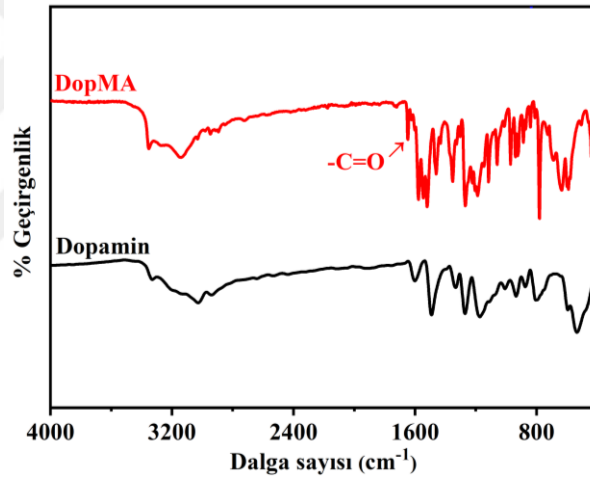


Şekil 4.18 : *N*-(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomerinin sentezi.



Şekil 4.19 : *N*-(3,4-Dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomerinin ¹H-NMR spektrumu (DMSO-d₆).

Şekil 4.20'deki DopMA monomerinin FTIR spektrumunda ise metakrilat ünitesi bileşiğe kazandırıldıktan sonra -C=O gerilimine ait 1645 cm⁻¹ absorpsiyon piki açıkça görülmektedir.

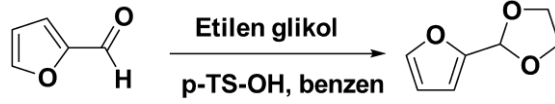


Şekil 4.20 : *N*-(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid (DopMA) monomeri ve öncü bileşiğinin FTIR spektrumlarının karşılaştırması.

4.1.5 2-(4-Formil- 1,3-diokso- 1,3,3a,4,7,7a –hekzahidro -2H-4,7-epoksisoindol-2-il) etilmetakrilat monomerinin sentezi (MiMA)

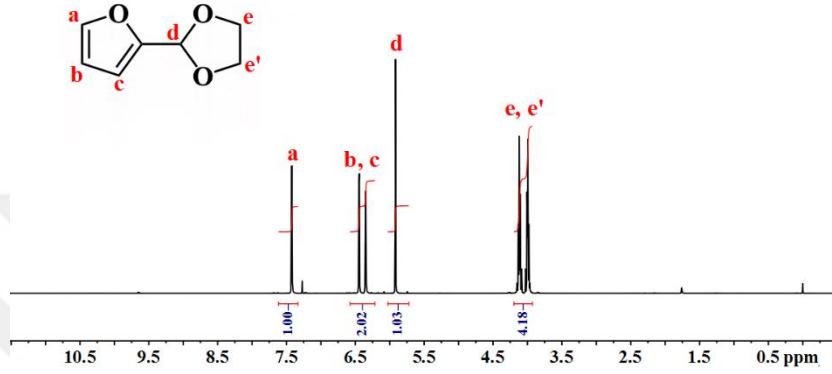
İlaç salımı yapabilme özelliğine sahip furan korumalı maleimid fonksiyonel grubu taşıyan monomerin sentezi dört basamakta gerçekleşmektedir. Metakrilat fonksiyonallitesi metakriloil klorür ile trietilamin varlığında gerçekleştirilen esterleşme reaksiyonu ile bileşiğe kazandırıldı.

Furfural bileşiğinin aldehit grubunun etilen glikolle korunması sonucunda oluşan ürün vakum destilasyon yöntemi ile saflaştırıldı (Şekil 4.21).



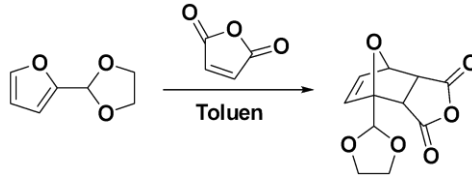
Şekil 4.21 : 2-(Furan-2-il)-1,3-dioksolan sentezi (FurKet).

2-(Furan-2-il)-1,3-dioksolan (FurKet) bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ analizi (Şekil 4.22) sonucunda bütün protonlara ait piklerin yer aldığı ve integrasyonlarının uyduğu, şeffaf renkli sıvı maddenin başarılı bir şekilde sentezlendiğini kanıtlamaktadır.

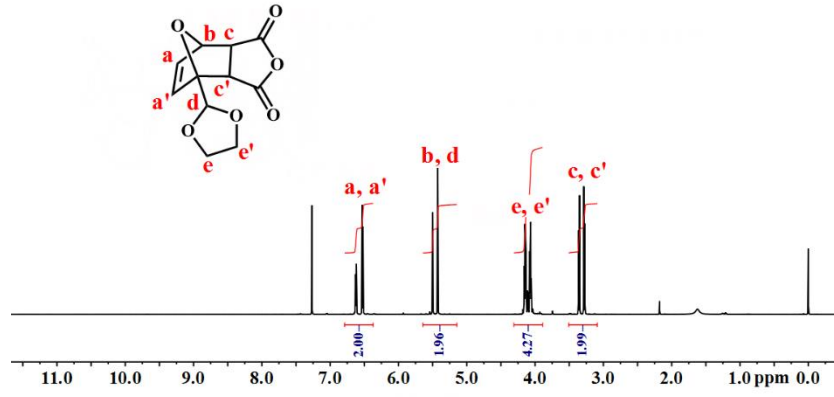


Şekil 4.22 : 2-(Furan-2-il)-1,3-dioksolan (FurKet) bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3).

FurKet bileşiğinin maleik anhidrit ile Diels-Alder reaksiyonu sonucunda oluşan FurKetMi (Şekil 4.23) (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-dioksolan-2-il)-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7epoksisobenzofuran-1,3-dion) bileşiğinin yapısı $^1\text{H-NMR}$ analizi ile incelendiğinde bütün protonlara ait piklerin yer aldığı ve integrasyonlarının uyduğu bileşiğin başarılı bir şekilde sentezlendiğini kanıtlamaktadır (Şekil 4.33 A-B).

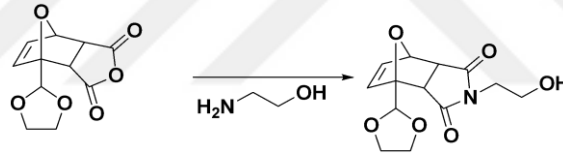


Şekil 4.23 : (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7 epoksisobenzofuran-1,3-dion sentezi (FurKetMi).

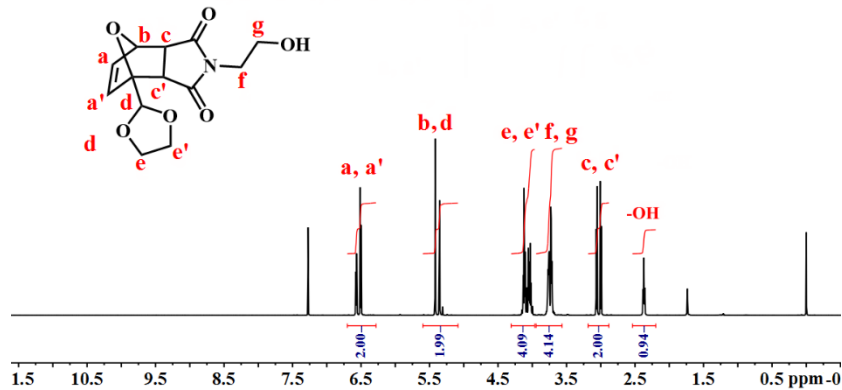


Şekil 4.24 : (3aS, 4R, 7R, 7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-3a,4,7,7a-tetrahidro- 4,7 epoksisobenzofuran- 1,3-dion (FurKetMi) bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ NMR spektrumu (CDCl_3).

FurKetMi bileşiğinin etanol aminle reaksiyonu sonucunda oluşan (Şekil 4.25) 3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-dioksolan-2-il)-2-(2-hidroksietil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoksisoindol-1,3(2H)-dion (FurKetMiOH) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ analizinde (Şekil 4.26) yapıya katılan metilen piklerinin 3.73 ppmde gözükmesi ayrıca 2.37 ppm OH pikinin gözükmesi bileşiğin saf olarak elde edildiğini doğrulamaktadır.

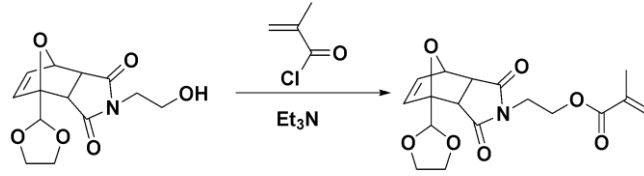


Şekil 4.25 : (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-2-(2-hidroksietil)- 3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoksisoindol-1,3(2H)-dion sentezi (FurKetMiOH).



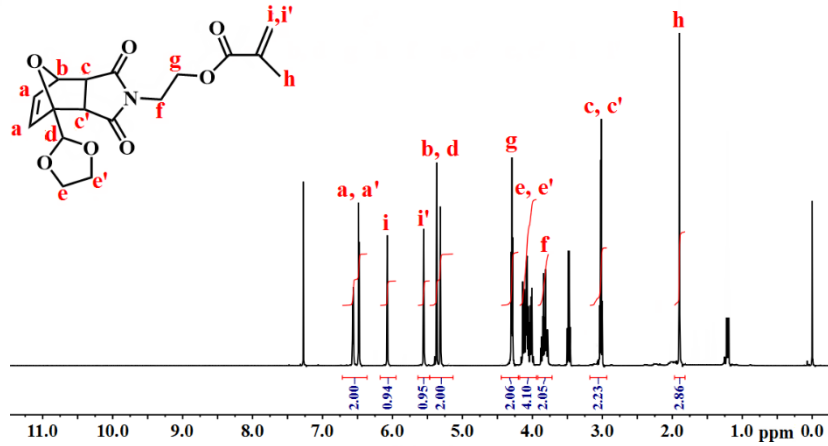
Şekil 4.26 : (3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il) -2- (2-hidroksietil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoksisoindol-1,3(2H)-dion (FurKetMiOH) bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3).

Son basamak olarak 2-((3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etil metakrilat monomerinin (MiMA) eldesinde FurKetMiOH bileşiği metakriloil klorür ile reaksiyona sokularak sentezlendi (Şekil 4.27).

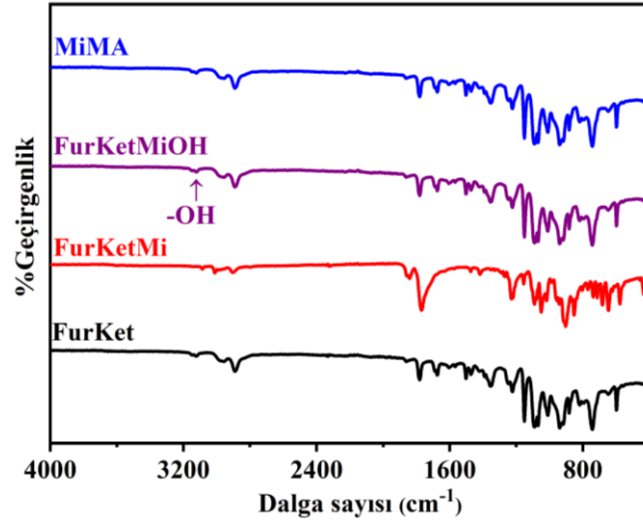


Şekil 4.27 : 2-((3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etil metakrilat sentezi (MiMA).

MiMA monomerinin kolon kromatografisi (silika jel 60 Å, 70-230 mesh) ile etil asetat:hekzan (1:2) eluent sistemi kullanılarak izole edildi. Çözücü karışımı vakum altında uzaklaştırılıp koyu kahverengi viskoz ürün elde edildi. Madde etilasetat ile çözülüp hekzanda çöktürüldü. Gece boyunca -18 °C’de bekletildi. Beyaz katı ürün elde edildi. Elde edilen monomerin kimyasal yapısı ¹H-NMR analizi (Şekil 4.28) ile doğrulandı. MiMA monomeri ve öncü bileşikler fonksiyonel grup analizleri FTIR ile doğrulandı (Şekil 4.29).



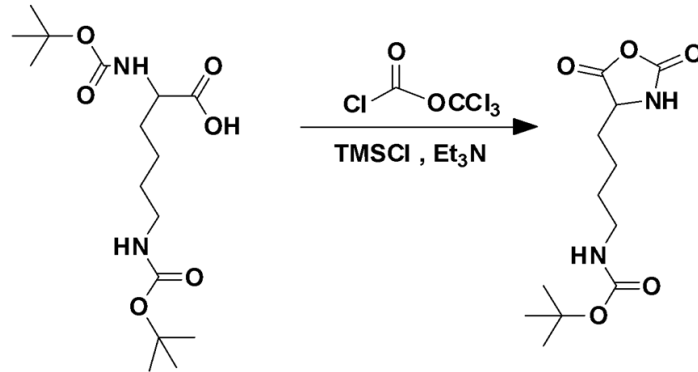
Şekil 4.28 : 2-((3aS,4R,7R,7aR)-4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etil metakrilat (MiMA) bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃).



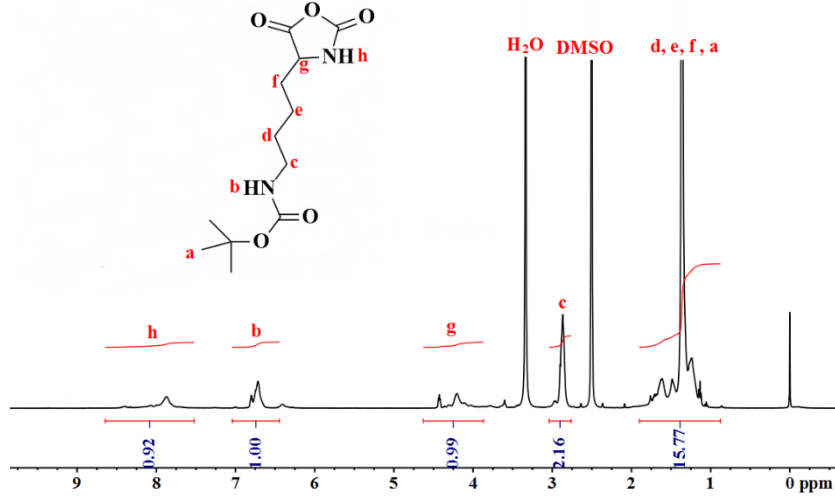
Şekil 4.29 : MiMA monomerinin ve öncü bileşikleri FurKet, FurKetMi ve FurKetMiOH'a ait FTIR spektrumları.

4.1.6 Lizin monomerinin sentezi (*t*Boc-Liz-NCA)

siRNA taşıma görevini üstlenecek lizin monomeri *t*Boc-koruma grubu ile aşağıdaki yöntem kullanılarak sentezlendi. Bu doğrultuda lizin monomerinin sentezinde öncelikle amino grupları di-*ter*-butil dikarbonat bileşiği ile korundu ve akabinde gerçekleştirilen halka kapanma reaksiyonu ile *N*-(*ter*-bütoksi karbonil)-L-lizin *N*-karboksianhidrit (*t*Boc-Liz-NCA) monomeri elde edildi (Şekil 4.30). Elde edilen bileşiğin kimyasal yapısı ¹H-NMR analizi (Şekil 4.31) ile doğrulandı.

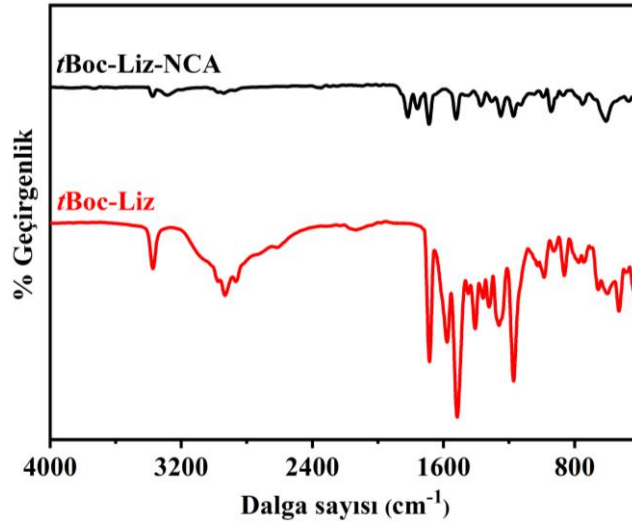


Şekil 4.30 : *N*-(*ter*-Bütoksi karbonil)-L-lizin *N*-karboksianhidrit bileşiğinin sentezi.



Şekil 4.31 : *N*-(*ter*-Bütoksi karbonil)-L-Lizin *N*-karboksianhidrit (*t*Boc-Liz-NCA) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃).

Şekil 4.32’de *t*Boc-Liz-NCA sentezinin her basamağı için FTIR spektrumları alınarak yapılar aydınlatılmıştır. İlgili spektrum incelendiğinde, *t*Boc-Liz’e ait spektrum incelendiğinde 1690 cm⁻¹’de belirgin bir C=O bandı, 1630 cm⁻¹’de N-H bükülmesi ve 1164 cm⁻¹’de C-O gerilmesine ait spesifik bandlar bulunmaktadır. *t*Boc-Liz-NCA bileşiğine ait FTIR spektrumu incelendiğinde ise, 3370 cm⁻¹’de N-H gerilmesi ve 1850 cm⁻¹’de ve 1790 cm⁻¹ N-karboksianhidrit’den gelen C=O gerilmesinin spektrumda gözlenmesi yapının başarı ile sentezlendiğini göstermektedir.



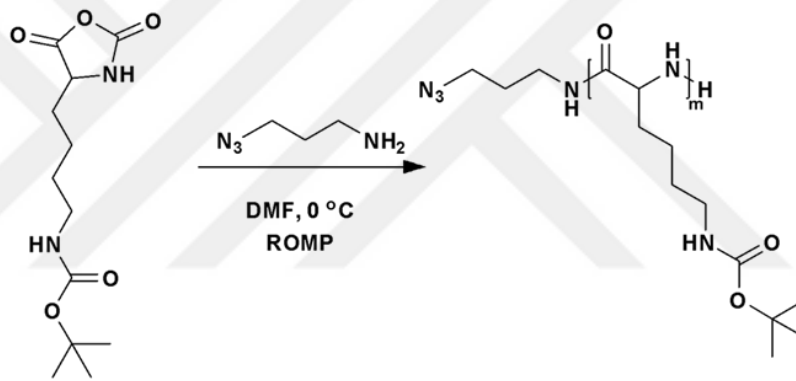
Şekil 4.32 : *t*Boc-Liz ve *t*Boc-Liz-NCA’nın FTIR spektrumları.

4.2 Polimerizasyon Reaksiyonları

Bütün organik bileşiklerin başarı ile sentezlenmesinden sonra polimerlerin hazırlanmasına geçildi. Bu bağlamda, polilizin polimeri halka açılma polimerizasyon yöntemi ile triblok glikopolimer ise tersinir katılma-parçalanma zincir transfer (RAFT) polimerleşme tekniği ile hazırlandı.

4.2.1 ω -Azido Fonksiyonlu *N-ter*-bütiloksikarbonil-L-lizin polimerinin sentezi (P(*t*Boc-Liz)-N₃)

Halka açılma polimerizasyonu ile P(*t*Boc-Liz)-N₃ peptid polimerinin sentezi [M]:[I] = [50]:[1] oranında ve monomer 1 g olacak şekilde 0 °C’de gerçekleştirildi (Şekil 4.42). Polimer THF ile çözülüp dietileterde çöktürülerek reaksiyona girmemiş monomere uzaklaştırıldı.



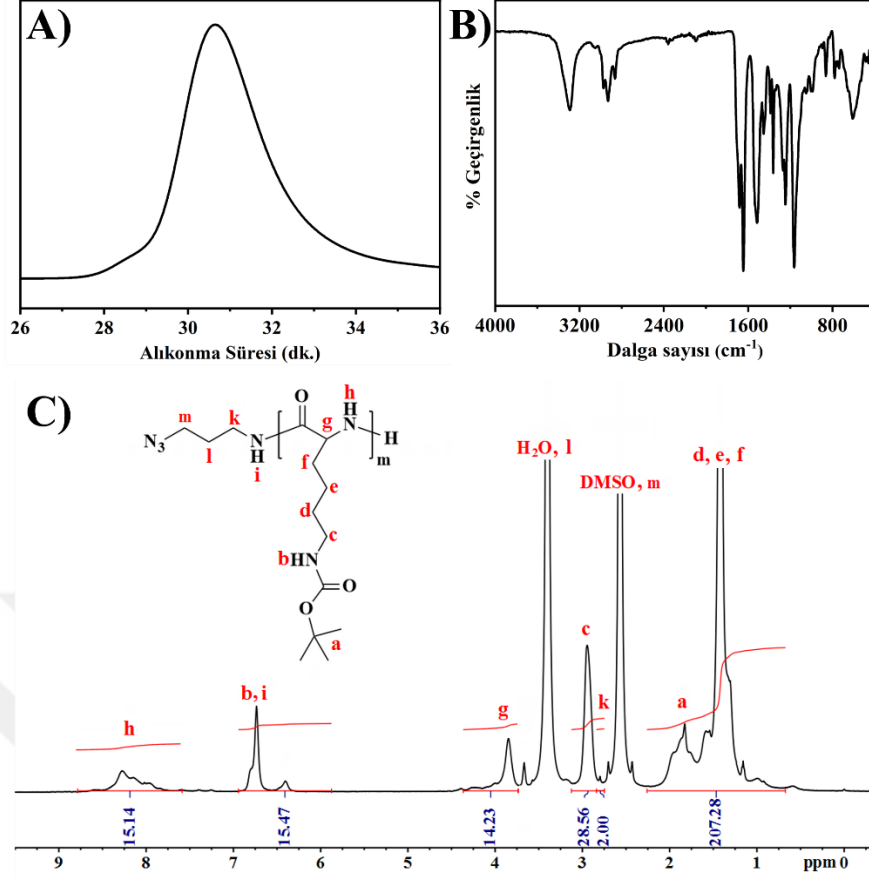
Şekil 4.33 : ω -Azido fonksiyonlu *N-ter*-bütiloksikarbonil-L-lizin polimerinin sentezi.

Halka açılma polimerizasyonu 2 kez tekrar edildi ve elde edilen polimerlerin polimerizasyon koşulları ve molekül ağırlığı karakterizasyonları Tablo 4.1’de özetlenmektedir. THF-GPC analizinde monomodal pik elde edildi.

Tablo 4.1 : P(*t*Boc-Liz)-N₃ homopolimerlerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	[M]:[I]	Zaman (gün)	Dön (%)	$M_{n,NMR}$	$M_{n,GPC}$	\bar{D}
1	P(<i>t</i> Boc-Liz)-N ₃	50:1	4	28	3300	2650	1.36
2	P(<i>t</i> Boc-Liz)-N ₃	50:1	4.5	30	3500	4450	1.22

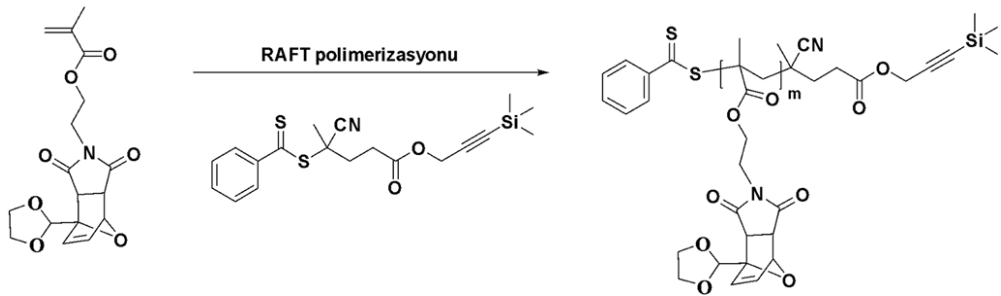
Ayrıca P(*t*Boc-Liz)-N₃ polimerinin molekül ağırlığı ve uç grup analizi NMR analizi ile yapılmış monomer dönüşümü % 28 ve % 30 olarak hesaplandı. (Şekil 4.34).



Şekil 4.34 : P(*t*Boc-Liz)-N₃ polimerine ait A) DMF-GPC, B) FTIR ve C) ¹H-NMR analizi sonucu.

4.2.2 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7 epoksiisoindol-2-il)etil metakrilat) homopolimerizasyonu (PMiMA)

Polimerizasyon [M]:[RAFT]:[I]=40:1:0.125 oranında ve monomer 2 g olacak şekilde 70 °C’de gerçekleştirildi (Şekil 4.35). Polimer asetonitril ile çözümlü dietilerde çöktürülerek reaksiyona girmemiş monomerden uzaklaştırıldı.

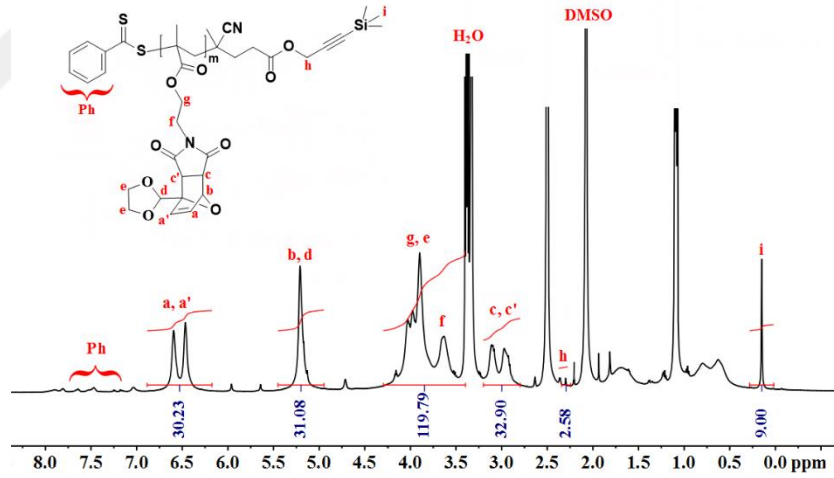


Şekil 4.35 : PMiMA homopolimer sentezi.

Elde edilen homopolimerin molekül ağırlığı $^1\text{H-NMR}$ analizi (Şekil 4.36) ve THF-GPC (Şekil 4.40A) ile belirlendi. Polimerizasyon koşulları ve sonuçları Tablo 4.2’de özetlenmektedir. Polimetilmetakrilat standartlarına göre kalibre edilmiş THF-GPC’den elde edilen molekül ağırlığı 2650 ve polidispersite indeksi ise 1.25 olan monomodal gaussian pik elde edildi (Tablo 4.2, Şekil 4.40A). Ayrıca molekül ağırlığı ve uç grup analizi NMR analizi ile yapılmış monomer dönüşümü %26 olarak hesaplandı. NMR’ dan hesaplanan molekül ağırlığı ise $M_n=4250$ g/mol bulundu. $^1\text{H-NMR}$ analizi sonucunda polimerin tekrarlanan ünitesi (degree of polymerization, DP_n) 11 olarak bulundu. Yüklenen ilaç miktarını artırabilmek için ikinci yapılan polimerleşmede ise polimerizasyon süresi uzatılarak polimerin tekrarlanan ünitesi artırıldı ve 14 olarak NMR’ dan hesaplandı (Tablo 4.2, No:2).

Tablo 4.2 : PMiMA homopolimerininin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	[M]:[RAFT]:[I]	Zaman (saat)	Dön (%)	M_{n,NM_R}	$M_{n,teo}$	$M_{n,GPC}$	\bar{D}
1	PMiMA	40:1:0.125	7	26	4250	4050	2650	1.25
2	PMiMA	40:1:0.125	9	35	5300	5900	2860	1.35

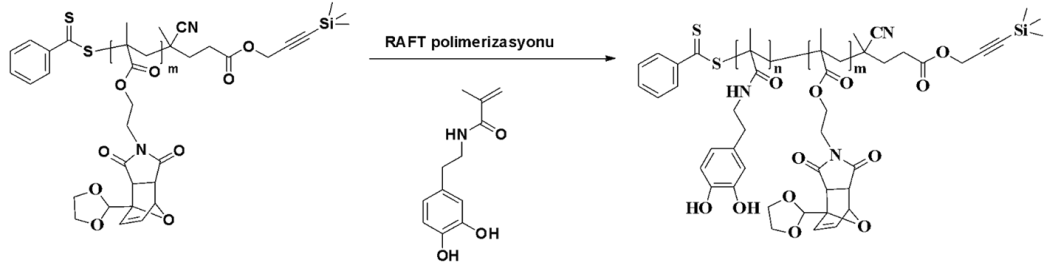


Şekil 4.36 : Hazırlanan PMiMA homopolimerine ait $^1\text{H-NMR}$ analizi sonucu.

4.2.3 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3a,4,7,7a-hekzahidro-2H-4,7 epoksisoindol-2-il)etilmetakrilat-blok-N-(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid) diblok polimerizasyonu P(MiMA-b-DopMA)

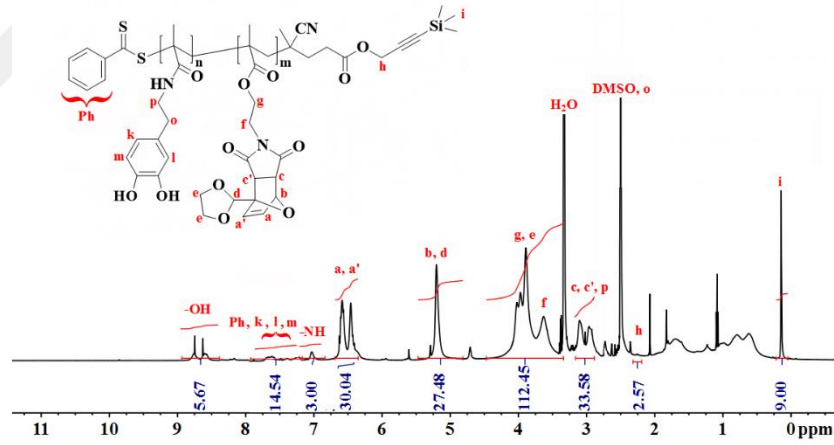
Diblok polimerizasyon $[M]:[MacroRAFT]:[I] = 33:1:0.135$ oranında ve homopolimer 0.5 g, DopMA monomeri 1.43 g olacak şekilde 70 °C’de gerçekleştirildi (Şekil 4.37).

Polimer asetonitril ile çözülüp dietilerde çöktürülerek reaksiyona girmemiş monomerden uzaklaştırıldı.



Şekil 4.37 : P(MiMA-*b*-DopMA) diblok polimer sentezi.

Elde edilen diblok kopolimerin molekül ağırlığı THF-GPC ve ¹H-NMR analizi ile aydınlatıldı (Tablo 4.3). ¹H-NMR analizi ile 3 ünite monomerin polimerleştiği tespit edildi (Şekil 4.38). Monomer: Makro-RAFT ajanının polimerizasyon oranı 40 tutulduğunda aynı sürede monomer dönüşümü %10 olarak hesaplandı. Hazırlanan P(MiMA-*b*-DopMA) diblok kopolimerine ait molekül ağırlığı karakterizasyonları Tablo 4.3’de özetlenmektedir.



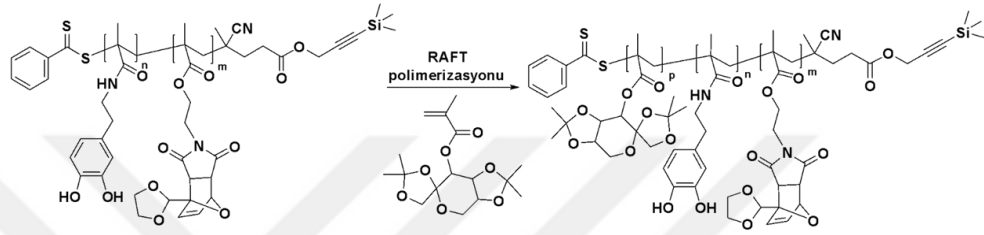
Şekil 4.38 : Hazırlanan P(MiMA-*b*-DopMA) diblok kopolimerine ait ¹H-NMR analizi sonucu.

Tablo 4.3 : P(MiMA-*b*-DopMA) diblok kopolimerininin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	[M]:[RAFT]:[I]	Zaman (saat)	Dön (%)	$M_{n,NMR}$	$M_{n,teo}$	$M_{n,GPC}$	\bar{D}
1	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA)	33:1:0.135	8,5	9	4900	8300	3450	1,34
2	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA)	40:1:0.135	8,5	10	5150	7600	2680	1,36

4.2.4 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3^a,4,7,7^a-heksahidro-2H-4,7-epoksisoindol-2-il)etilmetakrilat-*blok-N*-(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid)-*blok-3-O*-metakriloil-1,2:4,5-di-*O*-izopropiliden- β -D-frukto-piranoz) triblok kopolimerizasyonu (P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-iprFr₁MA))

Triblok polimerizasyon [M]:[Makro-RAFT]:[I] = 200:1:0.175 oranında ve diblok polimer 0.21 g, iprFr₁MA monomeri 2.773 g olacak şekilde 70 °C’de gerçekleştirildi (Şekil 4.39). Polimer asetonitril ile çözülüp dietileterde çöktürülerek reaksiyona girmemiş monomerden uzaklaştırıldı.

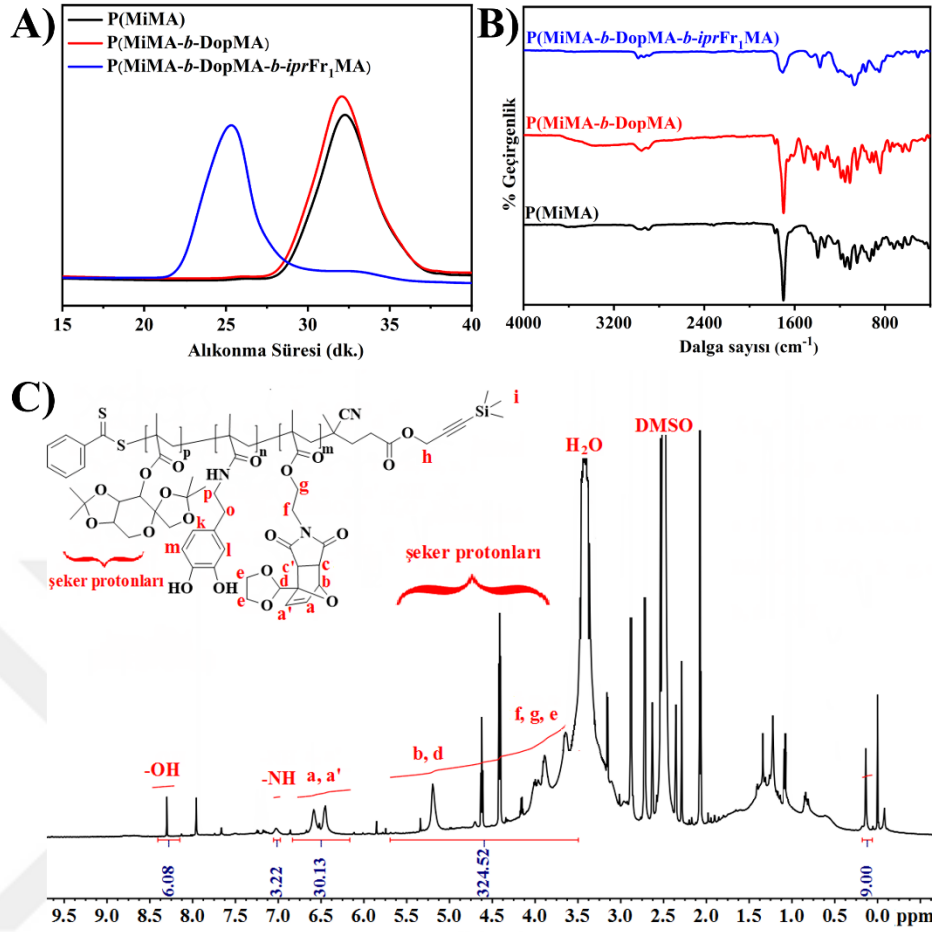


Şekil 4.39 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-iprFr₁MA) triblok polimer sentezi.

Elde edilen ürünün kimyasal yapısı ¹H-NMR analizi (Şekil 4.40C) ve THF-GPC (Şekil 4.40A) ile aydınlatıldı. ¹H-NMR analizi ile 106 ünite şeker monomerinin polimerleştiği tespit edildi. Tablo 4.4’te sentezlenen triblok kopolimerin molekül ağırlığı ve polimerizasyon koşulları verilmektedir.

Tablo 4.4 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-iprFr₁MA) triblok kopolimerininin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	[M]:[RAFT]:[I]	Zaman (saat)	Dön (%)	$M_{n,NMR}$	$M_{n,teo}$	$M_{n,GPC}$	\bar{D}
1	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -iprFr ₁ MA)	200:1:0.175	7.5	53	39950	27500	41000	1.37



Şekil 4.40 : P(MiMA), P(MiMA-*b*-DopMA) ve P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₁MA) polimerlerine ait **A)** THF-GPC, **B)** FTIR analizleri ve **C)** P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₁MA) polimerine ait ¹H-NMR analizi sonucu.

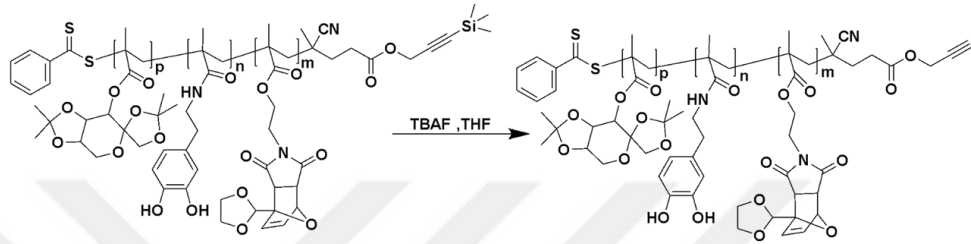
4.2.5 Poli(2-(4-(1,3-Dioksolan-2-il)-1,3-diokso-1,3,3^a,4,7,7^a-heksahidro-2H-4,7-epoksisindol-2-yl)etilmetakrilat-*blok-N*-(3,4-dihidroksifenetil)metakrilamid)-*blok-1-O*-metakriloil-2,3:4,5-di-*O*-izopropiliden- β -D-fruktopiranoz) triblok kopolimerizasyonu (P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₂MA))

Triblok polimerizasyon reaksiyonu [M]:[MakroRAFT]:[I]=200:1:0.175 oranında, diblok kopolimer (P(MiMA-*b*-DopMA)) 0.20 g ve *iprFr*₂MA monomeri 2.529 g tartılarak, 70 °C'de gerçekleştirildi (Şekil 4.41). Polimer asetonitril ile çözülüp dietilerde çöktürülerek reaksiyona girmemiş monomerden uzaklaştırıldı.

4.2.6 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA) Triblok kopolimerinin trimetilsillil grubu hidrolizi

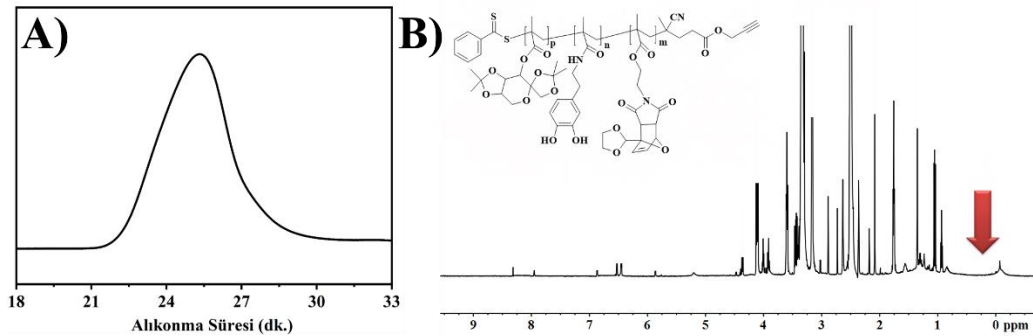
P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA) ve P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA) triblok kopolimerlerinin ucunda bulunan trimetilsillil koruma grupları tetra-*n*-butilamonyum florür (TBAF) varlığında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu ile uzaklaştırıldı.

P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA) triblok kopolimeri THF ile çözülerek, TBAF (0.025 mL, 1 M) çözeltisi varlığında, oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi (Şekil 4.43).



Şekil 4.43 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA) triblok polimerinin TBAF hidroliz reaksiyonu.

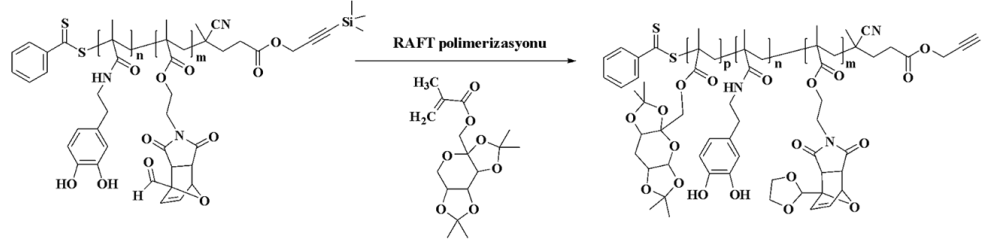
¹H-NMR analizine göre 0.19 ppm de çıkan trimetilsillil gruplarına ait pikin kaybolduğu tespit edilmiştir. TBAF hidroliz reaksiyonu etkinliği NMR'dan %100 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca triblok kopolimerinin alınan GPC ölçümünde molekül ağırlığının değişmemiştir bu da hidroliz reaksiyonu sonucunda herhangi bir degradasyon olmadığını ispatlamaktadır (Şekil 4.44).



Şekil 4.44 : TBAF hidroliz sonrası P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA) triblok polimerinin A) THF-GPC ve B) ¹H-NMR analiz sonuçları.

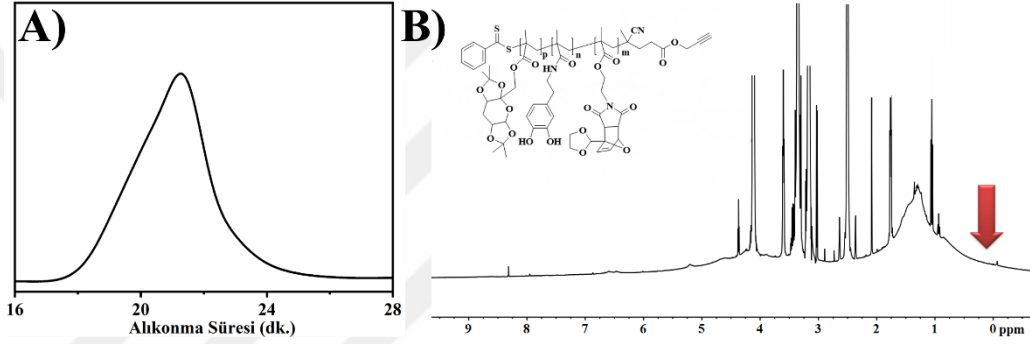
4.2.7 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA) Triblok kopolimerinin trimetilsillil grubu hidrolizi

P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA) triblok kopolimeri THF ile çözülerek, TBAF (0.025 mL, 1 M) çözeltisi varlığında, oda sıcaklığında reaksiyon gerçekleştirildi (Şekil 4.45).



Şekil 4.45 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA) triblok polimerinin TBAF hidroliz reaksiyonu.

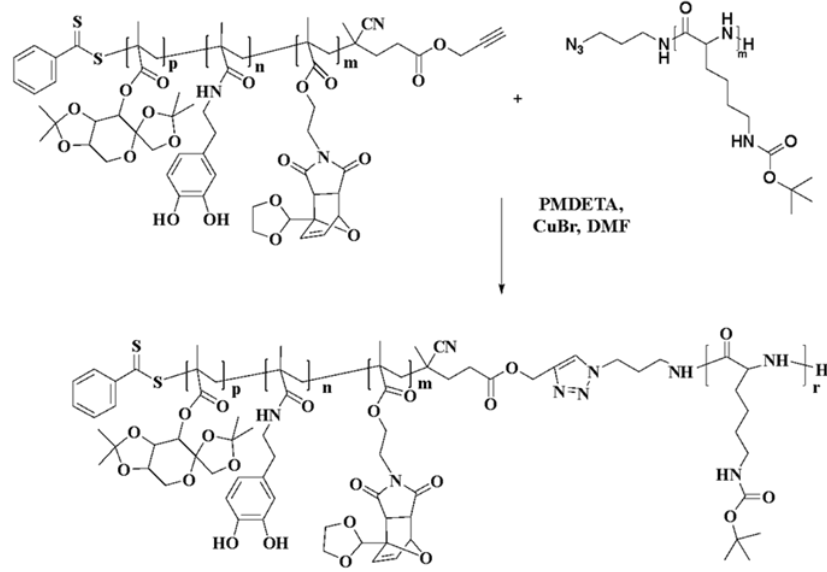
¹H-NMR analizine göre hidroliz reaksiyonu ile 0.19 ppm de çıkan trimetilsillil gruplarının kaybolduğu tespit edildi. TBAF hidroliz reaksiyonu etkinliği NMR'dan %100 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.46).



Şekil 4.46 : TBAF hidroliz sonrası P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA) triblok polimerinin A) THF-GPC ve B) ¹H-NMR analiz sonuçları.

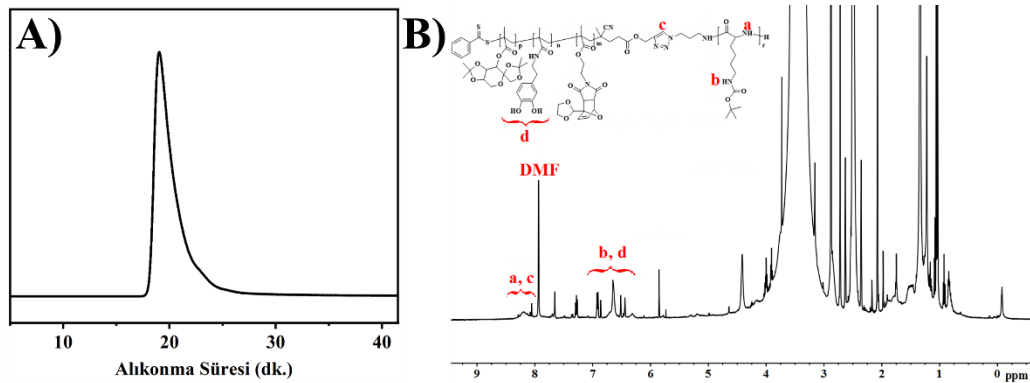
4.2.8 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin klik reaksiyonu ile sentezi

Hazırlanan triblok kopolimer (P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₁MA) ve polilizin homopolimeri (P(*t*Boc-Liz)-N₃) arasında bakır katalizli azid alkin halka katılma reaksiyonu yüksek verimle gerçekleştirildi (Şekil 4.47).



Şekil 4.47 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-iPrFr₁MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) tetrablok kopolimerinin klik reaksiyonu ile sentezi.

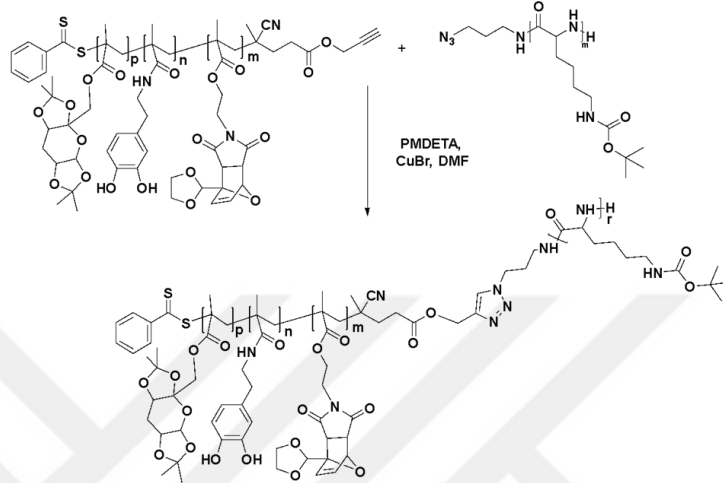
Click reaksiyonu sonrasında elde edilen tetrablok kopolimerlerin GPC ve NMR'dan belirlenen molekül ağırlıkları Tablo 4.6'da verilmektedir. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı DMF-GPC ve ¹H-NMR analizi ile aydınlatıldı (Şekil 4.48). NMR spektrumunda 8.03 ppm'de triazol grubuna ait protonun ve P(*t*Boc-Liz) polimerine ait protonlarının varlığı click reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. GPC kromatogramında monomodal gaussian pik ve dar molekül ağırlığı dağılımına sahip tetra blok kopolimerin elde edildiği açıkça görülmektedir.



Şekil 4.48 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-iPrFr₁MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹H-NMR analizi sonucu.

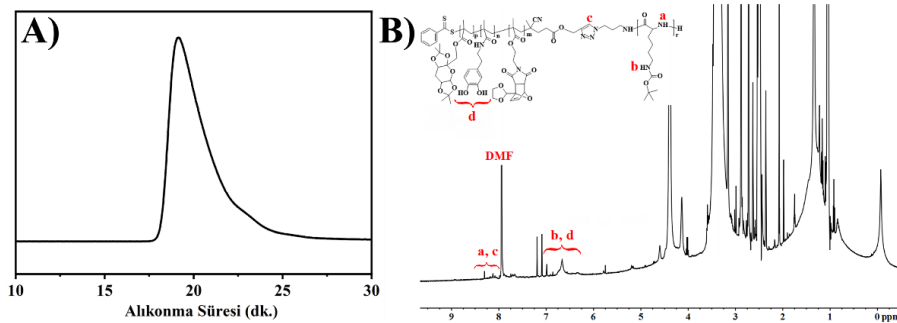
4.2.9 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin klik reaksiyonu ile sentezi

Hazırlanan triblok kopolimer (P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA) ve polilizin homopolimeri (P(*t*Boc-Liz)-N₃) arasında bakır katalizli azid alkin halka katılma reaksiyonu yüksek verimle gerçekleştirildi (Şekil 4.49).



Şekil 4.49 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) tetrablok kopolimerinin klik reaksiyonu ile sentezi.

Click reaksiyonu sonrasında elde edilen tetrablok kopolimerlerin DMF-GPC ve NMR'dan belirlenen molekül ağırlıkları Tablo 4.6'da verilmektedir. Elde edilen ürünün kimyasal yapısı DMF-GPC ve ¹H-NMR analizi ile aydınlatıldı (Şekil 4.50). NMR spektrumunda 8.03 ppm'de triazol grubuna ait protonun ve P(*t*Boc-Liz) polimerine ait protonlarının varlığı klik reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. GPC kromatogramında monomodal gaussian pik ve dar molekül ağırlığı dağılımına sahip tetra blok kopolimerin elde edildiği açıkça görülmektedir.



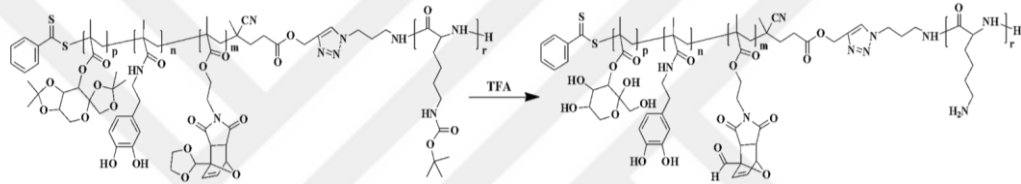
Şekil 4.50 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹H-NMR analizi sonucu.

Tablo 4.6 : Tetrablok kopolimerininin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	$M_{n,NMR}$	$M_{n,teo}$	$M_{n,GPC}$	\bar{D}
1	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>iprFr</i> ₁ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz)	43250	44000	48450	1.26
2	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> - <i>iprFr</i> ₂ MA)- <i>b</i> -P(<i>t</i> Boc-Liz)	38650	39400	42500	1.28

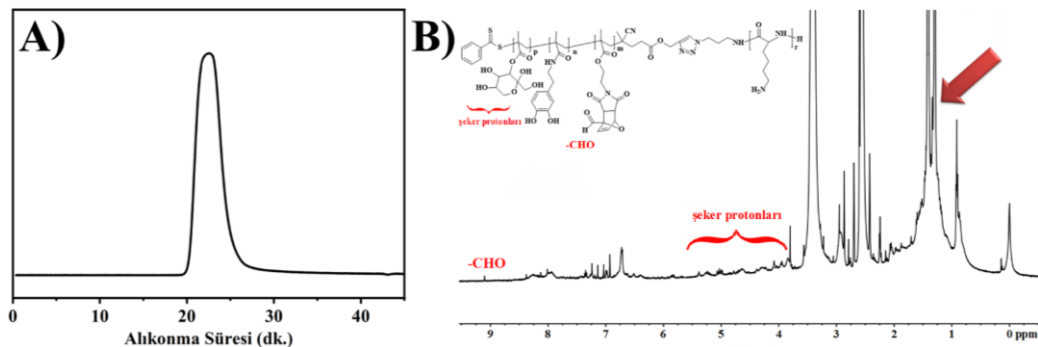
4.2.10 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₁MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin izopropiliden ve terbütüloksikarbonil grubu hidrolizi

Tetrablok kopolimerdeki şeker segmentinin taşıdığı izopropiliden, MiMA monomerinden gelen ketal ve lizin polimerinin taşıdığı *ter*-bütoksi grupları trifloroasetik asit (TFA) varlığında gerçekleştirilen asidik hidrolizle tek aşamada uzaklaştırıldı (Şekil 4.51).



Şekil 4.51 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*iprFr*₁MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) tetrablok kopolimerinin TFA hidrolizi.

Elde edilen P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*Fr*₁MA)-*b*-P(Liz) tetrablok kopolimerinin kimyasal yapısı DMF-GPC ve ¹H-NMR analizi ile aydınlatıldı (Şekil 4.52). ¹H-NMR analizi ile terbütüloksikarbonil -C=O(C(CH₃)₃) ve izopropiliden -C(CH₃)₂ grubuna ait protonların ~1-1.5 ppm aralığında kaybolması, lizin grubunun protonlarının 1.0-2.0 ppm arasında gözlenmiş olmasıyla hidrolizin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Hidroliz sonrası elde edilen tetrablok kopolimerin tayin edilen molekül ağırlıkları Tablo 4.7’de özetlenmektedir.



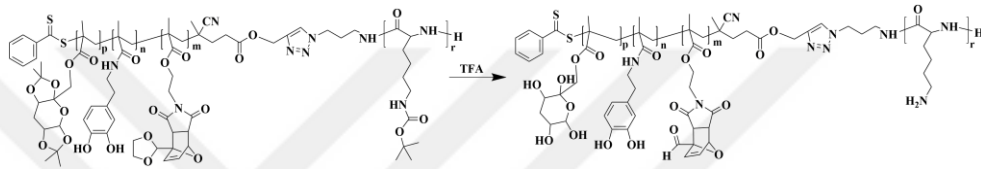
Şekil 4.3 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*Fr*₁MA)-*b*-P(Liz) polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹H-NMR analizi sonucu.

Tablo 4.7 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₁MA)-*b*-P(Liz) polimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	$M_{n,NMR}$	$M_{n,teo}$	$M_{n,GPC}$	\bar{D}
1	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz)	32650	33400	34350	1.38

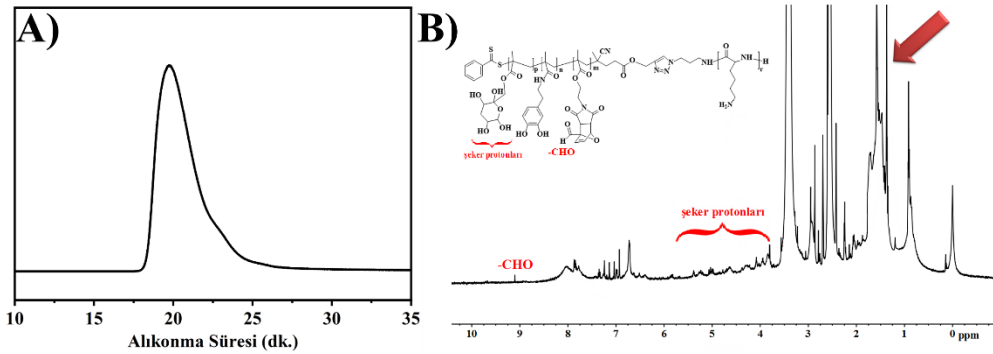
4.2.11 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) Tetrablok kopolimerinin izopropiliden ve terbütüloksikarbonil grubu hidrolizi

Tetrablok kopolimerdeki şeker segmentinin taşıdığı izopropiliden, MiMA monomerinden gelen ketal ve lizin polimerinin taşıdığı *ter*-bütoksi grupları trifloroasetik asit (TFA) varlığında gerçekleştirilen asidik hidrolizle tek aşamada uzaklaştırıldı (Şekil 4.53).



Şekil 4.53 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-*ipr*Fr₂MA)-*b*-P(*t*Boc-Liz) tetrablok kopolimerinin TFA hidrolizi.

Elde edilen P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz) tetrablok kopolimerinin kimyasal yapısı DMF-GPC ve ¹H-NMR analizi ile aydınlatıldı (Şekil 4.54). Hidroliz sonrası elde edilen tetrablok kopolimerin tayin edilen molekül ağırlıkları Tablo 4.8’de özetlenmektedir.



Şekil 4.54 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz) polimerine ait **A)** DMF-GPC ve **B)** ¹H-NMR analizi sonucu.

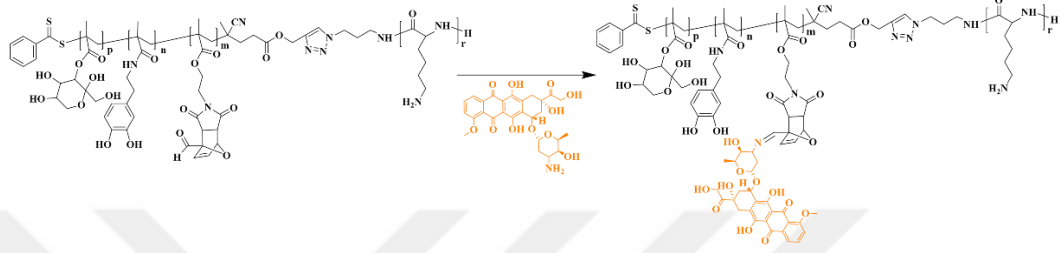
Tablo 4.8 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz) polimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	$M_{n,NMR}$	$M_{n,teo}$	$M_{n,GPC}$	\bar{D}
1	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz)	29200	29950	32100	1.36

4.3 Kemoterapötik İlaç (Doksorubisin, Dox) Taşıyan Tetrablok Kopolimerin Hazırlanması

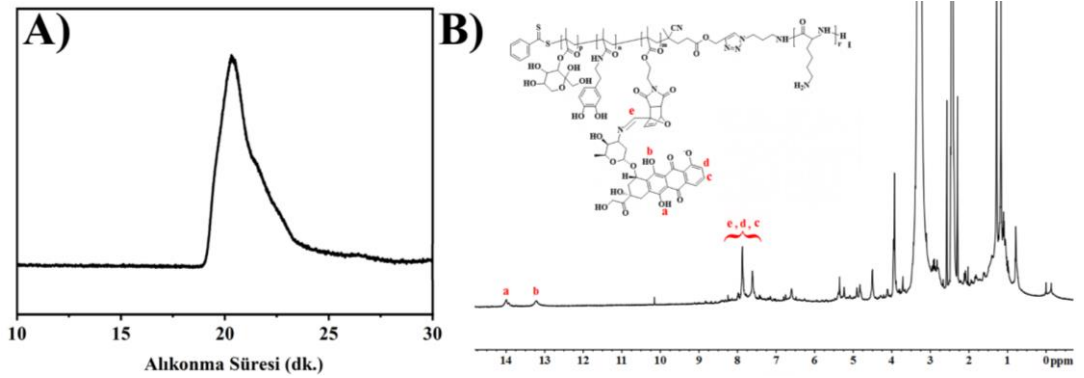
4.3.1 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₁MA)-*b*-P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi (P1-Dox)

Doksorubisin etken maddesi kimyasal olarak imin bağıyla tetrablok kopolimerine kazandırılmıştır (Şekil 4.55).



Şekil 4.55 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₁MA)-*b*-P(Liz) tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi.

Şekil 4.56B’de 9 ppm’de çıkan -CHO protonuna ait pikin kaybolması ve Dox’a ait piklerin çıkması bütün aldehit gruplarının Dox ile doyurulduğunu ispatlamaktadır. Ayrıca ilaç yüklü tetrablok kopolimerin tayin edilen molekül ağırlıkları Tablo 4.9’da özetlenmektedir.



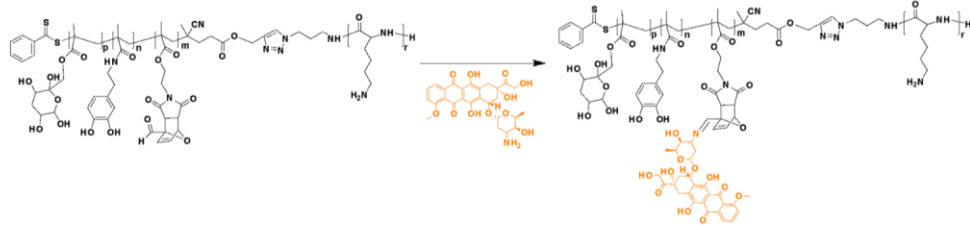
Şekil 4.56 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₁MA)-*b*-P(Liz)/Dox polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹H-NMR analizi sonucu.

Tablo 4.9 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₁MA)-*b*-P(Liz)/Dox polimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	$M_{n,NMR}$	$M_{n,teo}$	$M_{n,GPC}$	D
1	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₁ MA)- <i>b</i> -P(Liz)/Dox	40750	41500	43550	1.43

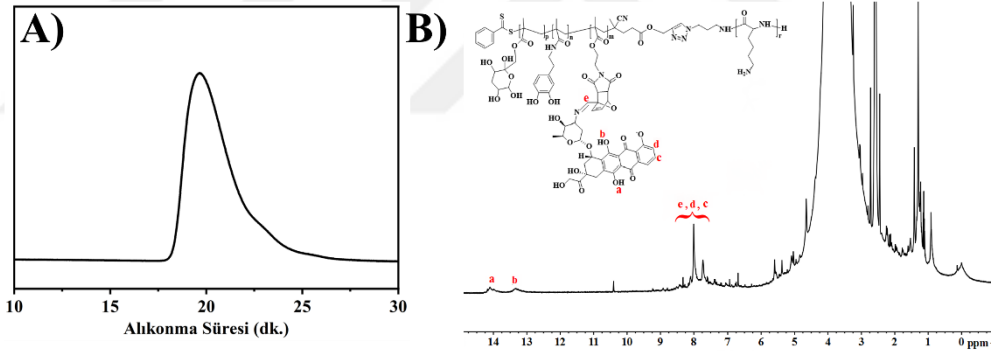
4.3.2 P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz) Tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi (P2-Dox)

Doksorubisin etken maddesi kimyasal olarak imin bağıyla tetrablok kopolimerine kazandırılmıştır (Şekil 4.57).



Şekil 4.57 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz) tetrablok kopolimerine doksorubisin yüklemesi.

Şekil 4.58B’de 9 ppm’de çıkan -CHO protonuna ait pikin tamamen kaybolması ve Dox’a ait piklerin çıkması bütün aldehit gruplarının Dox ile doyurulduğunu ispatlamaktadır. Ayrıca ilaç yüklü tetrablok kopolimerin tayin edilen molekül ağırlıkları Tablo 4.10’da özetlenmektedir.



Şekil 4.58 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz)/Dox polimerine ait A) DMF-GPC ve B) ¹H-NMR analizi sonucu.

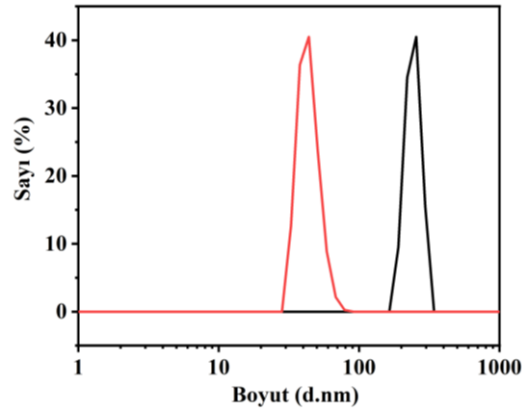
Tablo 4.10 : P(MiMA-*b*-DopMA-*b*-Fr₂MA)-*b*-P(Liz)/Dox polimerinin molekül ağırlığı karakterizasyonları.

No	Polimer Adı	$M_{n,NMR}$	$M_{n,teo}$	$M_{n,GPC}$	\bar{D}
1	P(MiMA- <i>b</i> -DopMA- <i>b</i> -Fr ₂ MA)- <i>b</i> -P(Liz)/Dox	37300	38050	39000	1.32

4.4 Manyetik Nanoparçacıkların (Fe₃O₄) Sentezi

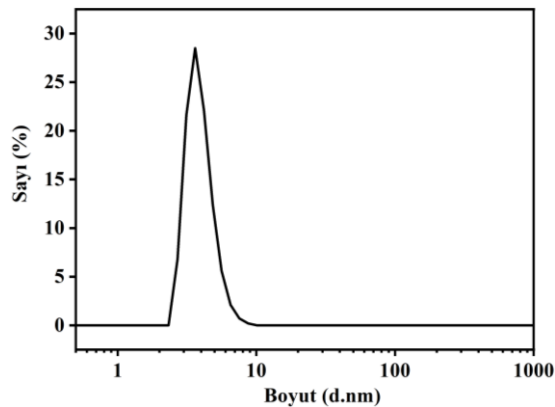
MRG’de kontrast artırıcı ve fototermal terapi ajanı olarak Fe₃O₄ nanoparçacığının sentezinde uygulanan ilk yöntemde alınan DLS ölçümleri sonucunda büyük

nanoparçacıkların (Şekil 4.59) elde edilmesi sebebiyle daha küçük nanoparçacıklar elde etmek için daha yüksek sıcaklıkta uygulanan farklı bir prosedür denendi.



Şekil 4.59 : Büyük boyutlu Fe₃O₄ nanopartiküllerin DLS analizi sonuçları.

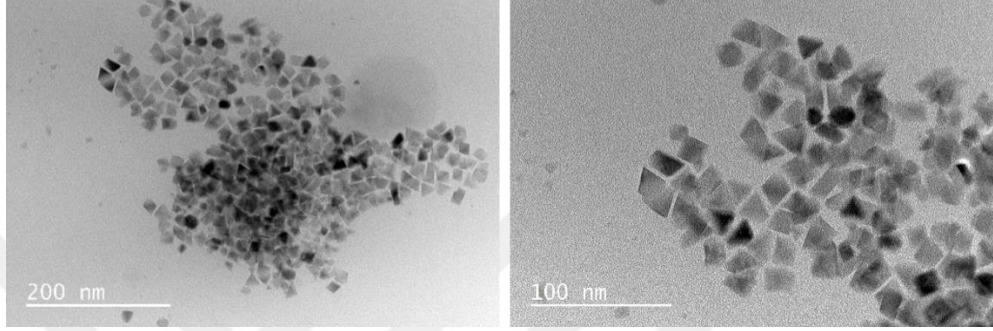
Prosedür şu şekilde gerçekleştirilmiştir; demir(III) klorür heksahidrat ve sodyum oleat etanol, deiyonize su, hekzan karışımında çözüldü. Karışım yarım saat azot altında, oda sıcaklığında karıştırılır ve ardından sıcaklık 70 °C'ye çıkarıldı. Reaksiyon 4 saat karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığına getirildi. Deiyonize su ile 3 kere ekstraksiyon yapıldı ve koyu kahverengi sıvı madde elde edildi. Ardından demir-oleat kompleksi, oleik asit ve 1-oktadeken oda sıcaklığında homojen çözelti haline gelene kadar karıştırıldı ve sıcaklık yavaşça 300 °C'ye çıkartılır. Bu sıcaklıkta bir saat karıştırıldıktan sonra reaksiyon oda sıcaklığına getirildi. Karışıma etanol eklenerek oluşan nanokristaller santrifüjle ayrıldı. Daha sonra kloroform ile dispers edilerek DLS ve HR-TEM ile yapıları aydınlatıldı. Sonuç olarak yaklaşık 4 nm büyüklüğünde nanokristaller elde edildiği saptandı (Şekil 4.60).



Şekil 4.60 : Küçük boyutlu Fe₃O₄ nanopartiküllerinin DLS analizi sonuçları.

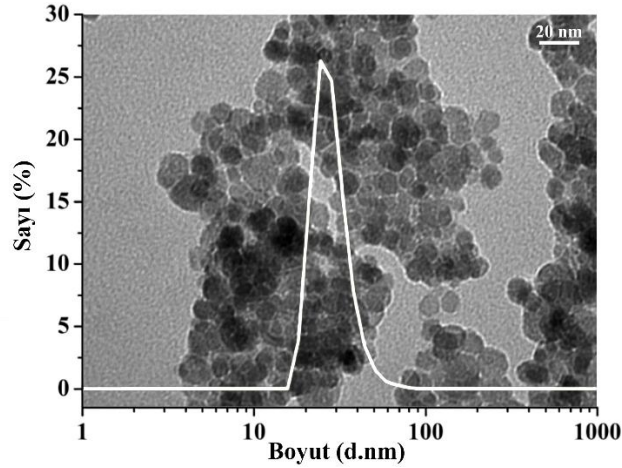
Üçüncü yöntem olarak denenen prosedürde, ikinci yöntemdeki ikinci basamak reaksiyonu tekrarlandı. Önceden sentezlenen demir-oleat kompleksi (10 mmol, 9 g)

100 mL'lik üç boyunlu balonda oleik asit (5 mmol, 1.425 g) ile birleştirildi. Ardından 1-oktadeken (50 g) eklenerek oda sıcaklığında homojen çözelti haline gelene kadar karıştırıldı. Reaksiyon sıcaklığı 270 °C'ye getirilerek 3 gün boyunca karıştırıldı. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra karışıma etanol (125 mL) eklenerek oluşan nanokristaller santrifüjle ayrıldı. Daha sonra kloroform ile dispers edildi ve DLS ölçümü yapıldı ve aynı parçacık büyüklüğünde elde edildiği görüldü. Hazırlanan nanoparçacıkların TEM ölçümleri alındı (Şekil 4.61).



Şekil 4.61 : Küçük boyutlu Fe₃O₄ nanopartiküllerinin TEM görüntüsü.

Son yöntemde, 1:2 mol oranında Fe⁺² ve Fe⁺³ iyonlarını içeren bir birlikte-çöktürme (ko-presipitasyon) yöntemi kullanılarak su içerisinde dispers olabilen manyetik nanoparçacık sentezlendi. Daha sonra su ile dispers edilerek DLS ve TEM analizleri yapıldı (Şekil 4.62).



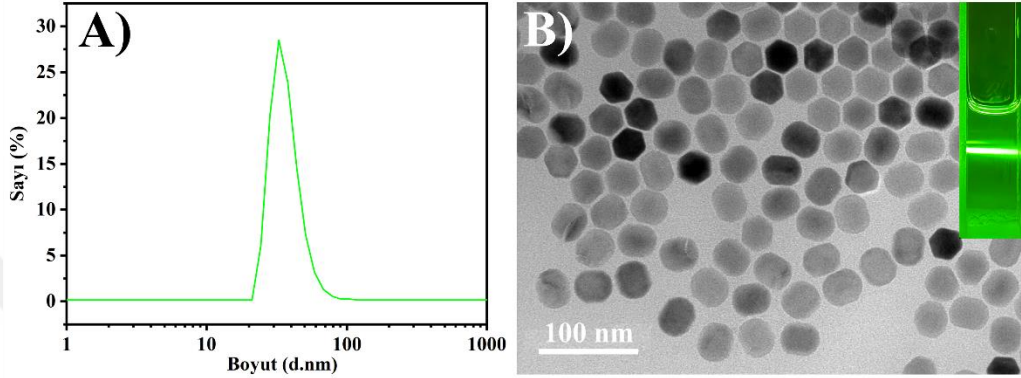
Şekil 4.62 : Suda dispers olan Fe₃O₄ nanopartiküllerinin DLS ve TEM analizleri.

4.5 Upconversion Nanopartiküllerin (UCNP) Hazırlanması

Nanoteranostik biyonanoprobun çekirdiğini oluşturan ve 980 nm NIR lazer ile uyarıldığında emisyon verecek uygun şekil ve boyuttaki UCNP sentezlendi.

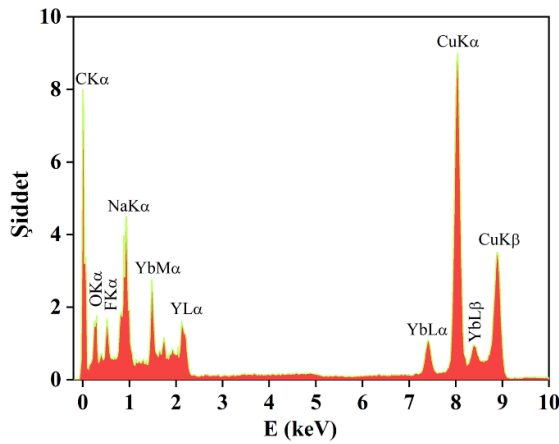
4.5.1 NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ UCNP' nin hazırlanması (UCNP)

%20 Yb³⁺ ve %2 Er³⁺ ile katkılanmış NaYF₄'ten oluşan NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ (UCNP) nanokristalleri Liu vd. [294] tarafından belirtilen prosedüre göre yüksek sıcaklıklarda solvotermal yöntemle gerçekleştirildi. TEM ve DLS sonuçları UCNP'lerin başarıyla sentezlendiğini doğruladı (Şekil 4.63). Bu sonuçlara göre, sentezlenen UCNP'lerin hekzan içerisinde ~35 nm boyutlu, düzgün bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.



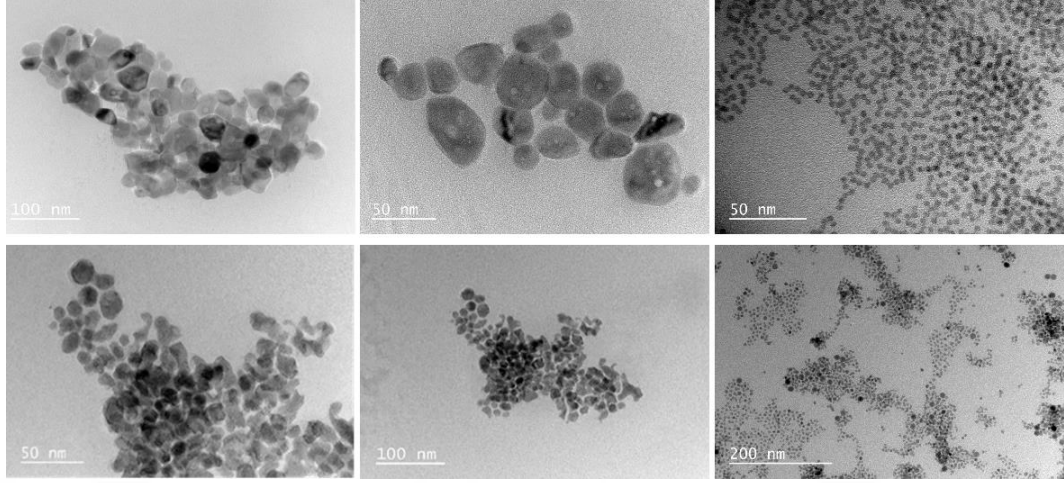
Şekil 4.63 : NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ (UCNP) nanokristallerinin A) DLS ve B) TEM analiz sonuçları.

Ayrıca 4.64'te, NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺'ün TEM/EDX spektrum analizini gösterilmektedir. Nanopartikül içindeki F, Na ve Y atomlarını gösteren belirgin pikler sırasıyla 0.62, 0.94 ve 2.05 keV'de gösterilmiştir. 0.22 ve 8.04 keV'de kaydedilen pikler, standart destekleyici TEM gridlerinde C ve Cu atomlarının varlığına karşılık gelir. 1.48, 7.40 ve 8.40 keV'de gözlemlenen daha zayıf pikler Yb atomlarına atfedilirken, Er atomlarından gelen sinyal (~6.9 keV) düşük konsantrasyonları nedeniyle tespit edilememiştir [306].



Şekil 4.64 : NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ (UCNP) nanokristallerinin TEM-EDX analiz sonuçları.

Diğer yöntemlerle sentezlenen UCNP nanokristallerinin TEM görüntüleri Şekil 4.65'te ve DLS boyutları Tablo 4.11'de gösterilmektedir.



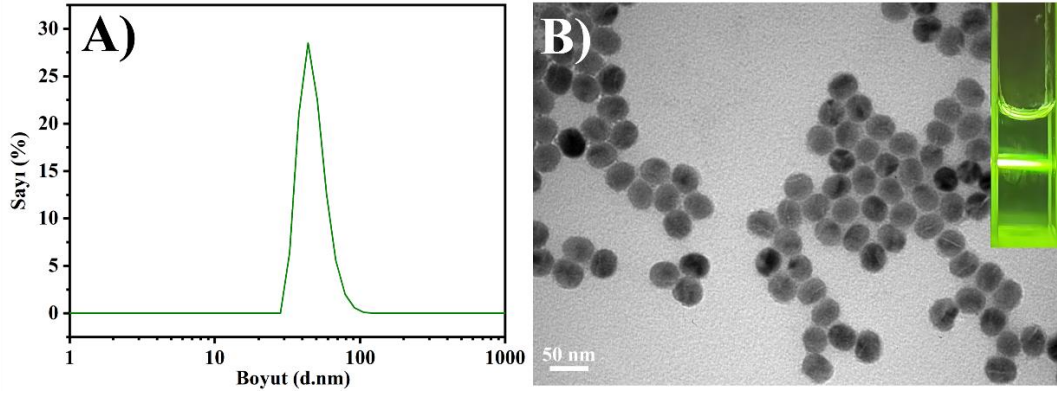
Şekil 4.65 : Başlangıçta yapılan UCNP sentez çalışmalarının TEM görüntüleri.

Tablo 4.11 : Hazırlanan UCNP nanoparçacıkların DLS ölçümleri.

No	Nanoparçacıklar	Boyut (nm)	PDI
1	NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺	122.2 ± 4.5	0.311
2	NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺	95.4 ± 3.7	0.316
3	NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺	43.2 ± 2.1	0.300
4	NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺	83.4 ± 2.6	0.256
5	NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺	144.3 ± 6.8	0.275
6	NaYF ₄ :Yb ³⁺ /Er ³⁺	47.6 ± 3.1	0.290

4.5.2 Sitrat kaplı UCNP sentezi (UCNP-C)

UCNP'nin hekzan'dan suya aktarılması için, 0.1 M trisodyum sitrat tampon çözeltisinde karıştırılarak ligand değişimi gerçekleştirildi ve sitrat kaplı UCNP'ler sentezlendi. Sitrat kaplı nanokristallerin partikül boyutu DLS ve TEM ile aydınlatıldı. Şekil 4.66'da gösterildiği gibi UCNP-C, ~40 nm boyutta, tekdüze dağılıma sahip bir şekilde sentezlendi.



Şekil 4.66 : Sitrata kaplı UCNP (UCNP-C) nanokristallerinin **A)** DLS ve **B)** TEM analiz sonuçları.

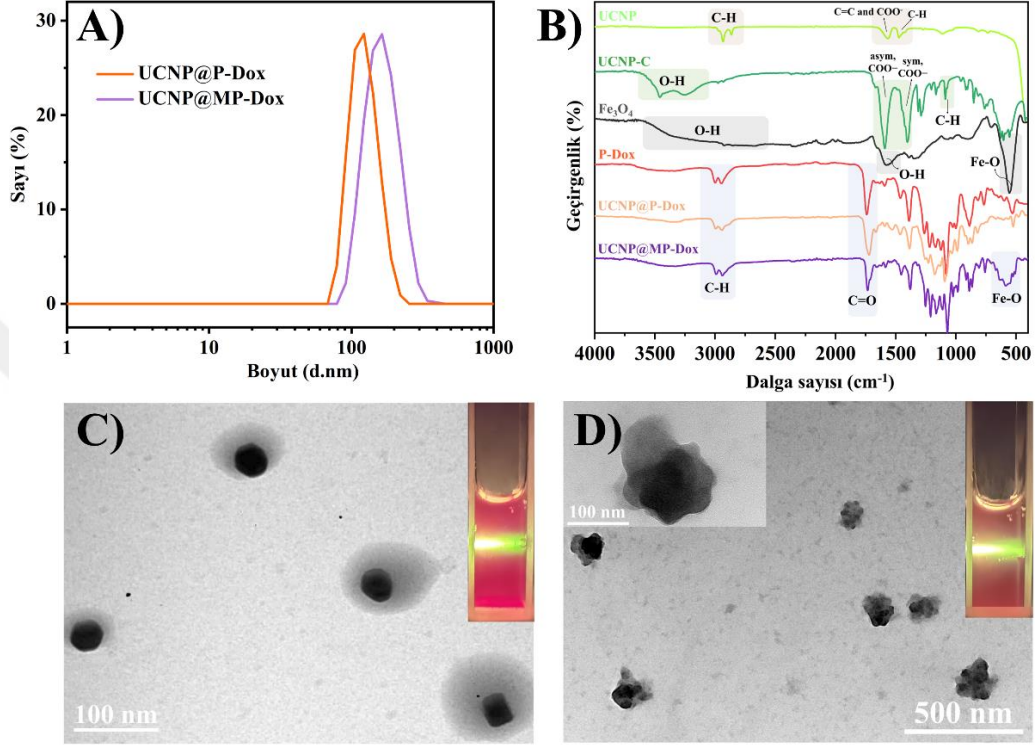
4.6 Tetrablok Polimer Kaplı UCNP Nanoprobalarının Hazırlanması (UCNP@P-Dox)

Biyoyumlu teranostik nanoplatform hazırlamak için UCNP nanopartikülü tetrablok polimer ile kaplandı. Bunun için $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ nanokristali ile $\text{P}(\text{MiMA}-b\text{-DopMA}-b\text{-Fr}_2\text{MA})-b\text{-P}(\text{Liz})/\text{Dox}$ (P2/Dox) polimeri oda sıcaklığında karıştırıldı. Elde edilen UCNP@P-Dox nanoprobunu DLS, FTIR ve TEM analizi ile aydınlatıldı (Şekil 6.67). TEM ve DLS sonuçlarına göre UCNP@P-Dox'un boyutu ~135 nm olarak belirlendi.

4.7 Manyetik Özellikli Glikopeptid Biyonanoprobalarının Hazırlanması (UCNP@MP-Dox)

Manyetik özellikli Fe_3O_4 nanopartikülleri, tetrablok kopolimerlerdeki katekol (DopMA'daki) gruplarına bağlanarak tetrablok kopolimere manyetik özellik kazandırıldı. Elde edilen UCNP@MP-Dox nanoprobunu DLS ve TEM analizi ile aydınlatıldı (Şekil 4.67). UCNP@P-Dox'un Fe_3O_4 nanopartikülü ile modifiye edilmesinden sonra boyutu ~190 nm olarak tespit edildi. Ayrıca, UCNP, UCNP-C, Fe_3O_4 , P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un FTIR spektrumlarının ayrıntılı analizi Şekil 4.67B'de gösterilmektedir. Sırasıyla $\sim 3550\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ ve $3000\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen karakteristik -OH ve C-H gerilme titreşimleri, nanopartiküllerin yüzeyinde polimerin varlığını doğrulamaktadır. UCNP-C'nin spektrumu, sitrik asidin C=O gerilme titreşimlerinden kaynaklı 1596 ve 1410 cm^{-1} 'de bir emilim bandı, Fe_3O_4 'ün spektrumu ise, -OH, C=O ve Fe-O gerilme titreşimlerine atfedilen 3433 ,

1620 ve 570 cm^{-1} 'de emilim bantları sergilemektedir. UCNP-C'nin P-Dox ile kaplanmasından sonra, P-Dox'un C=O gruplarının 1735 cm^{-1} 'deki gerilme titreşimleri spektrumda görülmektedir. UCNP@MP-Dox'un spektrumu 570 cm^{-1} 'de benzer bir pik görülmekte olup; bu durum, UCNP@P-Dox'un manyetik nanopartiküllerle kaplandığını kanıtlamaktadır.



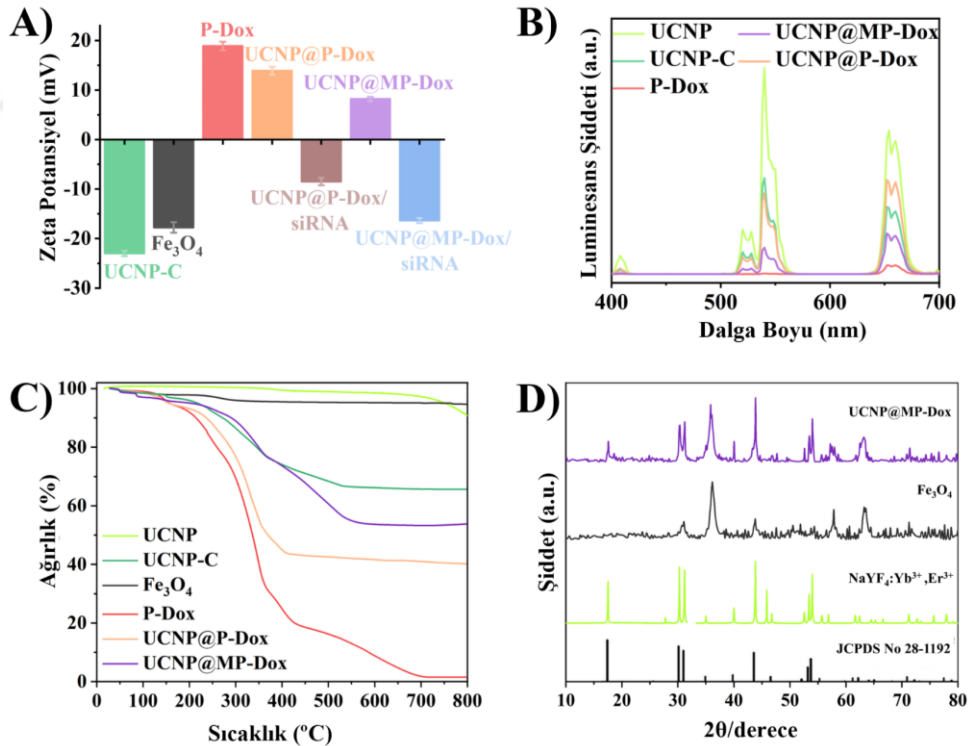
Şekil 4.67 : A) UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox nanopartiküllerinin DLS analizi. B) UCNP, UCNP-C, Fe_3O_4 , P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un karşılaştırmalı FTIR analizi. C) UCNP@P-Dox ve D) UCNP@MP-Dox nanopartiküllerinin TEM görüntüsü.

UCNP-C, Fe_3O_4 , P-Dox, UCNP@P-Dox, UCNP@P-Dox/siRNA, UCNP@MP-Dox ve UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobalarının ξ -potansiyel değerleri Şekil 4.68A'da gösterilmektedir. P-Dox ile kaplanmadan önce, UCNP-C'nin ξ -potansiyeli, UCNP yüzeyinin sitrat ile kaplanması nedeniyle yaklaşık olarak -23.00 ± 0.54 mV idi. Fe_3O_4 ve P-Dox'un ξ -potansiyeli sırasıyla -17.75 ± 1.06 mV, $+18.95 \pm 0.86$ mV olarak belirlendi. UCNP-C'nin katyonik glikopeptit polimer ile kaplanmasından sonra, ξ -potansiyeli $+13.90 \pm 0.80$ mV olarak ölçülmüştür. Daha sonra, Fe_3O_4 nanopartikülleri UCNP@P-Dox yüzeyine dahil edildiğinde, zeta potansiyel değeri $+8.20 \pm 0.44$ mV'a düştüğü gösterilmektedir.

UCNP, UCNP-C, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox (1 mg/mL) yüklü manyetik nanopartiküllerin upconversion fotoluminesans (UCL) özellikleri, 980 nm dalga

boyunda NIR uyarımı altında belirlendi (Şekil 4.68B). Er^{3+} 'ün tipik upconversion emisyonununun 410 nm'deki (${}^2H_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$), 525 nm'deki (${}^2H_{11/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$), 542 nm'deki (${}^4S_{3/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$) ve 656 nm'deki (${}^4F_{9/2} \rightarrow {}^4I_{15/2}$) geçişlerden kaynaklandığı bulundu [307]. UCNP'yi heksandan suya aktarmak için gerçekleştirilen sitrat kaplama sonucunda emisyon yoğunluğunun hafifçe azaldığı görülmektedir.

Yapılan bir diğer analiz olan termogravimetrik analiz (TGA) sonucunda, UCNP'nin P-Dox ve Fe_3O_4 ile etkili bir şekilde yüzey modifikasyonunun gerçekleştiğinin kanıtını sunmaktadır (Şekil 4.68C). Tüm sıcaklık aralığı boyunca, UCNP'ler için gözlenen ağırlık kaybı, OA kaplamasından dolayı yaklaşık %9.4'tür. UCNP-C yaklaşık 200 °C'de bozulmaya başlamış olup, 200-400 °C arasında %25'lik önemli bir kütle kaybı gözlenmektedir. Fe_3O_4 nanoparçacıklarının ağırlık kaybı sadece %5.3 iken, P-Dox'un ağırlık kaybının aynı sıcaklık aralığında %99.2 olduğu bulundu. Ek olarak, P-Dox ile kaplanmış UCNP'nin ağırlık kaybı yaklaşık %54.1 iken, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının yapıya eklenmesiyle bu kayıp %30.1'e düşmektedir. TGA verilerine göre, UCNP yüzeyindeki P-Dox ve Fe_3O_4 kaplama miktarı sırasıyla yaklaşık %27.3 ve %24'tür.



Şekil 4.68 : A) UCNP-C, Fe_3O_4 , P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un zeta potansiyel analizi. B) UCNP, UCNP-C, P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un UCL analizi. C) UCNP, UCNP-C, Fe_3O_4 , P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un TGA analizi. D) UCNP, Fe_3O_4 ve UCNP@MP-Dox nanopartiküllerinin XRD analizi.

Ayrıca, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$, Fe_3O_4 ve UCNP@MP-Dox için X-ışını kırınımı (XRD) analizi Şekil 4.68D’de ayrı ayrı sunulmaktadır. Altıgen faz $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ ’ün XRD sonuçlarında gözlenen tepe noktalarının standart X-ışını kırınımı JCPDS 28-1192’nin tepe noktalarıyla eşleştiği ortaya konulmuştur. XRD spektrumundaki keskin tepe noktaları, sentezlenen UCNP’nin kristal yapısından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin XRD sonucu da daha önce bildirilenlerle uyumaktadır [308]. UCNP yüzeyindeki glikopolimer ve Fe_3O_4 kaplaması, UCNP@MP-Dox piklerinde gözlenen tepe noktalarının keskinliğinin azalmasına sebep olmuştur.

4.8 UCNP@MP-Dox Nanoprobunun Manyetik Özelliklerinin ve Fototermal Terapi Etkinliğinin İncelenmesi

Fe_3O_4 nanoparçacıkları, üstün biyouyumlulukları, düşük toksisiteleri, süperparamanyetizmaları, kimyasal inertlikleri ve fizyolojik ortamda gösterdikleri mükemmel stabilite nedeniyle fototermal tedavi (PTT) ajanları olarak yaygın bir şekilde araştırılmaktadır [309]. UV-vis spektrofotometri kullanılarak, UCNP@MP-Dox’un (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 980 nm’de belirgin bir absorpsiyon gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.69E). Bu absorpsiyon, NIR (yakın kızılötesi) kaynaklı fototermal etkinin önemli bir göstergesidir ve minimum lazer yoğunluğunda (980 nm) hafif sıcaklık artışıyla (41.8 °C - 45 °C) fototermal tedavi yoluyla kanser hücrelerini etkili bir şekilde yok etmesi beklenmektedir [310,311]. Amerikan Ulusal Standartlar Enstitüsü’nün lazerlerin güvenli kullanımı için belirlediği standartlara göre, 980 nm lazer için maksimum izin verilen maruziyet (MPE) değeri 0.72 W/cm^2 ’dir [312].

UCNP@MP-Dox nanoprobalarının fototermal özelliklerini değerlendirmek amacıyla, farklı güç seviyelerinde (0.50, 0.60, 0.72, 0.85 ve 1.00 W/cm^2) 980 nm lazerle 720 saniye boyunca ışınlama yapıldı. Çözeltideki sıcaklık değişimi IR termal kamera ile izlendi. Sonuçlar, nanoparçacık konsantrasyonu ve lazer yoğunluğu arttıkça sıcaklık artışının da arttığını göstermektedir. UCNP@MP-Dox çözeltisinin (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) başlangıç sıcaklığına kıyasla 720 saniyelik lazer ışınlaması sonrasında, 0.50 W/cm^2 ile 17.7 °C, 1.00 W/cm^2 ile ise 31.6 °C’lik bir sıcaklık artışı gözlenmektedir (Şekil 4.69A). Beklendiği üzere, sıcaklık artışı, ışınlama süresi ve lazer gücü yoğunluğu ile doğru orantılı olarak artmıştır. Lazer gücü 0.85, 0.72 ve 0.60 W/cm^2 olarak değiştirildiğinde ise sıcaklık artışları sırasıyla 27.80, 25.05 ve 20.75 °C olarak kaydedildi. 980 nm’de

0.72 W/cm² güçle yapılan ışınlamada, çözelti konsantrasyonlarının azalmasıyla sıcaklık artışının azaldığı belirlendi. Verilere göre, 400, 200, 100, 75, 50 ve 25 µg/mL konsantrasyonlarındaki sıcaklık artışları sırasıyla 28, 25.05, 22.20, 19.60, 18.50 ve 15.20 °C olarak ölçüldü (Şekil 4.69B). UCNP@MP-Dox'un 980 nm dalga boyunda ve 0.72 W/cm² lazer yoğunluğunda ışınlandığında, tümör hücrelerini etkili bir şekilde yok etmek için yeterli sıcaklık artışı sağladığı ve böylece uygun bir fototermal tedavi ajanı olduğu gösterilmektedir.

Ayrıca, UCNP@MP-Dox'un fototermal dönüşüm verimliliği, bileşenleri (UCNP-C, Fe₃O₄ ve P-Dox) ile deiyonize su kontrol grubuna karşı kıyaslanarak değerlendirildi (Şekil 4.69C). Aynı koşullar altında suyun sıcaklığında yalnızca 4.8 °C'lik hafif bir artış görülürken, UCNP@MP-Dox'ta bu artış 25 °C olarak kaydedilmiştir.

Fototermal dönüşüm verimliliği (η), fototermal tedavinin etkinliğini gösteren önemli bir parametredir. Bu amaçla, UCNP@MP-Dox'un fototermal dönüşüm verimliliği, daha önce rapor edilen bir yöntemle hesaplandı [313]. UCNP@MP-Dox nanopartiküllerinin fototermal dönüşüm verimliliği (η), aşağıdaki denklemler kullanılarak belirlendi.

$$(1) \quad \eta = \frac{hS(T_{Max} - T_{Surr}) - Q_{Dis}}{I(1 - 10^{-A_{980}})}$$

Denklem 1'deki hS değeri denklem 4 ve Şekil 4.69D aracılığıyla elde edilmektedir. Burada h ısı transfer katsayısını, S ise kabın yüzey alanını temsil eder. hS değerini hesaplamak için Şekil 4.69D içerisindeki doğal soğuma grafiğinden elde edilen veriler baz alınarak, θ değeri denklem 2'den hesaplandı ve $\ln(\theta)$ ile t arasındaki negatif eğim doğrusu çizildi (Şekil 4.69D). Isı transferinin zaman sabiti (τ_s) 279 s olarak hesaplandı. Ayrıca C_D (4.2 J/°C) ısı kapasitesini, m_D (0.3 g) ise denklem 4'teki suyun kütlesini temsil etmektedir. Dolayısıyla bu denkleme göre hS değeri 4.5 mW/°C'dir.

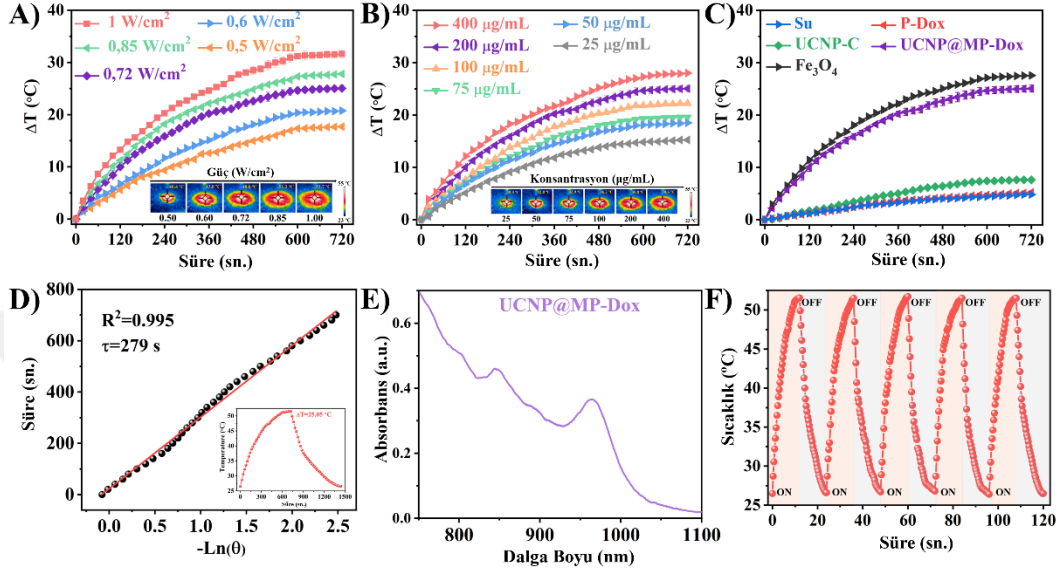
$$(2) \quad \theta = \frac{T - T_{Surr}}{T_{Max} - T_{Surr}}$$

$$(3) \quad t = -\tau_s \ln(\theta)$$

$$(4) \quad hS = \frac{m_D C_D}{\tau_s}$$

UCNP@MP-Dox çözeltisi 51.6 °C'lik maksimum sabit sıcaklığa (T_{Max}) ulaşırken, ortam sıcaklığı (T_{Surr}) 26.5 °C'de kaldı. Bu nedenle, UCNP@MP-Dox çözeltisindeki

sıcaklık farkı ($T_{Max}-T_{Surr}$) 25.1 °C'dir. Lazer gücü (I) 0.72 W'tır ve UCNP@MP-Dox'un 980 nm'deki (A_{980}) emilimi 0.38'dir (Şekil 4.69E). Q_{Dis} , çözücü ve kap tarafından ışığın emilimi nedeniyle açığa çıkan ısıyı temsil eder. Bu hesaplamalardan, UCNP@MP-Dox nanopartikülü 980 nm lazerle uyarıldığında fototermal dönüşüm verimliliği (η) %27 olarak bulundu.



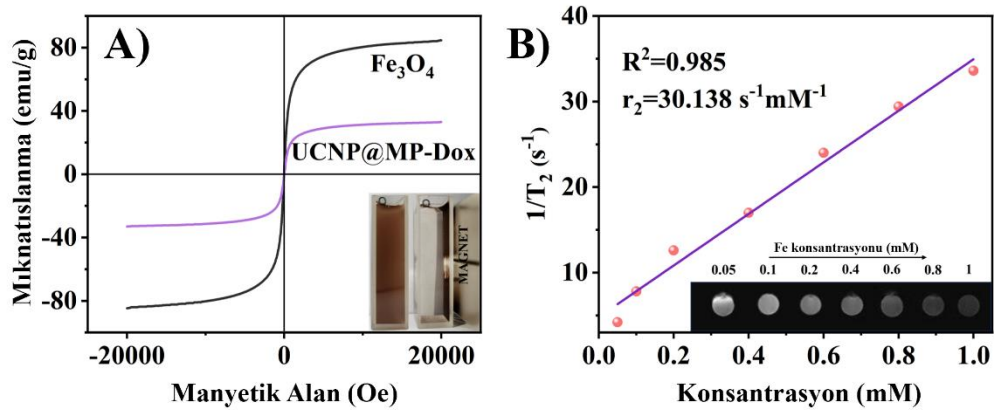
Şekil 4.69 : **A)** Farklı lazer yoğunluklarında ve **B)** farklı konsantrasyonlarda UCNP@MP-Dox çözeltisinin fototermal verimliliği. **C)** Lazer ışınması altında UCNP-C, Fe₃O₄, P-Dox, UCNP@MP-Dox ve suyun fototermal verimliliği. **D)** Soğuma periyodundan elde edilen, θ 'nın negatif doğal logaritması ile zaman (t) arasındaki doğrusal korelasyon. **E)** UCNP@MP-Dox'un UV-Vis-NIR spektrumu. **F)** Tekrarlanan lazer ışınımının beş döngüsü boyunca UCNP@MP-Dox'un fototermal kararlılık testi.

Şekil 4.69F'de UCNP@MP-Dox nanoprobalarının (200 µg/mL) fototermal performansının, 0.72 W/cm² güç yoğunluğunda 12 dakikalık ışınlama (lazer açık) ve ardından 12 dakikalık soğutma (lazer kapalı) döngüsünden oluşan beş tekrar sonrası değişmediği gösterilmektedir. Bu durum, UCNP@MP-Dox nanoprobalarının olağanüstü fototermal stabilitesini kanıtlamaktadır.

Hazırlanan UCNP@MP-Dox ve Fe₃O₄ nanoparçacıklarının manyetik özellikleri, titreşimli numune manyetometresi (VSM) kullanılarak oda sıcaklığında yapılan ölçümlerle incelendi. Doygun manyetizasyon (M_s) değerleri Fe₃O₄ nanoparçacıkları için 84.65 emu.g⁻¹, UCNP@MP-Dox nanoprobaları için ise 33.00 emu.g⁻¹ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.70A). UCNP@MP-Dox'un M_s değerindeki bu belirgin azalma, Fe₃O₄'ün çevresini saran manyetik olmayan polimer kabuğa bağlanabilir. Bununla

birlikte, UCNP@MP-Dox'un sulu bir çözeltiden harici bir manyetik alan kullanılarak hızlı ve kolay bir şekilde ayrılabilirdiği görülmektedir.

Ayrıca, Şekil 4.70B'de görüldüğü üzere, UCNP@MP-Dox'un yedi farklı seyreltilmesiyle T₂-ağırlıklı MR görüntüleme gerçekleştirildi ve Fe konsantrasyonunun artmasıyla sinyalde kademeli bir azalma gözlenmektedir (3T, TR = 3000 ms, TE = 60 ms). Bu grafiğin eğiminden elde edilen gevşeme katsayısı (r₂ değeri) 30.138 s⁻¹mM⁻¹ olarak hesaplandı (Şekil 4.70B). Sonuç olarak, UCNP@MP-Dox, T₂-ağırlıklı görüntülemeye dikkat çekici bir kontrast üretmekte ve bu özelliği sayesinde tedaviye rehberlik edebilecek yüksek bir MRI ajanı potansiyeli sunmaktadır.

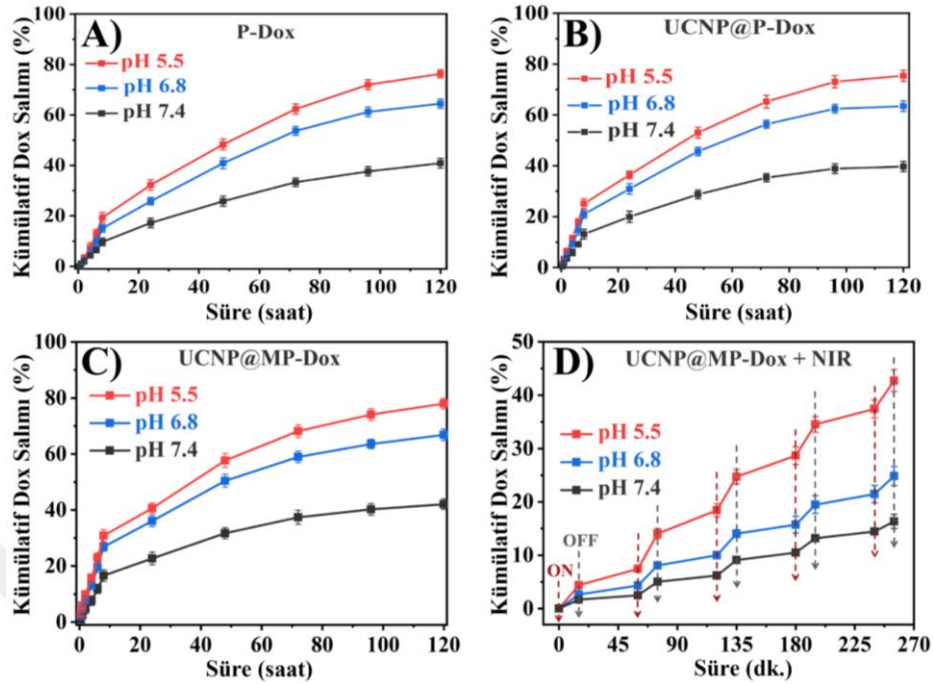


Şekil 4.70 : A) Fe₃O₄, UCNP@MP-Dox'un histerezis döngüsü ve UCNP@MP-Dox nanoprobalarının sulu dispersiyonunun manyetik ayrımını gösteren ek bir fotoğraf. B) Çeşitli demir konsantrasyonlarında UCNP@MP-Dox'un 1/T₂ değerlerinin grafiği (UCNP@MP-Dox'un T₂ ağırlıklı MRI görüntüleri eklendi).

4.9 Hazırlanan Nanoprobaların Dox Salım Deneyi

Asidik ortamda parçalanabilen, ancak normal fizyolojik koşullarda stabil olan imin bağı, glikopeptid polimeri ile Dox arasında bağlayıcı olarak kullanıldı ve bu sayede pH'ya duyarlı Dox salımı sağlandı. P-Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@MP-Dox'un ilaç salım profilleri, farklı pH ortamlarında (pH 5.5, 6.8 ve 7.4) 37 °C'de bir UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak incelenmiştir. Bu pH değerleri, tümör mikroçevresinin asidik ortamını ve sağlıklı dokuların nötr pH'sını yansıtmaktadır. P-Dox (Şekil 4.71A), UCNP@P-Dox (Şekil 4.71B) ve UCNP@MP-Dox (Şekil 4.71C) nanoprobalarının ilaç salım profilleri benzer özellikler sergilemektedir. UCNP@MP-Dox'tan Dox salımı, 96 saat sonunda pH 7.4'te %39.5, pH 5.5'te ise %74 olarak ölçüldü. Beklendiği gibi, pH'ya duyarlı salım profili, asidik ortamda imin bağının parçalanması sonucu Dox'un hızla serbest bırakıldığını göstermektedir. Bu sonuçlar, UCNP@P-Dox ve

UCNP@MP-Dox'un tümör mikroçevresinde, sağlıklı dokulara kıyasla daha fazla Dox salımı gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.



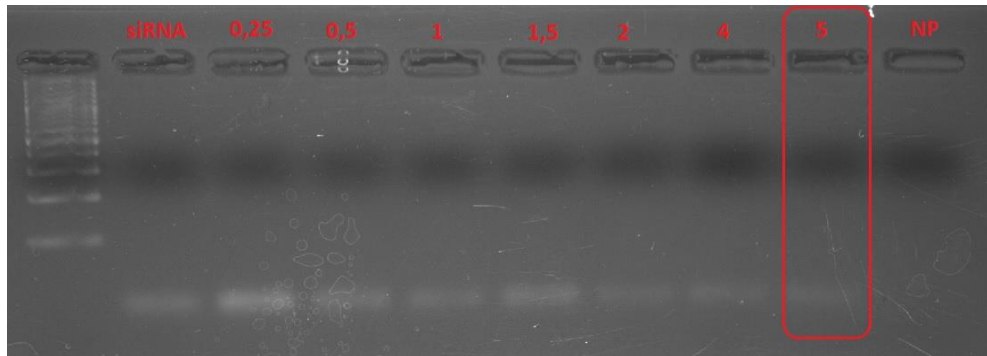
Şekil 4.71 : A) P-Dox, B) UCNP@P-Dox ve C) UCNP@MP-Dox'un farklı pH tampon çözeltilerinde (pH 5.5, 6.8 ve 7.4), UV-Vis spektrofotometresi ile ölçülen Dox salım profili. D) UCNP@MP-Dox'un lazer ışınması altında Dox salım profili.

Şekil 4.71D'de gösterildiği gibi, Dox salım profili, farklı pH ortamlarında lazer ışınması altında belirli zaman aralıklarında 488 nm'deki artan absorbansın analizi ile incelendi. Dox salımı, 15 dakikalık lazer ışını uygulaması sırasında keskin bir artış gösterirken, ışın uygulanmadığında bu salım azalmaktadır. Sonuç olarak, pH 5.5'te lazer ışını altında 4 saat sonunda Dox salımı %37.5'e ulaşmış, lazer ışını uygulanmadığında ise bu oran %15.5 olarak belirlendi (Şekil 4.71D). Benzer şekilde, lazer ışını altında pH 6.8 ve pH 7.4'te 4 saat sonunda Dox salımı sırasıyla %21.5 ve %14.5 iken, ışın uygulanmadığında bu değerler sırasıyla %13 ve %7.5 olarak ölçülmektedir. İmin bağının parçalanmasının, artan $[H^+]$ konsantrasyonu ve sıcaklıktan önemli ölçüde etkilendiği belirtilmelidir. Daha yüksek pH ve sıcaklıkta, imin bağının parçalanması artmakta ve bu da iyileştirilmiş ilaç salımına yol açmaktadır. Bu sonuçlar, NIR ışığı ile indüklenen hiperterminin UCNP@MP-Dox'tan Dox salımını artırdığını göstermektedir.

4.10 siRNA Taşıyan Biyonanoprobaların Hazırlanması ve Salım Profillerinin İncelenmesi (UCNP@P-Dox/siRNA)

siRNA yüklemek için Bcl-2 siRNA'nın ultra saf suda (nuclease free distilled water) stok çözeltisi oluşturuldu [20nM]. siRNA ve nanopartikül etkileşiminin saptanması için siRNA'nın negatif, polimerle kaplanmış biyonanoprobaların pozitif yükünden yararlanılarak oluşturulan kompleksler 7 farklı NP/siRNA (0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 5) oranında hazırlandı. Bcl-2 siRNA ile kompleks oluşumu agaroz jel yürütme yöntemi kullanılarak incelendi. Bu deneyde, kompleksleşmemiş Bcl-2 siRNA bantlarının konumunun izlenmesi EtBr tarafından boyanarak güçlü floresans özelliğinden yararlanılarak gösterildi. Düşük sıcaklık erimeli %2.5 agaroz jel, 1X TAE (Tris-Acetate-EDTA) ile hazırlandı. 6X DNA yükleme tamponu ile kuyu başına 2 µL final hacimde örnek yüklendi. 0.1 mg/mL EtBr içeren 1X TAE ile 100V'da 45 dakika yürütüldü ve Biorad Chemi Doc imaging sistemi ile jelin görüntüsü alındı. siRNA taşıyan UCNP@P-Dox'ların hazırlanması ve agaroz jel elektroforezinde bağlanma oranlarının değerlendirildiği sonuçlar Şekil 4.72'de verilmektedir. Serbest siRNA miktarının gözlenmediği NP/siRNA oranı 5 olan değer seçilerek deneylere devam edildi.

Hazırlanan UCNP@P-Dox ve siRNA yüklü nanopartiküllerin boyutları, yükleri, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyelleri DLS ile ölçüldü ve bazı sonuçlar Tablo 4.12'de özetlenmektedir. Beklendiği gibi, UCNP@P-Dox'un ξ -potansiyel değeri anti-Bcl-2 siRNA ile yüklendikten sonra önemli ölçüde değişmiştir. Bu durum, siRNA'nın UCNP@P-Dox'a etkili bir şekilde yüklendiğini doğrulamaktadır.

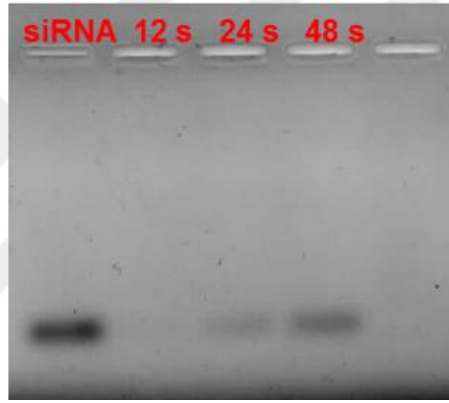


Şekil 4.72 : UCNP@P-Dox'un siRNA taşıma kapasitesi, tüm oranlar UCNP@P-Dox/siRNA oranını ifade edecek şekilde belirtilmektedir.

Tablo 4.12 : Belirli azot/ fosfor (N/P) oranlarındaki biyonanoprobaların boyut ve zeta potansiyel değerleri.

No	UCNP@MP-Dox	siRNA	N/P	Boyut (nm)	PDI	ζ (mV)
1	-	1	-	658	0.45	-16.71
2	0.25	1	0.25	686	0.73	-6.57
3	0.5	1	0.5	640	0.94	-4.72
4	5	1	5	83	0.52	-0.12
5	1	-	1	102	0.24	2.69

siRNA'nın salım çalışmaları, 37 °C'de çalkalamalı orbital karıştırıcıda gerçekleştirildi. Hazırlanan siRNA yüklü nanopartikül çözeltisinden bir miktar alınarak yarı geçirgen diyaliz membranına alındı (MWCO 100 kDa, 2 mL) ve uçları standart klipslerle kapatıldı. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerdeki siRNA'nın yapısal bütünlüğü jel elektroforez yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.73).



Şekil 4.73 : UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunun salım ölçümü.

4.11 Hazırlanan Teranostik Biyonanoprobaların *In Vitro* Çalışmalarla Test Edilmesi

In vitro çalışmalar MCF-7 (östrojene duyarlı) ve 3T3/NIH (ATCC® CRL-1658) hücre hatlarında gerçekleştirildi. Bu kapsamda sitotoksosite çalışmaları, hücre içi alım çalışmaları ve apoptoz çalışmaları yapıldı.

4.11.1 Sitotoksosite çalışmaları

Sitotoksosite çalışmaları için hücreler planlandığı gibi ekilerek 24 saat süre ile test edildi. İlgili gruplar için tamamlanan sitotoksosite aşamaları her deney için üçlü olarak çalışıldı ve iki ayrı bağımsız deney olarak tekrar edildi. Elde edilen absorbans verilerinin varyans hesaplamaları denklem 5'teki hesaplama ile tamamlandı. İki bağımsız deneyden elde edilen IC₅₀ değerleri ise denklem 6'daki hesaplama modeli

kullanılarak değerlendirildi [314] ve iki bağımsız deneyden elde edilen IC₅₀ değerinin ortalaması alınarak Tablo 4.13'te iki hücre tipi için özetlendi. Sitotoksitelerine bağlı hücre canlılık değişimi ise MCF7 ve 3T3 hücreleri için sırasıyla Şekil 4.74'te sunulmaktadır.

$$5 \quad v = \frac{1}{n-1} \left(\sum_{i=1}^{numGroups} n_i (m_i - m)^2 + \sum_{i=1}^{numGroups} (n_i - 1) v_i \right)$$

$$6 \quad Y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}} \right)^{\text{Hill coefficient}}}$$

Hücre canlılıkları açısından değerlendirildiğinde UCNP ve P'nin (polimer) her iki hücre tipi içinde IC₅₀ ve canlılık yüzleri açısından düşük toksisite gösterdiği gözlenmektedir (minimum IC₅₀ 164.08 µg/mL- maksimum IC₅₀ 23.605 µg/mL). Her hücre tipi için, kendi IC₅₀ değerleri ve canlılık yüzdeleri açısından; P-Dox ve UCNP@P-Dox gruplarının ise Dox içermesine rağmen, sitotoksik etkileri Dox'a bakıldığında daha düşük seyretmektedir (Tablo 4.13).

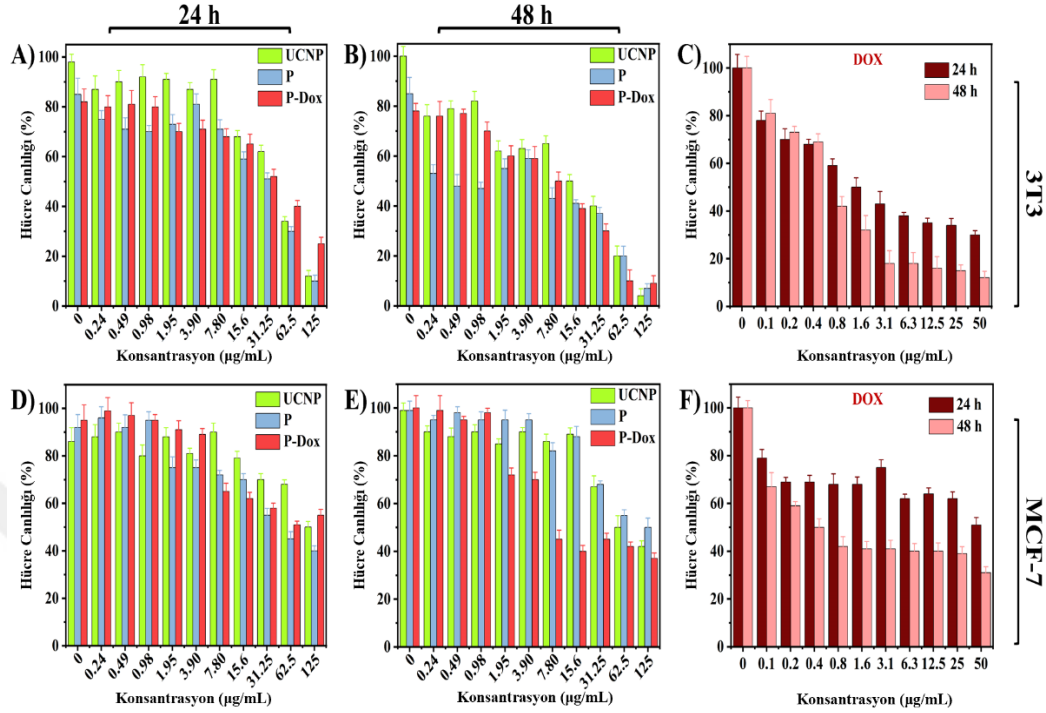
Tablo 4.13 : İki bağımsız deney sonucunda elde edilen ortalama IC₅₀ değerleri.

IC ₅₀ (µg/mL)	MCF-7 hücreleri	3T3/NIH hücreleri
UCNP	50.94	46.25
P	37.22	40.07
P-Dox	4.18	32.43
UCNP@P-Dox	18.87	33.64
Dox	0.94	0.92

Tüm gruplar için, hem NIR ışınması ile (λ = 980 nm, 0.72 W/cm²) hem de ışınma olmadan farklı konsantrasyonlarda hücre canlılık değerlendirmeleri, iki farklı zaman diliminde (24 saat ve 48 saat) MTT testi kullanılarak yapıldı (Şekil 4.75 ve Şekil 4.76). Serbest Dox ve diğer nanoprobaların (UCNP, P ve P-Dox) sitotoksisite sonuçları ise Şekil 4.74'te sunulmaktadır.

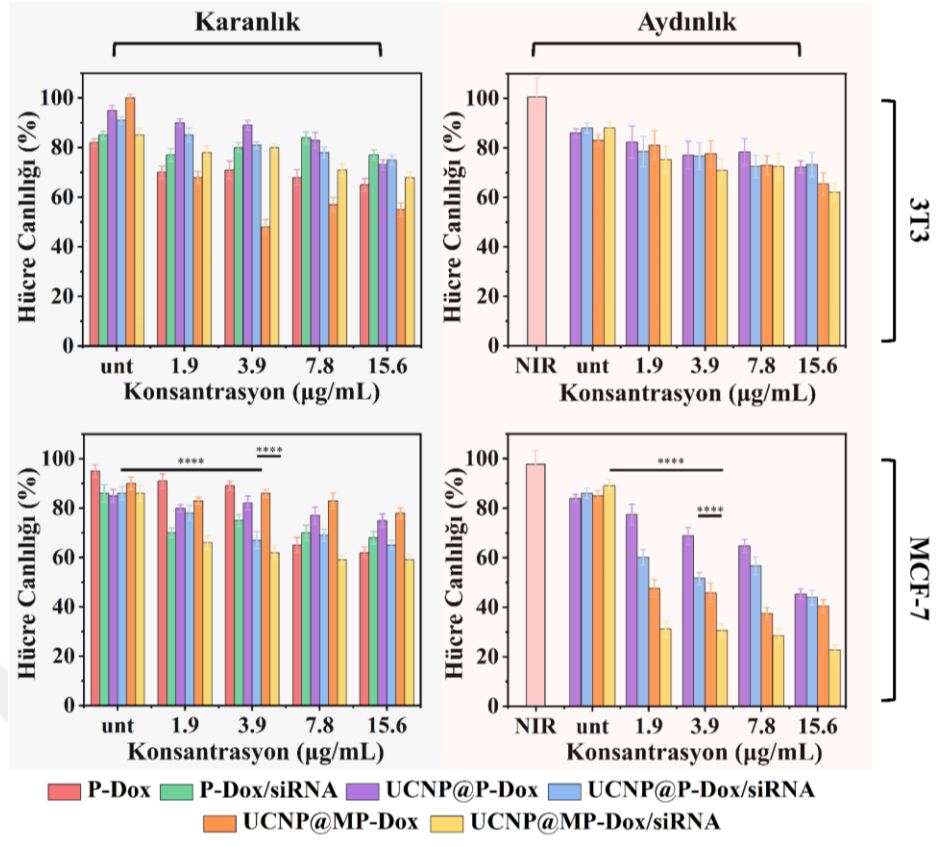
İki hücre hattı arasındaki belirgin farklılıklar nedeniyle, 24 saatlik tedavi sonrası dört konsantrasyon (1.95, 3.90, 7.80 ve 15.60 µg/mL) en uygun konsantrasyonlar olarak seçildi. Daha yüksek dozlara ve tedavi uygulanmamış gruba kıyasla sitotoksik etkilerin azaldığı gözlemlendi. Özellikle kontrol grubu olan 3T3 hücreleri, Dox grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek canlılık yüzdesi göstermektedir. Bununla birlikte, Dox tüm konsantrasyonlarda, tedavi uygulanmamış hücrelere kıyasla hücre canlılığını önemli

ölçüde azaltmıştır ve bu durum MCF-7 hücrelerinde de benzer şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.74).



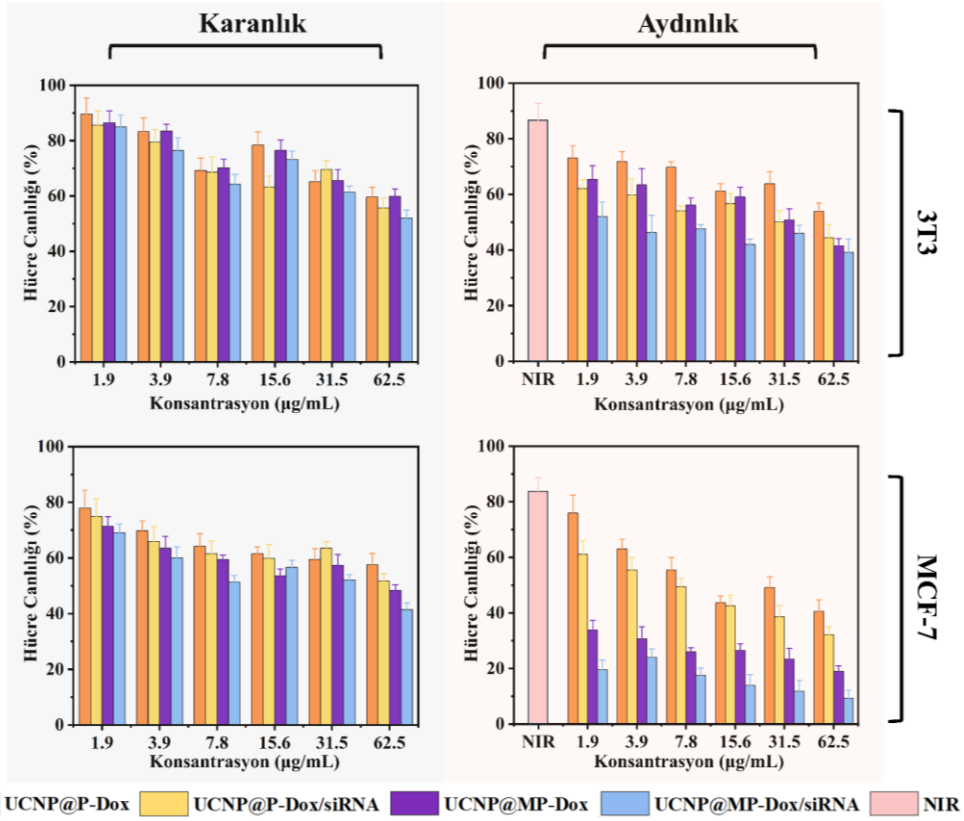
Şekil 4.74 : 3T3 hücrelerinin (A-C) ve MCF-7 hücrelerinin (D-F), UCNP, Polimer (P), P-Dox ve serbest Dox çözeltileri ile 24 saat ve 48 saat inkübasyon sonrası relatif hücre canlılıkları.

MCF-7 hücrelerinde, UCNP@P-Dox/siRNA ile lazer ışınması olmadan yapılan tedavi, tüm konsantrasyonlarda 24 saat içinde tedavi uygulanmamış grupla karşılaştırıldığında hücre canlılığını anlamlı derecede azalttı ($p < 0.0001$). Benzer şekilde, lazer ışınması olmadan, MCF-7 hücrelerinin UCNP@MP-Dox/siRNA ile inkübe edilmesi durumunda da anlamlı sitotoksikite gözlenmektedir (Şekil 4.75). Ayrıca, NIR ışınması altında, UCNP@MP-Dox ve UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobalarının, MCF-7 hücrelerinin canlılığında tedavi uygulanmamış grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir azalmaya yol açtığı görülmektedir ($p < 0.0001$; $3.90 \mu\text{g/mL}$). Diğer yandan, P-Dox/siRNA ve UCNP@P-Dox/siRNA grupları arasında 3.90 , 7.80 ve $15.60 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında anlamlı bir canlılık azalması fark edilmektedir. Bu konsantrasyonlar, her iki hücre hattında da hücre içi alımı değerlendirmek için seçildi.



Şekil 4.75 : P-Dox, P-Dox/siRNA, UCNP@P-Dox, UCNP@P-Dox/siRNA, UCNP@MP-Dox ve UCNP@MP-Dox/siRNA ile 6 saatlik tedavi sonrasında, hem ışık uyarımı ile ($\lambda = 980$ nm, 0.72 W/cm², soluk sarı) hem de ışık uyarımı olmadan (açık gri), 24 saatlik inkübasyon sonrası 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığı (****p<0.0001).

Şekil 4.76, farklı konsantrasyonlarda uygulanan tedavilerin 48 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı üzerindeki etkilerini, hem NIR ışınımı ($\lambda = 980$ nm, 0.72 W/cm²) hem de ışınım olmaksızın, karşılaştırmalı olarak göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, UCNP@P-Dox, UCNP@P-Dox/siRNA, UCNP@MP-Dox ve UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobalarının 24 saatlik inkübasyon verileriyle uyumlu olduğunu ortaya koymuştur.

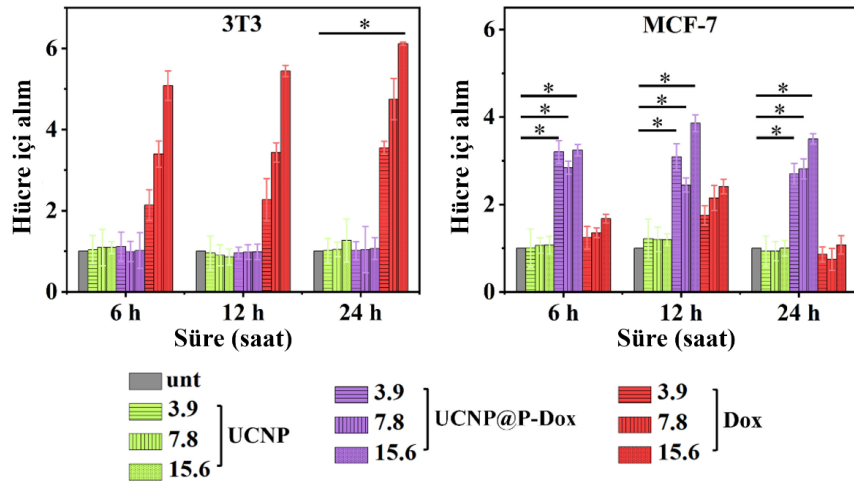


Şekil 4.76 : UCNP@P-Dox, UCNP@P-Dox/siRNA, UCNP@MP-Dox ve UCNP@MP-Dox/siRNA ile 6 saatlik tedavi sonrasında, hem ışık uyarımı ile ($\lambda = 980 \text{ nm}$, 0.72 W/cm^2 , soluk sarı) hem de ışık uyarımı olmadan (açık gri), 48 saatlik inkübasyon sonrası 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığı.

4.11.2 Hücre içi alım çalışmaları

Hücre içi alımlarının her hücre grubunda verimlilikleri 6., 12. ve 24. saatler için değerlendirilmiştir. Hücre içi alımın, iki hücre tipi için, aynı dozlar değerlendirilerek zamana bağlı değişimi gözlemlendi. Seçilen dozlar 3.9, 7.8 ve 15.60 $\mu\text{g/mL}$ 'dir.

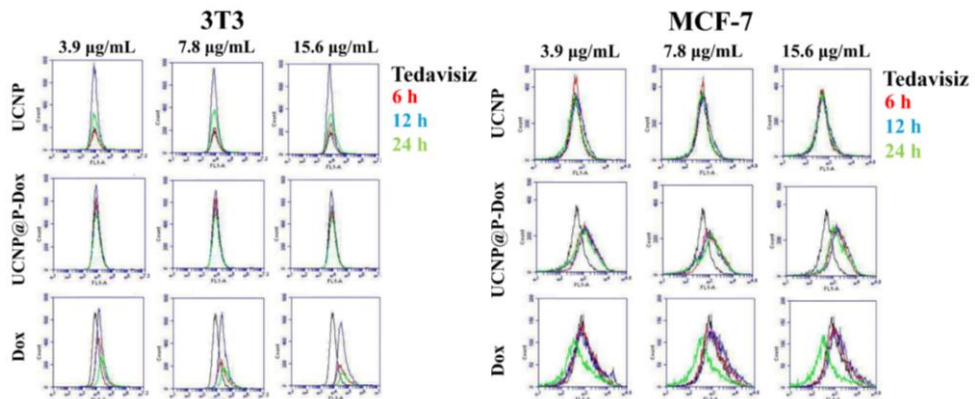
Akış sitometrisi ölçümleri, 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin 488 nm dalga boyunda uyarılmasının ardından, FL1-A kanalını kullanarak hücre içi alım analizini gerçekleştirmek üzere yapıldı (Şekil 4.77 ve 4.78). 3T3 hücrelerinde akış sitometrisi ile yapılan hücre içi alım analizi, UCNP ve UCNP@P-Dox'un benzer oranlar gösterdiğini (katlanma değişimi 1'in altında) ortaya koymaktadır (Şekil 4.77). Tedavi uygulanmamış grupla karşılaştırıldığında, anlamlı bir hücre internalizasyon gözlenmemektedir (Şekil 4.78). Öte yandan, Dox tedavisi, 3T3 hücrelerinde zamanla artan bir alım oranı göstermekte olup, bu durumun azalan hücre canlılığıyla ilişkili olduğu görülmektedir (Şekil 4.74C).



Şekil 4.77 : Akış sitometresi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda ve zaman aralıklarında UCNP, Dox ve UCNP@P-Dox'un *in vitro* hücresel alımı (* $p < 0.05$).

MCF-7 hücrelerinde, UCNP@P-Dox'un hücre içi alımı, tüm konsantrasyonlarda tedavi uygulanmamış gruba (unt) göre daha yüksek bulundu (Şekil 4.78). Özellikle, en yüksek katlanma değişimi, 7.8 µg/mL konsantrasyonunda 24 saatlik tedavi sonrası MCF-7 hücrelerinde belirlendi. Bunun yanı sıra, UCNP'nin alım oranı, 3T3 hücrelerinde olduğu gibi anlamlı bir değişiklik göstermemektedir.

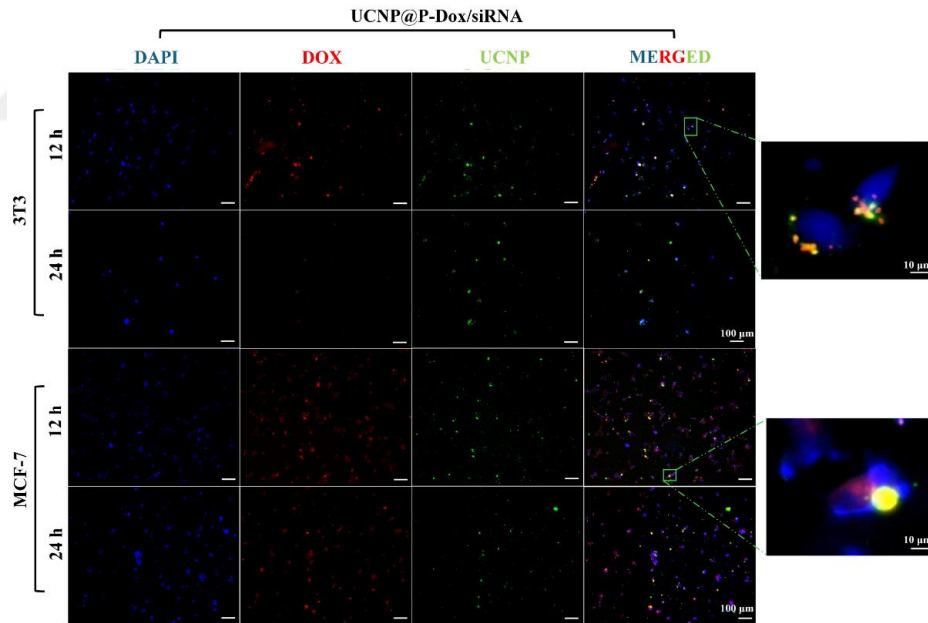
MCF-7 hücrelerinde, 3.9 µg/mL konsantrasyonda UCNP@P-Dox'un hücre içi alımı, Dox'a kıyasla 6., 12. ve 24. saatlerde sırasıyla 2.66, 1.76 ve 3.05 kat artmaktadır. 7.8 µg/mL konsantrasyonda bu artış sırasıyla 2.07, 1.12 ve 3.79 kat; 15.60 µg/mL konsantrasyonda ise 1.96, 1.60 ve 3.50 kat olarak gözlenmektedir. Buna karşılık, Dox tedavisi, zaman aralıklarına bağlı olarak konsantrasyon bağımlı bir alım artışı göstermektedir (Şekil 4.77).



Şekil 4.78 : Kültür ortamında UCNP, UCNP@P-Dox ve Dox'un 3.9, 7.8 ve 15.6 µg/mL konsantrasyonlarıyla inkübe edilen 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin FL1-A akış sitometrisi histogramları. (Siyah, kırmızı, mavi ve yeşil renkler sırasıyla tedavi edilmeyen, 6, 12 ve 24 saat tedavi edilen örnekleri temsil etmektedir.)

Bu aşamadan sonra, UCNP, Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobalarının 3T3 ve MCF-7 hücrelerindeki hücre içi alımları floresan mikroskopu kullanılarak gösterilmektedir (Şekil 4.79 ve 4.80). Dox alımı için floresan mikroskop sonuçları, 3T3 hücrelerinde UCNP@P-Dox/siRNA'nın, Dox'a kıyasla yaklaşık 1.2 kat daha fazla alım sağladığını göstermektedir. MCF-7 hücrelerinde ise UCNP@P-Dox/siRNA, 12 saatlik inkübasyon sonrası Dox'a kıyasla sürekli olarak 2 kat daha yüksek bir alım oranı sergileyerek artırılmış ilaç taşıma etkinliğini göstermektedir.

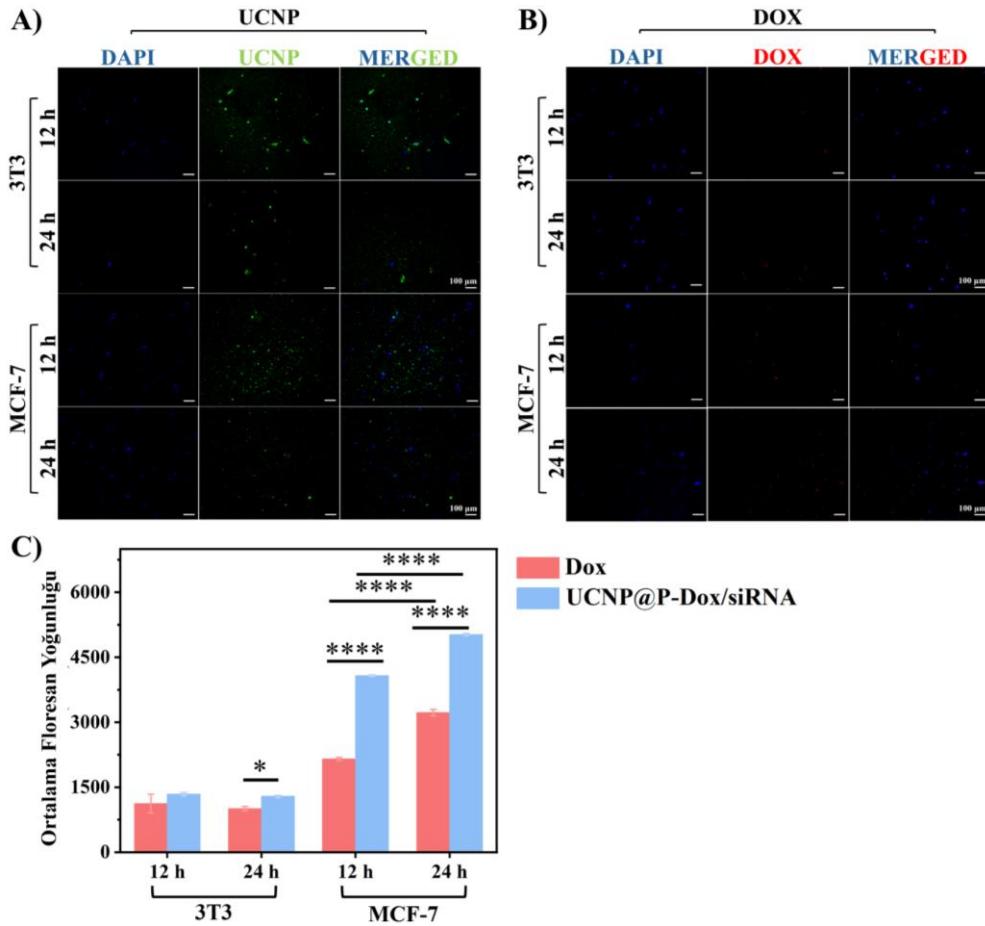
3T3 hücrelerinde genel olarak alım oranında anlamlı bir değişim gözlenmemektedir (Şekil 4.80). Ancak, 24 saatlik inkübasyon sonrasında UCNP@P-Dox/siRNA tedavisiyle oluşan floresan yoğunluğu nispeten daha az artmıştır. MCF-7 hücrelerinde ise UCNP@P-Dox/siRNA tedavisi, Dox'a kıyasla belirgin şekilde yüksek katlanma oranları göstermeye devam etmektedir ($p < 0.0001$). Bu sonuçlar, UCNP@P-Dox/siRNA'nın MCF-7 hücrelerinde 3T3 hücrelerine kıyasla daha etkili bir şekilde alındığını ve her iki zaman noktasında da üstün bir alım profili sergilediğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.79 : UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobaları ile 12 ve 24 saat tedaviden sonra hüresel alım için floresan mikroskopisi ile 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin görselleştirilmesi (ölçek çubuğu: 100 μm ve 10 μm).

Sitoplazma içerisindeki internalizasyon, MCF-7 hücrelerine özgü bir alım profili gösterdiğini ve düşük Dox konsantrasyonuna rağmen zamanla bu stabilitesini koruduğunu ortaya koymaktadır. Canlılık ve alım çalışmaları, 3T3 hücrelerinde

(sadece Dox tedavi grubu hariç) negatif bir korelasyon göstermiş; zamanla alım sınırlı veya hiç olmaksızın canlılık artışı gözlenmiştir. Buna karşılık, MCF-7 hücreleri, artan alım yanıtı sergilemiş ve 3T3 hücrelerine kıyasla daha fazla canlılık kaybı göstermiştir. Bu durumun olası bir açıklaması, meme kanseri hücrelerinde GLUT5'in aşırı ekspresyonunun, nanoprobun yüzeyindeki fruktoz gruplarıyla daha etkili bir etkileşim sağlayarak hücre alımı ve toksisitesini artırmasıdır.



Şekil 4.80 : **A)** UCNP ve **B)** Dox ile tedavi edilen 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin 12 saat ve 24 saat sonra hücre alım için floresan mikroskopisi ile görüntülenmesi (ölçek çubuğu: 100 µm). **C)** 12 ve 24 saat sonra Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedavi edilen 3T3 ve MCF-7 hücrelerinin ortalama floresan yoğunluğu değerleri.

4.11.3 Biyanoprobun apoptoz çalışmaları

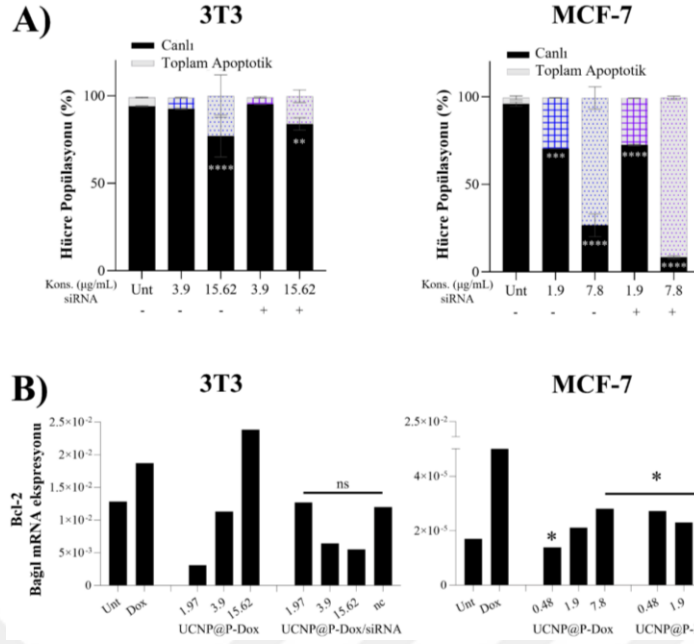
Nanoprobun MCF-7 ve 3T3 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini anlamak amacıyla hücreler UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedavi edilerek, tedavi uygulanmamış gruplarla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.81A). 24 saatlik tedavi sonrasında, her iki nanoprob grubunda da 3T3 hücreleri için 15.62 µg/mL konsantrasyonda toplam apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı bir artış gözlemlendi (UCNP@P-Dox için $p < 0.0001$,

UCNP@P-Dox/siRNA için $p=0.0045$). Ayrıca, bu konsantrasyon, 3T3 hücrelerinde canlılık oranının azalmaya başladığı kritik eşik noktası olarak belirlendi. Aynı konsantrasyon için siRNA varlığı veya yokluğu, nanoprob grupları arasında anlamlı bir değişiklik yaratmamaktadır.

Dikkat çekici bir şekilde, 7.80 $\mu\text{g/mL}$ ve 1.90 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında her iki nanopropla tedavi edilen MCF-7 hücreleri, düşük konsantrasyonlarla, tedavi uygulanmamış grupla ve 3T3 hücreleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek apoptotik hücre yüzdesi göstermektedir. Özellikle, 7.80 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu, UCNP@P-Dox nanoprobuna siRNA eklenmesiyle anlamlı bir değişiklik göstermiştir ($p<0.0001$) (Şekil 4.81A).

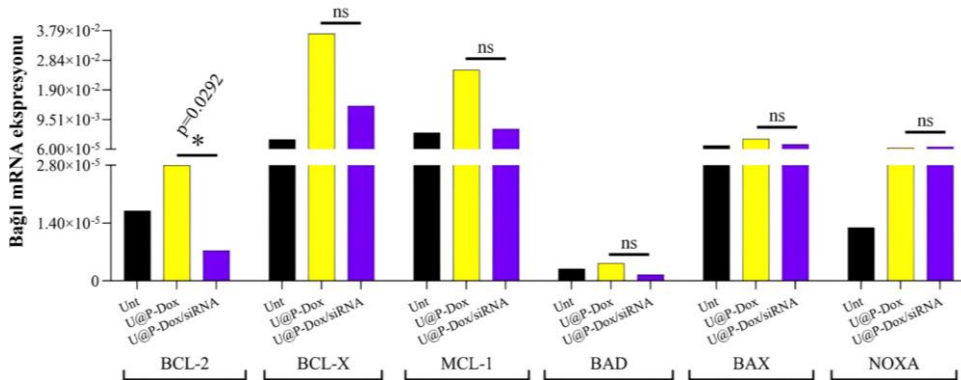
3T3 ve MCF-7 hücreleri için apoptotik davranışa uygun konsantrasyonlar belirlendikten sonra, Bcl-2 için bağıl mRNA ekspresyon değişiklikleri değerlendirildi. Başlangıç konsantrasyonları 3T3 hücreleri için 15.62 $\mu\text{g/mL}$, MCF-7 hücreleri için ise 7.80 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlendi. Ayrıca, anti-Bcl-2 siRNA yüklü nanoprobalar (UCNP@P-Dox/siRNA) ile doz-bağımlı etkileri anlamak amacıyla iki ardışık dilüsyon yapıldı. Şekil 4.80B'de her iki hücre tipi için Bcl-2 mRNA ekspresyon değişiklikleri sunulmaktadır. Yalnızca Dox tedavisi, UCNP@P-Dox/siRNA tarafından taşınan konsantrasyonla çalışılmıştır.

Sonuç olarak, 3T3 hücrelerinde Bcl-2 mRNA seviyeleri ile doz-bağımlı bir ilişki gözlenmiş olup, ancak gruplar ve konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Buna karşın, MCF-7 hücrelerinde özellikle 7.80 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobaları arasında anlamlı bir azalma gözlenmektedir ($p=0.0292$) (Şekil 4.81B).



Şekil 4.81 : A) UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedaviden sonra canlı ve toplam apoptotik hücrelerin yüzdesi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001). **B)** Sırasıyla farklı konsantrasyonlarda Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedavi edilen 3T3 ve MCF-7 hücrelerindeki bağıl mRNA ekspresyonu değişiklikleri. (unt: tedavi edilmemiş, nc: negatif siRNA kontrolü) (*p=0.0292, **p<0.01).

Ek olarak, MCF-7 hücreleri için BCL-X, MCL1, BAD, BAX ve NOXA gibi anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin bağıl mRNA ekspresyon değişiklikleri de değerlendirildi. UCNP@P-Dox/siRNA tedavisi ile BCL-X ve MCL1 mRNA ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmiş, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.82). MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 aracılı apoptozun birikimine rağmen, BAD, BAX ve NOXA gibi pro-apoptotik genlerin ekspresyon modellerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 4.82).



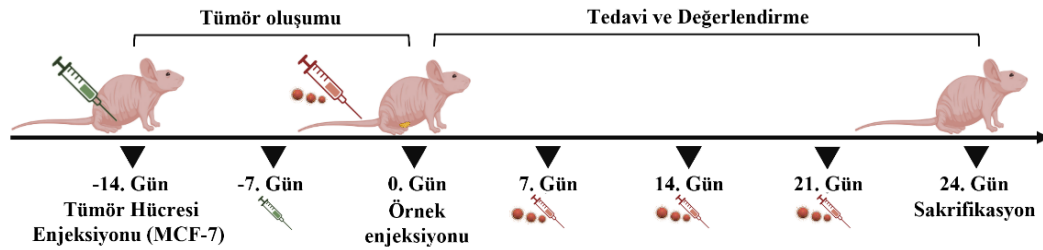
Şekil 4.82 : 7.8 µg/mL konsantrasyonda UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA ile tedaviden sonra MCF-7 hücrelerinde bağıl mRNA ekspresyonu değişiklikleri. UCNP, grafikte U olarak kısaltılmıştır.

4.12 Hazırlanan Teranostik Biyonanoproların *In Vivo* Çalışmalarla Test Edilmesi

In vivo hayvan deneyleri çalışması için Yerel Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2018/23 onay numarası ile etik onay alındı.

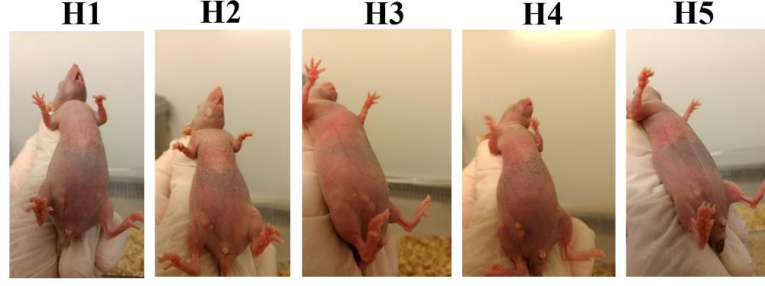
4.12.1 Meme tümör modelinin oluşturulması

Meme modeli oluşumunda hayvanlara uygulanan 21 günlük hormon tedavisi için Danimarka menşei olan Estrofem® (2mg film kaplı tablet, Novo Nordisk) kullanıldı. Süreç içerisinde haftada iki olmak suretiyle toplamda 4 defa MCF-7 hücre enjeksiyonu serum fizyolojik içerisinde enjekte edildi (Şekil 4.83). Tüm hayvanlarda hücre enjeksiyonu sağ meme dokusundaki yağ yastığı alanına uygulandı. Histopatolojik inceleme için ise hem sağ meme dokusu (MCF-7 hücresi enjekte edilen) hem de sol meme dokusu karşılaştırma ve olası metastaz değerlendirilmesi için birlikte alındı. Aynı zamanda tüm gruplarda, nude farelerin anestezide olan duyarlılıkları korumak amacıyla her gruptan 2-4 hayvan IVIS Lumina Series III cihazı ile görüntülendi ve tedavi gruplarına ait takipler gerçekleştirildi. Tüm aşamalarda ağırlık takibi yapıldı, tümör oluşumu sonrasında tümör hacmi ölçüldü ve hesaplandı.



Şekil 4.83 : *In vivo* model oluşturulması ve tedavi grubunun takibi aşamalarına ait şematik görsel.

Model oluşumunda 6-8 haftalık nude fareler kullanıldı. Tümör modeli oluşumunun denenmesi amacıyla pozitif kontrol olarak 5 deney hayvanı kullandı. Uzun dönemde tümör varlığı ve yaşam parametreleri takip edildi (Şekil 4.84). 21 günlük hormon tedavisinden sonra tümör indüksiyonu başarıyla oluşturuldu ve tümörün tedavi edilmeden, gözlemsel takibi 45. güne kadar gerçekleştirildi.



Şekil 4.84 : Tümör oluşturulan pozitif kontrol grubundaki sakrifikasyon öncesi tümör boyutları (n=5).

4.12.2 Hazırlanan UCNP'lerin antikanser tedavisinde etkinliğinin incelenmesi

Çalışmada yer alan terapi kısmında kanser ikili ilaç taşıma sistemi ile tedavi edilmeye çalışılarak, sistemin kanser tedavisindeki etkinliği incelendi.

Grup 1b; negatif kontrol grubu (herhangi bir uygulama gerçekleştirilmemiş ve tümör oluşturulmamış grup). Bu grupta 5 hayvan bulunmaktadır ve takip eden serum fizyolojik enjeksiyonlarında meme dokusunda bir etki gözlenmemektedir. Hayvanların takip süresince gösterdikleri ağırlık değişimi Şekil 4.85A'da sunulmaktadır.

Grup 2b; pozitif kontrol grubu (tümör oluşturulmuş, tedavi uygulanmamış grup). Bu grupta 5 hayvan bulunmaktadır. Takip süresince kaydedilen ağırlık değişimleri grafiği Şekil 4.85A'da, ortalama tümör hacmi değişimini gösteren grafik ise Şekil 4.85B'de gösterilmektedir.

Grup 3b; tümör modeli oluşumu sonrası, tedavi olarak sadece Dox uygulaması gerçekleştirilen grup. Yapılan çift-yönlü-ANOVA analizine göre; ağırlık değişimi zamana göre anlamlı şekilde artmaktadır ($p < 0.0001$) fakat, tümör hacminin hayvanlar arasında ve zamana bağlı değişiminde istatistiksel anlamlılık bulunamadı (hayvanlar arasında $p = 0.6643$ ve zaman bağlı her hayvanın değişimi $p = 0.2583$). Hayvanların takip süresince gösterdikleri ağırlık değişimi Şekil 4.85A'da, tümör hacmi değişimi ise Şekil 4.85B'de sunulmaktadır.

Grup 4b; Tümör modeli oluşumu sonrası, tedavi olarak sadece Bcl-2 siRNA uygulaması gerçekleştirilen grup. Bu grup 5 hayvan ile çalışıldı. Yapılan çift-yönlü-ANOVA analizine göre; ağırlık değişimi zamana göre anlamlı şekilde artmaktadır ($p < 0.0001$). Hayvanların takip süresince gösterdikleri ağırlık ve tedavi sürecindeki

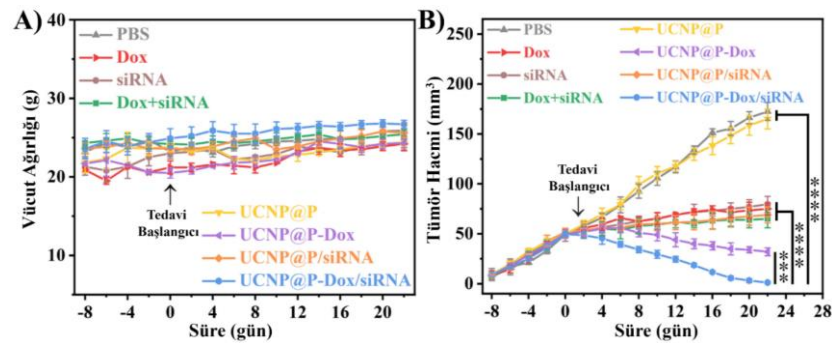
tümör hacmi değişimi grafikleri sırasıyla Şekil 4.85A ve Şekil 4.85B’de sunulmaktadır.

Grup 5b; tümör modeli oluşumu sonrası, tedavi olarak sadece Bcl-2 siRNA-Dox uygulaması gerçekleştirilen grup. Bu grup 5 hayvan ile tamamlandı. Yapılan çift-yönlü-ANOVA analizine göre; ağırlık değişimi (Şekil 4.85A) zamana göre anlamlı değişim göstermedi ($p=0.1316$). Tümör hacmi değişimi Şekil 4.85B’de sunulmaktadır.

Grup 6b; tümör modeli oluşumu sonrası, UCNP@P-Dox ile tedavi süreci gerçekleştirilen grup. Bu grup 10 hayvan ile gerçekleştirildi. Tümör modeli oluşumundan, tedavi takip sürecinin sonuna kadar elde edilen ağırlık değişiminin istatistiksel olarak hem zaman hem de hayvanlar arasındaki farklılığı anlamlı bulundu ($p<0.0001$). Şekil 4.85A’da ağırlık, Şekil 4.85B’de ise tümör hacmindeki değişiklikler sunulmaktadır.

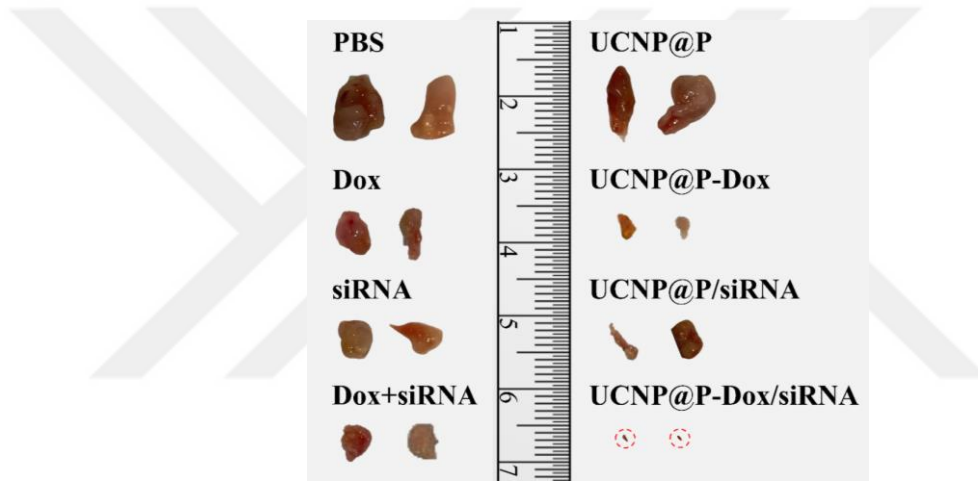
Grup 7b; tümör modeli oluşumu sonrası, UCNP@P/siRNA ile tedavi süreci gerçekleştirilen grup. Bu grup 5 hayvan ile tamamlandı. Tümör modeli oluşumu sonrası, Dox taşımayan nanopartikül grubu UCNP@P/siRNA ile tedavi süreci başlatıldı. Tümör modeli oluşumundan, tedavi takip sürecinin sonuna kadar elde edilen ağırlık değişimi 4.85A’da, tümör hacmi değişimi ise Şekil 4.85B’de gösterilmektedir.

Grup 8b; tümör oluşumu sonrası tedavi grubu olarak UCNP@P-Dox/siRNA uygulanan grup, 10 hayvan ile tamamlandı. Ağırlık takipleri açısından bakıldığında her hayvanın zamana bağlı olarak ağırlığı hormon uygulamasına kadar artmakta ($p<0.0001$) ve tümör tedavi başlangıcından yaklaşık 10 gün kadar sonrasında azalmaktadır. Bu azalma tümör hacminin tedavide etkinliğine bağlı olan azalması ile pozitif korelasyon göstermektedir. Şekil 4.85A’da ağırlık, Şekil 4.85B’de tümör hacmi değişim grafikleri gösterilmektedir.



Şekil 4.85 : Tümör oluşturulan farelerin **A)** vücut ağırlıklarının ve **B)** tümör hacimlerinin değişim grafikleri (***) $p<0.001$, ****) $p<0.0001$).

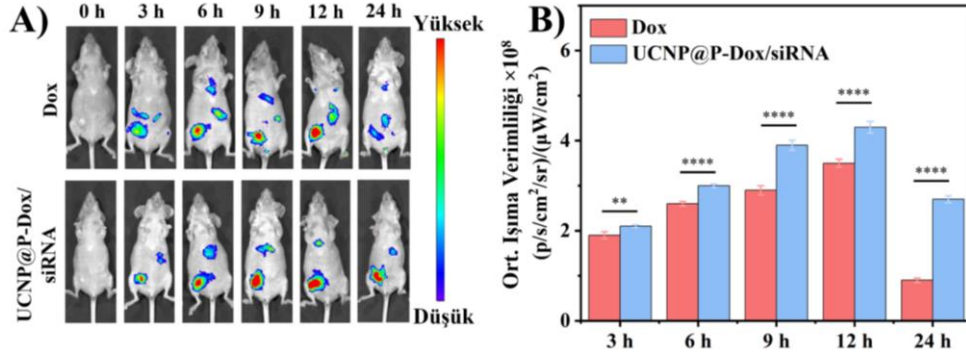
Yapılan tüm tedavi grupları için vücut ağırlığında kayda değer bir değişiklik gözlenmemektedir. Tedavi sırasında, tümör boyutları kontrol grubunda arttığı ve tümör büyümesinin serbest Dox grubunda hafifçe bastırıldığı görülmektedir. Karşılaştırılabilir şekilde, UCNP@P-Dox, artan bir tümör baskılamasına sahiptir. Serbest Dox ile karşılaştırıldığında, siRNA ve Dox-siRNA gruplarında herhangi bir tümör hacminde küçülme gözlenmemektedir. Nihai grup olan UCNP@P-Dox/siRNA için tümör hacmindeki azalma diğer gruplarla kıyaslandığında oldukça fazla olduğu tespit edilmektedir. Bu sonuç hazırlanan UCNP@P-Dox/siRNA biyonanoproların ayrı ayrı ve birlikte uygulanan tedavilere göre siRNA ve Dox yüklü ikili tedavinin üstünlüğünün ortaya koymaktadır. Ayrıca, siRNA ve Dox yüklü ikili ilaç salım sisteminin tedavideki potansiyelini de göstermektedir (Şekil 4.85 ve Şekil 4.86).



Şekil 4.86 : Tümör oluşturulan farelerdeki tümör dokusunun görüntüleri.

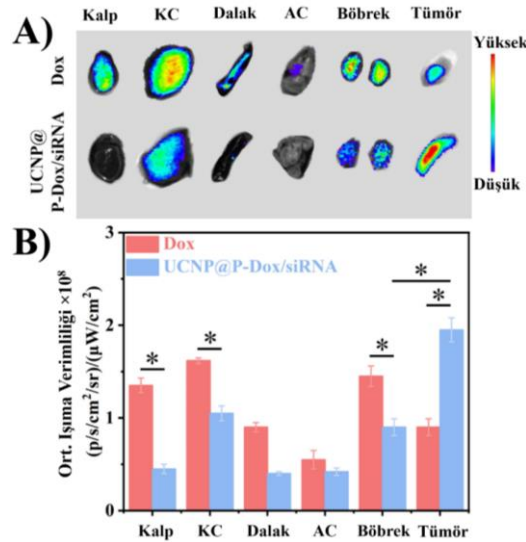
4.12.3 *In vivo* biyodağılım çalışmaları

Glikopeptid polimerinin hedefleme kapasitesini göstermek amacıyla, tümör taşıyan farelerde, Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA grubunun enjeksiyonundan 0, 3, 6, 9, 12, ve 24 saat sonra *in vivo* görüntüleme sistemi kullanılarak (IVIS) alınan görüntüler *in vivo* biyodağılım performansını göstermektedir (Şekil 4.87A). Dox grubu ile UCNP@P-Dox/siRNA grubu karşılaştırıldığında, UCNP@P-Dox/siRNA'nın tümör bölgesinde daha fazla biriktiği belirlendi (Şekil 4.87). Bu durum, polimer yapısında bulunan GLUT5 hedefleme birimleri (fruktoz monomeri) ile aktif hedeflemenin yanı sıra artırılmış geçirgenlik ve alikonma (EPR) etkisi sayesinde pasif hedefli taşımayla ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, UCNP@P-Dox/siRNA tümör dokusuna daha etkili şekilde ulaşmakla kalmayıp, aynı zamanda tümör dokusunda daha uzun süre tutulduğu da gözlemlendi (Şekil 4.87A ve B).



Şekil 4.87 : Tümör taşıyan farelerde Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA enjeksiyonundan sonra; **A)** farklı zaman dilimlerinde alınan *in vivo* floresan görüntüleri ile ana organlar ve tümör dokularındaki dağılımı ve **B)** enjeksiyondan 24 saat sonra kaydedilen floresan sinyal yoğunluklarını gösteren grafik (**p<0.001, ****p<0.0001).

Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA grubu enjeksiyonundan 24 saat sonra sakrifiye edilen farelerden alınan ana organlar ve tümör dokuları toplandı ve floresan görüntüleri incelendi (Şekil 4.88). Önceki bulgularla tutarlı olarak, Dox grubunun tümör dokusunda düşük düzeyde birikim gözlenirken, UCNP@P-Dox/siRNA grubunda anlamlı bir birikim tespit edildi (p<0.05). Ayrıca, UCNP@P-Dox/siRNA'nın kalp, karaciğer ve böbreklerdeki birikiminin diğerlerine kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğu saptandı (p<0.05). Bununla birlikte, UCNP@P-Dox/siRNA'nın dalak ve akciğerdeki birikimi Dox'a göre daha düşük olmasına rağmen, floresan oranındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.



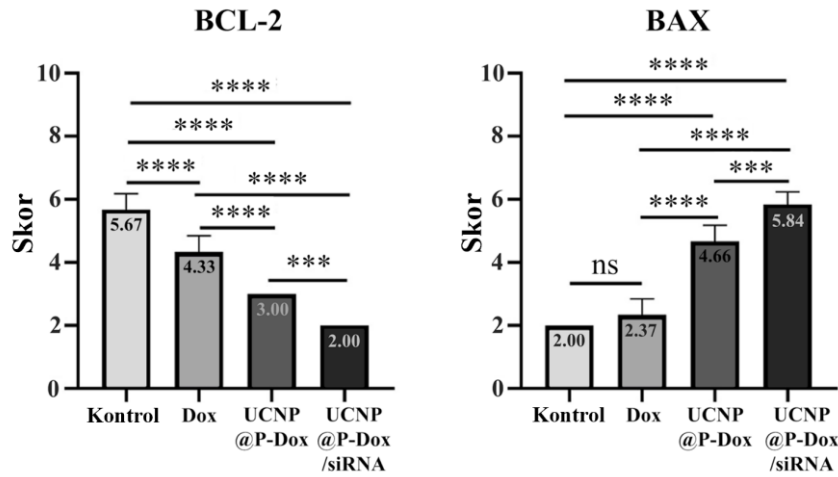
Şekil 4.88 : Tümör taşıyan farelerde Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA enjeksiyonundan 24 saat sonra kaydedilen; **A)** ex vivo floresan görüntüleri ile ana organlar ve tümör dokularındaki dağılımı ve **B)** bunların floresan sinyal yoğunluklarını gösteren grafik (*p<0.05).

Sonuç olarak, nanoprobun yapısında yer alan glikopeptid polimerin, tümör dokusunu hedefleme spesifitesini artırdığı, ana organlardaki birikimi azalttığı ve çift yönlü gen/kemoterapi etkisi potansiyeli taşıdığı gösterilmiştir.

4.13 Histopatolojik Çalışmalar

UCNP@P-Dox/siRNA'nın çift yönlü gen ve kometerapi tedavilerindeki antitümör aktivitesini daha doğru bir şekilde değerlendirmek için hematoksin ve eozin (H&E) boyaması ile çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA), Bcl-2 ve Bax için immün boyama içeren immünohistokimyasal analizler gerçekleştirildi (Şekil 4.89 ve 4.90). Histopatolojik analizde, sol meme lobunda (kontrol) herhangi bir anormallik tespit edilmezken, sağ meme lobunda (tümör grubu) nodüler veya infiltratif tümör odakları saptandı. Tümör hücreleri pleomorfizm, anizositoz, anizonükleoz, nükleus artışı, mitotik figürler ve lenfosit infiltrasyonu gösterdi.

Dox grubunda bulgular tümör grubuna benzerdi ancak mitotik figür sayısında azalma ve bazı fibrozis alanları gözlemlendi. UCNP@P-Dox grubundaysa, Dox grubuna kıyasla daha belirgin fibrozis oluşumu ve mitotik figürlerde daha büyük bir azalma görüldü. UCNP@P-Dox/siRNA grubunda ise fibrozis oluşumu ve nekrotik tümör hücrelerinin varlığı, tümör grubuna göre daha belirgin hale geldi (Şekil 4.90).



Şekil 4.89 : Bcl-2 ve BAX immunoreaktivite skorunun dört grup arasındaki istatistiksel değerleri (***p<0.001, ****p<0.0001).

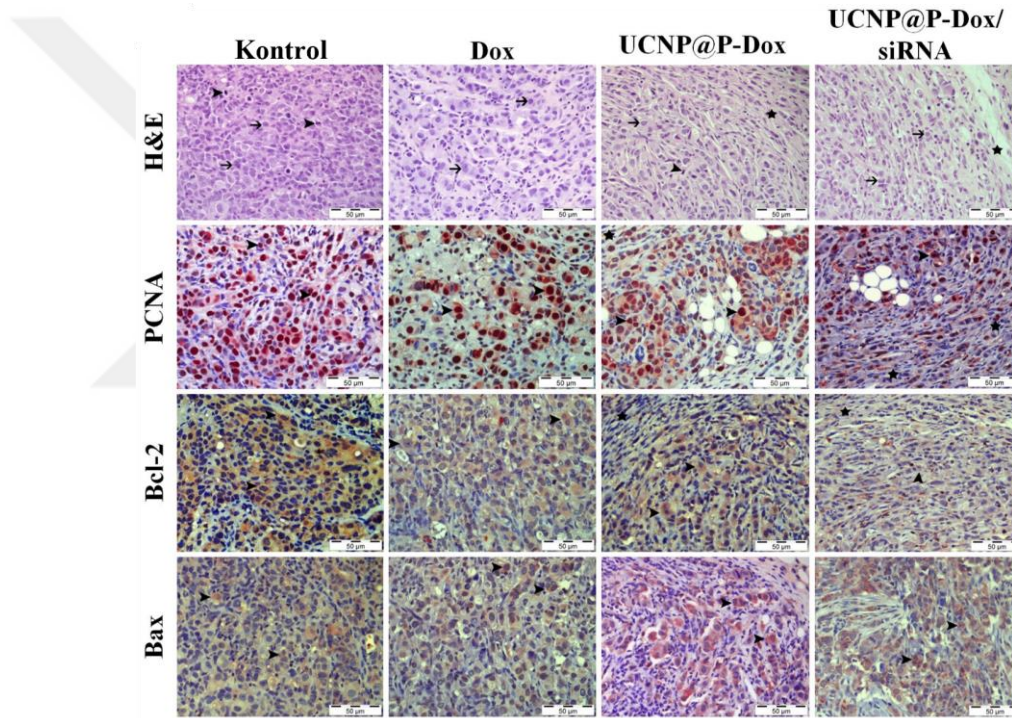
Mitotik indeks, tümör grubunda tedavi gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulundu (p<0.05). Bununla birlikte, tedavi grupları arasında sayısal farklılıklar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05) (Tablo

4.14). PCNA immün boyaması tüm gruplarda yoğun nükleer boyanma gösterdi ve bu boyanma özellikle tümör grubunda daha belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 4.90). PCNA indeksi üzerine yapılan istatistiksel analiz, tümör grubu ile diğer üç grup arasında anlamlı bir fark olduğunu ortaya koymaktadır ($p < 0.05$) (Tablo 4.14).

Tablo 4.14 : Mitotik indeks verilerinin istatistiksel analizi.

Grup	PCNA	Mitotic index
Tedavi olmamış	401.75±12.49 ^a	2.55±0.55 ^a
Dox	285±4.95 ^b	0.80±0.09 ^b
UCNP@P-Dox	218±12.17 ^c	0.54±0.12 ^b
UCNP@P-Dox/siRNA	192.77±8.13 ^c	0.33±0.06 ^b
P value	<0.001	<0.002

^{a,b,c} gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 4.90 : 24. günde farklı tedavi gruplarına ait MCF-7 tümör kesitlerinin H&E (ok ucu: mitotik figürler, ok: tümör hücresi, yıldız: lifli doku oluşumu), PCNA, Bcl-2 ve Bax immünohistokimyasal boyama görüntüleri (ok ucu: intranükleer immünopozitif tümör hücreleri, yıldız: lifli doku oluşumu) (ölçek çubuğu: 50 µm).

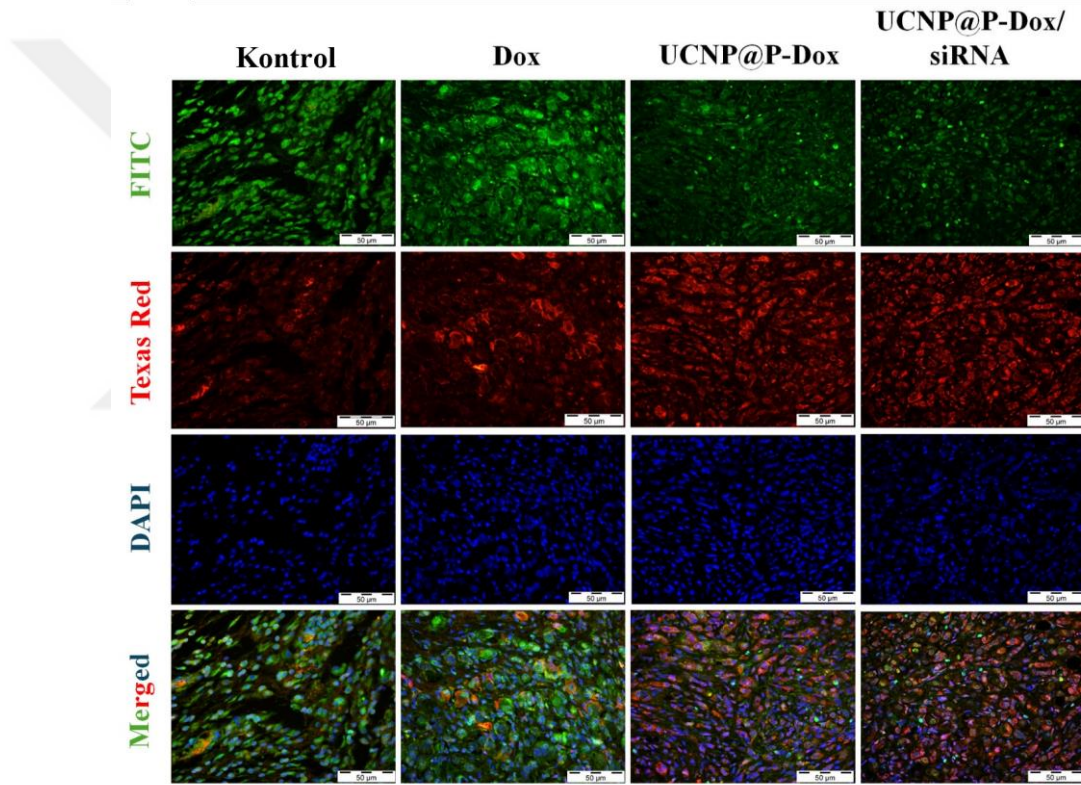
Bcl-2 ve Bax primer antikorları kullanılarak yapılan çift immünofloresan boyama, tümör hücrelerinde intrastoplazmik immün-pozitif reaksiyonlar ortaya koydu. İmmünofloresan boyama, Bcl-2 susturulması ile anti-apoptotik aktivite arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Tablo 4.15'te sunulan veriler, Bax ve Bcl-2 arasında negatif bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Dox grubuna kıyasla UCNP@P-Dox grubu, anti-apoptotik Bcl-2 protein seviyelerini azaltırken pro-apoptotik Bax

protein seviyelerini artırmıştır (Şekil 4.91). Bu korelasyon, UCNP@P-Dox/siRNA ile tedavi edilen tümör gruplarında daha belirgin hale gelmektedir.

Tablo 4.15 : Bax-Bcl-2 boyamalarının istatistiksel korelasyonu.

		Bcl-2	Bax
Bcl-2	Pearson Correlation	1	-.922**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
Bax	Pearson Correlation	-.922**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

**Korelasyon 0.01 düzeyinde önemlidir (2 kuyruklu).



Şekil 4.91 : Tümör, Dox, UCNP@P-Dox ve UCNP@P-Dox/siRNA gruplarının ikili immunofloresan boyaması. Bcl-2 immunofloresan (FITC), BAX immünofloresan (Texas red), çekirdek immünofloresan boyaması (DAPI), Bcl-2, BAX ve çekirdek boyamalarının birleştirilmiş hali (merged) (ölçek çubuğu:50 µm).

Yapılan deneysel çalışmada tümör kontrol grubunda Bcl-2 immunohistokimyasal skorunun tedavi gruplarında ise BAX ekspresyonunun yüksek olduğunu immunohistokimyasal ve immunofloresan yöntemlerle tespit edildi. Histopatolojik, immunohistokimyasal ve immunofloresan boyama metodlarının ve istatistik verilerin sonuçlarına dayanarak yapılan bu çalışmada UCNP@P-Dox/siRNA tedavi protokolü

uygulanan farelerde bu tedavi yönteminin test edilen diğer tedavi yöntemlerine göre daha etkili olduğu açıkça göstermektedir. Tüm bu bulgular, geliştirilen UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunun hem Dox hem de siRNA'nın hedef tümör bölgesine etkin bir şekilde taşınmasını sağladığını ve güçlü tümör inhibisyon etkileri oluşturduğunu göstermektedir.



5. SONUÇLAR

Bu çalışma kapsamında, öncelikle teranostik nanoprobaların iç çekirdeğini oluşturan ve fotoluminesans görüntülemeyi sağlayan altıgen şekilli $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ UCNP'ler istenen boyut ve şekilde başarı ile sentezlendi. Ardından, çok fonksiyonlu, endozomdan kaçabilen, yüksek ilaç/gen taşıma kapasitesine sahip, tümör hücrelerine hedeflenmeyi ve biyouyumluluğu sağlayan ve kemoterapötik ilaç olan Dox'u taşıyan $\text{P}(\text{MiMA}-b\text{-DopMA}-b\text{-iprFrMA})-b\text{-P}(\text{Liz})/\text{Dox}$ tetrablok polimeri kontrollü polimerizasyon teknikleri olan RAFT, halka açılma (ROP) polimerizasyonu ve klik kimyası kullanılarak başarı ile sentezlendi. Ayrıca, teranostik nanoparçacıkların geliştirilmesi sürecinde, tetrablok polimer ile kaplanan UCNP'ler, MRI kontrast ajanı, fototermal terapi ajanı ve manyetik hedefleme özelliklerini kazanmak için suda dağılılabilen demir oksit nanoparçacıkları ile modifiye edildi. Hazırlanan teranostik nanoprobaların pH-kontrollü salım profilleri incelenerek, hedeflenen şekilde pH-kontrollü Dox salımı sağladığı gösterildi. Son aşamada, fototermal terapi ve kemoterapi etkinliği gösteren nanoparçacıklar, hücrelerin apoptotik direnç göstermelerini önlemek amacı ile anti Bcl-2 siRNA ile konjuge edildi. Kompleks oluşumu agaroz jel yürütme yöntemi kullanılarak incelendi ve bu doğrultuda en iyi kompleksleşme, (N/P)/siRNA oranı 5/1 olduğu bulundu.

İkili (kemoterapi ve gen tedavisi) ve üçlü tedavi (kemoterapi, fototermal terapi ve gen tedavisi) yaklaşımları için, çok işlevli ve iyi karakterize edilmiş çekirdek/kabuk yapısına sahip UCNP@P-Dox/siRNA ve UCNP@MP-Dox/siRNA nanoprobaları geliştirildi. UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunun meme kanseri hücrelerinde GLUT5'in aşırı ekspresyonu yoluyla tümör bölgesine etkili bir şekilde hedeflenebildiğini, pH'a duyarlı kontrollü ilaç salımı sağladığını ve fizyolojik ortamda stabil olduğu gösterildi. Ayrıca UCNP@MP-Dox/siRNA'nın iyi bir MRI kontrast

maddesi olma potansiyeline sahip olduğunu kanıtlandı. UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunun, meme kanserinin sinerjik eradikasyonunu göstermek için prelinik çalışmaları gerçekleştirildi. GLUT5 aracılı hedefleme spesifikliğı için tasarlanan UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunun meme kanseri hücrelerine etkili bir şekilde Dox ve siRNA ilettiğı gösterildi. Tasarlanan hedefe yönelik taşıma sistemi sayesinde, nanoprobular kanser hücreleri tarafından etkin bir şekilde alınmakta, bu da kanser hücrelerinde apoptozun artmasına ve Bcl-2 mRNA ekspresyonunun düzenlenmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca, fare tümör modeli üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalar, nanoprobuların toksik yan etkilere neden olmadan etkili bir anti-tümör etkinlik sergilediğini göstermektedir. Tümör bölgesinde nanoprobuların artmış birikimi, tümör dokularında Bcl-2 proteinine önemli yanıtla birlikte, UCNP@P-Dox/siRNA nanoprobunun meme kanserinin kombinasyon terapisinde başarıyla uygulanabileceğini doğrulamaktadır. Ayrıca, *in vitro* sonuçlar, Bcl-2 siRNA'nın Bcl-2/Bax oranındaki artışı baskıladığını ve bu mekanizma aracılığıyla apoptozu sinerjistik olarak artırarak meme kanseri hücrelerini Dox tedavisine daha duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. Bu bulgulara dayanarak, nanotaşıyıcı tarafından eşzamanlı olarak iletilen Dox ve siRNA'nın sinerjik terapötik etkisinin, *in vivo* koşullarda daha da belirgin olduğu değerlendirilmektedir. Histopatolojik, immunohistokimyasal ve immunofloresan boyama metodlarının ve istatistiki verilerin sonuçlarına dayanarak, yapılan bu çalışmada UCNP@P-Dox/siRNA tedavi protokolü uygulanan farelerde bu tedavi yönteminin test edilen diğer tedavi yöntemlerine göre daha etkili olduğu açıkça gösterilmektedir. Sonuç olarak, teranostik biyonanoprobuların gösterdiği dikkate değer sinerjik etki, bu nanoplatformun bileşenlerinden herhangi birinin tek başına uygulanmasına (yalnızca siRNA, Dox veya PTT) kıyasla üstün terapötik etkinlik sağladığını ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] **Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F.** (2021). Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Wiley, 71, 209–249.
- [2] **Kim, H., Kwak, G., Kim, K., Yoon, H.Y. & Kwon, I.C.** (2019). Theranostic Designs of Biomaterials for Precision Medicine in Cancer Therapy. *Biomaterials*, 213, 119207.
- [3] **Yang, J., Lee, C.H., Park, J., Seo, S., Lim, E.-K., Song, Y.J., Suh, J.-S., Yoon, H.G., Huh, Y.M. & Haam, S.** (2007). Antibody Conjugated Magnetic PLGA Nanoparticles for Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. *Journal of Materials Chemistry*, 17, 2695.
- [4] **Meier, R.J., Simbürger, J.M.B., Soukka, T. & Schäferling, M.** (2014). Background-Free Referenced Luminescence Sensing and Imaging of PH Using Upconverting Phosphors and Color Camera Read-Out. *Analytical Chemistry*, 86, 5535–5540.
- [5] **Achatz, D.E., Meier, R.J., Fischer, L.H. & Wolfbeis, O.S.** (2011). Luminescent Sensing of Oxygen Using a Quenchable Probe and Upconverting Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 260–263.
- [6] **Alonso-Cristobal, P., Vilela, P., El-Sagheer, A., Lopez-Cabarcos, E., Brown, T., Muskens, O.L., Rubio-Retama, J. & Kanaras, A.G.** (2015). Highly Sensitive DNA Sensor Based on Upconversion Nanoparticles and Graphene Oxide. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 12422–12429.
- [7] **Carling, C., Nourmohammadian, F., Boyer, J. & Branda, N.R.** (2010). Remote-Control Photorelease of Caged Compounds Using Near-Infrared Light and Upconverting Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 122, 3870–3873.
- [8] **Wu, W., Yao, L., Yang, T., Yin, R., Li, F. & Yu, Y.** (2011). NIR-Light-Induced Deformation of Cross-Linked Liquid-Crystal Polymers Using Upconversion Nanophosphors. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 15810–15813.
- [9] **Chen, S., Weitemier, A.Z., Zeng, X., He, L., Wang, X., Tao, Y., Huang, A.J.Y., Hashimoto, Y., Kano, M., Iwasaki, H., Parajuli, L.K., Okabe, S., Teh, D.B.L., All, A.H., Tsutsui-Kimura, I., Tanaka, K.F., Liu, X. & McHugh, T.J.** (2018). Near-Infrared Deep Brain Stimulation via Upconversion Nanoparticle-Mediated Optogenetics. *Science*, 359, 679–684.
- [10] **Jia, H., Li, D., Zhang, D., Dong, Y., Ma, S., Zhou, M., Di, W. & Qin, W.** (2021). High Color-Purity Red, Green, and Blue-Emissive Core-Shell Upconversion Nanoparticles Using Ternary Near-Infrared Quadrature Excitations. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13, 4402–4409.
- [11] **Liu, Y., Ai, K., Liu, J., Deng, M., He, Y. & Lu, L.** (2013). Dopamine-Melanin Colloidal Nanospheres: An Efficient Near-Infrared Photothermal Therapeutic Agent for In Vivo Cancer Therapy. *Advanced Materials*, 25, 1353–1359.

- [12] **de Melo-Diogo, D., Pais-Silva, C., Dias, D.R., Moreira, A.F. & Correia, I.J.** (2017). Strategies to Improve Cancer Photothermal Therapy Mediated by Nanomaterials. *Advanced Healthcare Materials*, 6.
- [13] **Yip, H.Y.K. & Papa, A.** (2021). Signaling Pathways in Cancer: Therapeutic Targets, Combinatorial Treatments, and New Developments. *Cells*, 10, 659.
- [14] **Hanahan, D. & Weinberg, R.A.** (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646–674.
- [15] **Evan, G.I. & Vousden, K.H.** (2001). Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Cancer. *Nature*, 411, 342–348.
- [16] **Sherwood, L.M., Parris, E.E. & Folkman, J.** (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285, 1182–1186.
- [17] **Foulkes, W.D. & Shuen, A.Y.** (2013). In Brief: *BRCA1* and *BRCA2*. *The Journal of Pathology*, 230, 347–349.
- [18] **Wang, H., Guo, M., Wei, H. & Chen, Y.** (2023). Targeting P53 Pathways: Mechanisms, Structures and Advances in Therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 92.
- [19] **Weinberg, R.A.** (1983). Oncogenes and the Molecular Biology of Cancer. *The Journal of cell biology*, 97, 1661–1662.
- [20] **Vogelstein, B. & Kinzler, K.W.** (2004). Cancer Genes and the Pathways They Control. *Nature Medicine*, 10, 789–799.
- [21] **Henson, D.E. & Tarone, R.E.** (1994). Involution and the Etiology of Breast Cancer. *Cancer*, 74, 424–429.
- [22] **Pardoll, D.M.** (2012). The Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12, 252–264.
- [23] **Schreiber, R.D., Old, L.J. & Smyth, M.J.** (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331, 1565–1570.
- [24] **Alecsandru Ioan Baba and Cornel Câtoi.** (2007). Comparative Oncology. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy.
- [25] **Allemailem, K.S., Alsahli, M.A., Almatroudi, A., Alrumaihi, F., Al Abdulmonem, W., Moawad, A.A., Alwanian, W., Almansour, N.M., Rahmani, A.H. & Khan, A.A.** (2023). Innovative Strategies of Reprogramming Immune System Cells by Targeting CRISPR/Cas9-Based Genome-Editing Tools: A New Era of Cancer Management. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 18, 5531–5559.
- [26] **Truffi, M., Sorrentino, L. & Corsi, F.** (2020). Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. 15–29.
- [27] **Bussard, K.M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. & Marini, F.C.** (2016). Tumor-Associated Stromal Cells as Key Contributors to the Tumor Microenvironment. *Breast Cancer Research*, 18, 84.
- [28] **Hinshaw, D.C. & Shevde, L.A.** (2019). The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Research*, 79, 4557–4566.
- [29] **Sherwood, L.M., Parris, E.E. & Folkman, J.** (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285, 1182–1186.
- [30] **Muthukkaruppan, V.R., Kubai, L. & Auerbach, R.** (1982). Tumor-Induced Neovascularization in the Mouse Eye. *Journal of the National Cancer Institute*, 69, 699–708.
- [31] **Parangi, S., O'Reilly, M., Christofori, G., Holmgren, L., Grosfeld, J., Folkman, J. & Hanahan, D.** (1996). Antiangiogenic Therapy of Transgenic

- Mice Impairs de Novo Tumor Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 2002–2007.
- [32] **Xie, X., Zhang, Y., Li, F., Lv, T., Li, Z., Chen, H., Jia, L. & Gao, Y.** (2019). Challenges and Opportunities from Basic Cancer Biology for Nanomedicine for Targeted Drug Delivery. *Current Cancer Drug Targets*, 19, 257–276.
- [33] **Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. & Farokhzad, O.C.** (2014). Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2–25.
- [34] **Iyer, A.K., Khaled, G., Fang, J. & Maeda, H.** (2006). Exploiting the Enhanced Permeability and Retention Effect for Tumor Targeting. *Drug Discovery Today*, 11, 812–818.
- [35] **Kobayashi, H. & Brechbiel, M.** (2005). Nano-Sized MRI Contrast Agents with Dendrimer Cores. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 2271–2286.
- [36] **Hickman, S.E. & Houry, J. El.** (2010). Mechanisms of Mononuclear Phagocyte Recruitment in Alzheimers Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9, 168–173.
- [37] **van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G. & Langevoort, H.L.** (1972). The Mononuclear Phagocyte System: A New Classification of Macrophages, Monocytes, and Their Precursor Cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46, 845–52.
- [38] **Rodriguez, P.L., Harada, T., Christian, D.A., Pantano, D.A., Tsai, R.K. & Discher, D.E.** (2013). Minimal “Self” Peptides That Inhibit Phagocytic Clearance and Enhance Delivery of Nanoparticles. *Science*, 339, 971–975.
- [39] **Ikeda-Imafuku, M., Wang, L.L.-W., Rodrigues, D., Shaha, S., Zhao, Z. & Mitragotri, S.** (2022). Strategies to Improve the EPR Effect: A Mechanistic Perspective and Clinical Translation. *Journal of Controlled Release*, 345, 512–536.
- [40] **Cheng, J., Teply, B., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F., Levynissenbaum, E., Radovicmoreno, A., Langer, R. & Farokhzad, O.** (2007). Formulation of Functionalized PLGA–PEG Nanoparticles for in Vivo Targeted Drug Delivery. *Biomaterials*, 28, 869–876.
- [41] **Parveen, S. & Sahoo, S.K.** (2011). Long Circulating Chitosan/PEG Blended PLGA Nanoparticle for Tumor Drug Delivery. *European Journal of Pharmacology*, 670, 372–383.
- [42] **Peng, M., Li, H., Luo, Z., Kong, J., Wan, Y., Zheng, L., Zhang, Q., Niu, H., Vermorken, A., Van de Ven, W., Chen, C., Zhang, X., Li, F., Guo, L. & Cui, Y.** (2015). Dextran-Coated Superparamagnetic Nanoparticles as Potential Cancer Drug Carriers in Vivo. *Nanoscale*, 7, 11155–11162.
- [43] **Khalkhali, M., Sadighian, S., Rostamizadeh, K., Khoeni, F., Naghibi, M., Bayat, N., Habibizadeh, M. & Hamidi, M.** (2017). Synthesis and Characterization of Dextran Coated Magnetite Nanoparticles for Diagnostics and Therapy. *BioImpacts*, 5, 141–150.
- [44] **Fu, C.-P., Cai, X.-Y., Chen, S.-L., Yu, H.-W., Fang, Y., Feng, X.-C., Zhang, L.-M. & Li, C.-Y.** (2023). Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers for Anticancer Drug Delivery. *Polymers*, 15, 2317.
- [45] **Chen, Z., Li, Z., Lin, Y., Yin, M., Ren, J. & Qu, X.** (2013). Bioresponsive Hyaluronic Acid-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *Chemistry – A European Journal*, 19, 1778–1783.
- [46] **Mikušová, V. & Mikuš, P.** (2021). Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 9652.

- [47] **Hyun, H., Park, J., Willis, K., Park, J.E., Lyle, L.T., Lee, W. & Yeo, Y.** (2018). Surface Modification of Polymer Nanoparticles with Native Albumin for Enhancing Drug Delivery to Solid Tumors. *Biomaterials*, 180, 206–224.
- [48] **Iqbal, H., Razzaq, A., Khan, N.U., Rehman, S.U., Webster, T.J., Xiao, R. & Mena, F.** (2022). PH-Responsive Albumin-Coated Biopolymeric Nanoparticles with Lapatinab for Targeted Breast Cancer Therapy. *Biomaterials Advances*, 139, 213039.
- [49] **Hung, R.W.Y. & Chow, A.W.** (1997). Apoptosis: Molecular Mechanisms, Regulation and Role in Pathogenesis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 8, 103–109.
- [50] **Pfeffer, C. & Singh, A.** (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 448.
- [51] **Zaman, S., Wang, R. & Gandhi, V.** (2014). Targeting the Apoptosis Pathway in Hematologic Malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 55, 1980–1992.
- [52] **Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J.** (2004). Cell Death. *Cell*, 116, 205–219.
- [53] **Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C.** (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87, 99–163.
- [54] **Lopez, J. & Tait, S.W.G.** (2015). Mitochondrial Apoptosis: Killing Cancer Using the Enemy Within. *British Journal of Cancer*, 112, 957–962.
- [55] **Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J.M.** (2014). Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 49–63.
- [56] **Gowda Saralamma, V.V., Lee, H.J., Raha, S., Lee, W.S., Kim, E.H., Lee, S.J., Heo, J.D., Won, C., Kang, C.K. & Kim, G.S.** (2018). Inhibition of IAP's and Activation of P53 Leads to Caspase-Dependent Apoptosis in Gastric Cancer Cells Treated with Scutellarein. *Oncotarget*, 9, 5993–6006.
- [57] **Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y. & Sakuragi, N.** (2014). Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *BioMed Research International*, 2014, 1–23.
- [58] **Pfeffer, C. & Singh, A.** (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 448.
- [59] **Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. & Cardoso, F.** (2019). Breast Cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5, 66.
- [60] **Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I. & Jemal, A.** (2024). Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74, 229–263.
- [61] **Gram, I.T., Park, S.-Y., Kolonel, L.N., Maskarinec, G., Wilkens, L.R., Henderson, B.E. & Le Marchand, L.** (2015). Smoking and Risk of Breast Cancer in a Racially/Ethnically Diverse Population of Mainly Women Who Do Not Drink Alcohol. *American Journal of Epidemiology*, 182, 917–925.
- [62] **Chen, W.Y., Rosner, B., Hankinson, S.E., Colditz, G.A. & Willett, W.C.** (2011). Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk. *JAMA*, 306, 1884.
- [63] **Ritte, R., Lukanova, A., Tjønneland, A., Olsen, A., Overvad, K., Mesrine, S., Fagherazzi, G., Dossus, L., Teucher, B., Steindorf, K., Boeing, H., Aleksandrova, K., Trichopoulou, A., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Palli, D., Grioni, S., Mattiello, A., Tumino, R., Sacerdote, C., Quirós, J.R., Buckland, G., Molina-Montes, E., Chirilaque, M., Ardanaz, E., Amiano, P., Bueno-de-**

- Mesquita, B., van Duijnhoven, F., van Gils, C.H., Peeters, P.H., Wareham, N., Khaw, K., Key, T.J., Travis, R.C., Krum-Hansen, S., Gram, I.T., Lund, E., Sund, M., Andersson, A., Romieu, I., Rinaldi, S., McCormack, V., Riboli, E. & Kaaks, R. (2013). Height, Age at Menarche and Risk of Hormone Receptor-positive and -negative Breast Cancer: A Cohort Study. *International Journal of Cancer*, 132, 2619–2629.
- [64] (2012). Menarche, Menopause, and Breast Cancer Risk: Individual Participant Meta-Analysis, Including 118 964 Women with Breast Cancer from 117 Epidemiological Studies. *The Lancet Oncology*, 13, 1141–1151.
- [65] Pizot, C., Boniol, M., Mullie, P., Koechlin, A., Boniol, M., Boyle, P. & Autier, P. (2016). Physical Activity, Hormone Replacement Therapy and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Prospective Studies. *European Journal of Cancer*, 52, 138–154.
- [66] Manson, J.E., Chlebowski, R.T., Stefanick, M.L., Aragaki, A.K., Rossouw, J.E., Prentice, R.L., Anderson, G., Howard, B. V., Thomson, C.A., LaCroix, A.Z., Wactawski-Wende, J., Jackson, R.D., Limacher, M., Margolis, K.L., Wassertheil-Smoller, S., Beresford, S.A., Cauley, J.A., Eaton, C.B., Gass, M., Hsia, J., Johnson, K.C., Kooperberg, C., Kuller, L.H., Lewis, C.E., Liu, S., Martin, L.W., Ockene, J.K., O’Sullivan, M.J., Powell, L.H., Simon, M.S., Van Horn, L., Vitolins, M.Z. & Wallace, R.B. (2013). Menopausal Hormone Therapy and Health Outcomes During the Intervention and Extended Poststopping Phases of the Women’s Health Initiative Randomized Trials. *JAMA*, 310, 1353.
- [67] Fortner, R.T., Sisti, J., Chai, B., Collins, L.C., Rosner, B., Hankinson, S.E., Tamimi, R.M. & Eliassen, A.H. (2019). Parity, Breastfeeding, and Breast Cancer Risk by Hormone Receptor Status and Molecular Phenotype: Results from the Nurses’ Health Studies. *Breast Cancer Research*, 21, 40.
- [68] Wellings, E., Vassiliades, L. & Abdalla, R. (2016). Breast Cancer Screening for High-Risk Patients of Different Ages and Risk - Which Modality Is Most Effective? *Cureus*.
- [69] Ozmen, N., Dapp, R., Zapf, M., Gemmeke, H., Ruiter, N. V. & van Dongen, K.W.A. (2015). Comparing Different Ultrasound Imaging Methods for Breast Cancer Detection. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 62, 637–646.
- [70] Alcantara, D., Leal, M.P., García-Bocanegra, I. & García-Martín, M.L. (2014). Molecular Imaging of Breast Cancer: Present and Future Directions. *Frontiers in Chemistry*, 2.
- [71] Mann, R.M., Kuhl, C.K., Kinkel, K. & Boetes, C. (2008). Breast MRI: Guidelines from the European Society of Breast Imaging. *European Radiology*, 18, 1307–1318.
- [72] Sardanelli, F., Boetes, C., Borisch, B., Decker, T., Federico, M., Gilbert, F.J., Helbich, T., Heywang-K obrunner, S.H., Kaiser, W.A., Kerin, M.J., Mansel, R.E., Marotti, L., Martincich, L., Mauriac, L., Meijers-Heijboer, H., Orecchia, R., Panizza, P., Ponti, A., Purushotham, A.D., Regitnig, P., Del Turco, M.R., Thibault, F. & Wilson, R. (2010). Magnetic Resonance Imaging of the Breast: Recommendations from the EUSOMA Working Group. *European Journal of Cancer*, 46, 1296–1316.
- [73] Bénard, F. & Turcotte,  . (2005). Imaging in Breast Cancer: Single-Photon Computed Tomography and Positron-Emission Tomography. *Breast Cancer Research*, 7, 153.

- [74] **Histed, S.N., Lindenberg, M.L., Mena, E., Turkbey, B., Choyke, P.L. & Kurdziel, K.A.** (2012). Review of Functional/Anatomical Imaging in Oncology. *Nuclear Medicine Communications*, 33, 349–361.
- [75] **Shaath, H., Elango, R. & Alajez, N.M.** (2021). Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (LncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic LncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, 13, 5350.
- [76] **Hicks, D.G. & Lester, S.C.** (2016). Hormone Receptors (ER/PR). *Diagnostic Pathology: Breast*, Elsevier, 430–439.
- [77] **Miah, S., Bagu, E., Goel, R., Ogunbolude, Y., Dai, C., Ward, A., Vizeacoumar, F.S., Davies, G., Vizeacoumar, F.J., Anderson, D. & Lukong, K.E.** (2019). Estrogen Receptor Signaling Regulates the Expression of the Breast Tumor Kinase in Breast Cancer Cells. *BMC Cancer*, 19, 78.
- [78] **Nicolini, A., Ferrari, P. & Duffy, M.J.** (2018). Prognostic and Predictive Biomarkers in Breast Cancer: Past, Present and Future. *Seminars in Cancer Biology*, 52, 56–73.
- [79] **Vaz-Luis, I., Winer, E.P. & Lin, N.U.** (2013). Human Epidermal Growth Factor Receptor-2-Positive Breast Cancer: Does Estrogen Receptor Status Define Two Distinct Subtypes? *Annals of Oncology*, 24, 283–291.
- [80] **Krishnamurti, U., Hammers, J.L., Atem, F.D., Storto, P.D. & Silverman, J.F.** (2009). Poor Prognostic Significance of Unamplified Chromosome 17 Polysomy in Invasive Breast Carcinoma. *Modern Pathology*, 22, 1044–1048.
- [81] **Duffy, M.J., Harbeck, N., Nap, M., Molina, R., Nicolini, A., Senkus, E. & Cardoso, F.** (2017). Clinical Use of Biomarkers in Breast Cancer: Updated Guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *European Journal of Cancer*, 75, 284–298.
- [82] **Kurozumi, S., Yamaguchi, Y., Kurosumi, M., Ohira, M., Matsumoto, H. & Horiguchi, J.** (2017). Recent Trends in MicroRNA Research into Breast Cancer with Particular Focus on the Associations between MicroRNAs and Intrinsic Subtypes. *Journal of Human Genetics*, 62, 15–24.
- [83] **Wang, J. & Wu, S.-G.** (2023). Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, Volume 15, 721–730.
- [84] **Miglietta, F., Bottosso, M., Griguolo, G., Dieci, M.V. & Guarneri, V.** (2022). Major Advancements in Metastatic Breast Cancer Treatment: When Expanding Options Means Prolonging Survival. *ESMO Open*, 7, 100409.
- [85] **Schnitt, S.J., Moran, M.S. & Giuliano, A.E.** (2020). Lumpectomy Margins for Invasive Breast Cancer and Ductal Carcinoma in Situ: Current Guideline Recommendations, Their Implications, and Impact. *Journal of Clinical Oncology*, 38, 2240–2245.
- [86] **Papadimitriou, K., Ardavanis, A. & Kountourakis, P.** (2010). Neoadjuvant Therapy for Locally Advanced Breast Cancer: Focus on Chemotherapy and Biological Targeted Treatments' Armamentarium. *Journal of thoracic disease*, 2, 160–70.
- [87] **Dhankhar, R., Vyas, S.P., Jain, A.K., Arora, S., Rath, G. & Goyal, A.K.** (2010). Advances in Novel Drug Delivery Strategies for Breast Cancer Therapy. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 38, 230–249.
- [88] **Fisher, B., Anderson, S., Bryant, J., Margolese, R.G., Deutsch, M., Fisher, E.R., Jeong, J.-H. & Wolmark, N.** (2002). Twenty-Year Follow-up of a Randomized Trial Comparing Total Mastectomy, Lumpectomy, and

- Lumpectomy plus Irradiation for the Treatment of Invasive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 347, 1233–1241.
- [89] **Akram, M. & Siddiqui, S.** (2012). Breast Cancer Management: Past, Present and Evolving. *Indian Journal of Cancer*, 49, 277.
- [90] **Wengström, Y., Häggmark, C., Strander, H. & Forsberg, C.** (2000). Perceived Symptoms and Quality of Life in Women with Breast Cancer Receiving Radiation Therapy. *European Journal of Oncology Nursing*, 4, 78–88.
- [91] **Lind, P.A.R.M., Gagliardi, G., Wennberg, B. & Fornander, T.** (1997). A Descriptive Study of Pulmonary Complications After Postoperative Radiation Therapy in Node-Positive Stage II Breast Cancer. *Acta Oncologica*, 36, 509–515.
- [92] **Shapiro, C.L. & Recht, A.** (2001). Side Effects of Adjuvant Treatment of Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 344, 1997–2008.
- [93] **Dickens, E. & Ahmed, S.** (2018). Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, 36, 134–138.
- [94] **Conklin, K.A.** (2000). Dietary Antioxidants During Cancer Chemotherapy: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side Effects. *Nutrition and Cancer*, 37, 1–18.
- [95] **Alam, A.** (2018). Chemotherapy Treatment and Strategy Schemes: A Review. *Open Access Journal of Toxicology*, 2.
- [96] **Amjad, M.T., Chidharla, A. & Kasi, A.** (2024). Cancer Chemotherapy.
- [97] **Fouquier, J. & Guedj, M.** (2015). Analysis of Drug Combinations: Current Methodological Landscape. *Pharmacology Research & Perspectives*, 3.
- [98] **Bonadonna, G., Brusamolino, E., Valagussa, P., Rossi, A., Brugnatelli, L., Brambilla, C., De Lena, M., Tancini, G., Bajetta, E., Musumeci, R. & Veronesi, U.** (1976). Combination Chemotherapy as an Adjuvant Treatment in Operable Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 294, 405–410.
- [99] **Fisher, B., Redmond, C., Wickerham, D.L., Bowman, D., Schipper, H., Wolmark, N., Sass, R., Fisher, E.R., Jochimsen, P. & Legault-Poisson, S.** (1989). Doxorubicin-Containing Regimens for the Treatment of Stage II Breast Cancer: The National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. *Journal of Clinical Oncology*, 7, 572–582.
- [100] **Hortobagyi, G.N., Blumenschein, G.R., Spanos, W., Montague, E.D., Buzdar, A.U., Yap, H.-Y. & Schell, F.** (1983). Multimodal Treatment of Locoregionally Advanced Breast Cancer. *Cancer*, 51, 763–768.
- [101] **French Epirubicin Study Group.** (1988). A Prospective Randomized Phase III Trial Comparing Combination Chemotherapy with Cyclophosphamide, Fluorouracil, and Either Doxorubicin or Epirubicin. *Journal of Clinical Oncology*, 6, 679–688.
- [102] **French Adjuvant Study Group.** (2001). Benefit of a high-dose epirubicin regimen in adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer patients with poor prognostic factors: 5-year follow-up results of French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 19(3), 602-611.
- [103] **Creagan, E.T., Green, S.J., Ahmann, D.L., Ingle, J.N., Edmonson, J.H. & Marschke, R.F.** (1984). A Phase III Clinical Trial Comparing the Combination Cyclophosphamide, Adriamycin, Cisplatin with Cyclophosphamide, 5-Fluorouracil, Prednisone in Patients with Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2, 1260–1265.

- [104] **Saphner, T., Tormey, D.C. & Albertini, M.** (1991). Continuous Infusion 5-Fluorouracil with Escalating Doses of Intermittent Cisplatin and Etoposide. A Phase I Study. *Cancer*, 68, 2359–2362.
- [105] **Trump, D.L., Ettinger, D.S. & Abeloff, M.D.** (1981). Doxorubicin, Vincristine, and Cis-diamminedichloroplatinum (II) Therapy in Patients with Advanced Breast Cancer. *Medical and Pediatric Oncology*, 9, 1–3.
- [106] **Martoni, A., Tomasi, L., Farabegoli, G., Giovannini, M., Monetti, N., Ganzina, F. & Pannuti, F.** (1984). A Phase II Study of 4'-Epi-Doxorubicin plus Cis-Platinum in Advanced Solid Tumors. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 20, 11–17.
- [107] **Bonneterre, J., Dieras, V., Tubiana-Hulin, M., Bougnoux, P., Bonneterre, M.-E., Delozier, T., Mayer, F., Culine, S., Dohoulou, N. & Bendahmane, B.** (2004). Phase II Multicentre Randomised Study of Docetaxel plus Epirubicin vs 5-Fluorouracil plus Epirubicin and Cyclophosphamide in Metastatic Breast Cancer. *British Journal of Cancer*, 91, 1466–1471.
- [108] **Hortobagyi, G.N.** (1997). Paclitaxel-Based Combination Chemotherapy for Breast Cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 11, 29–37.
- [109] **Gianni, L., Munzone, E., Capri, G., Fulfaro, F., Tarenzi, E., Villani, F., Spreafico, C., Laffranchi, A., Caraceni, A. & Martini, C.** (1995). Paclitaxel by 3-Hour Infusion in Combination with Bolus Doxorubicin in Women with Untreated Metastatic Breast Cancer: High Antitumor Efficacy and Cardiac Effects in a Dose-Finding and Sequence-Finding Study. *Journal of Clinical Oncology*, 13, 2688–2699.
- [110] **Sparano, J.A.** (1999). Doxorubicin/Taxane Combinations: Cardiac Toxicity and Pharmacokinetics. *Seminars in oncology*, 26, 14–9.
- [111] **Anampa, J., Makower, D. & Sparano, J.A.** (2015). Progress in Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: An Overview. *BMC Medicine*, 13, 195.
- [112] **Gradishar, W.J., Moran, M.S., Abraham, J., Aft, R., Agnese, D., Allison, K.H., Anderson, B., Burstein, H.J., Chew, H., Dang, C., Elias, A.D., Giordano, S.H., Goetz, M.P., Goldstein, L.J., Hurvitz, S.A., Isakoff, S.J., Jankowitz, R.C., Javid, S.H., Krishnamurthy, J., Leitch, M., Lyons, J., Mortimer, J., Patel, S.A., Pierce, L.J., Rosenberger, L.H., Rugo, H.S., Sitapati, A., Smith, K.L., Smith, M. Lou, Soliman, H., Stringer-Reasor, E.M., Telli, M.L., Ward, J.H., Wisinski, K.B., Young, J.S., Burns, J. & Kumar, R.** (2022). Breast Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 20, 691–722.
- [113] **Francis, P.A., Pagani, O., Fleming, G.F., Walley, B.A., Colleoni, M., Láng, I., Gómez, H.L., Tondini, C., Ciruelos, E., Burstein, H.J., Bonnefoi, H.R., Bellet, M., Martino, S., Geyer, C.E., Goetz, M.P., Stearns, V., Pinotti, G., Puglisi, F., Spazzapan, S., Climent, M.A., Pavesi, L., Ruhstaller, T., Davidson, N.E., Coleman, R., Debled, M., Buchholz, S., Ingle, J.N., Winer, E.P., Maibach, R., Rabaglio-Poretti, M., Ruepp, B., Di Leo, A., Coates, A.S., Gelber, R.D., Goldhirsch, A. & Regan, M.M.** (2018). Tailoring Adjuvant Endocrine Therapy for Premenopausal Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 379, 122–137.
- [114] **Emens, L.A.** (2018). Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clinical Cancer Research*, 24, 511–520.
- [115] **Ribas, A. & Wolchok, J.D.** (2018). Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade. *Science*, 359, 1350–1355.

- [116] **Paucek, R.D., Baltimore, D. & Li, G.** (2019). The Cellular Immunotherapy Revolution: Arming the Immune System for Precision Therapy. *Trends in Immunology*, 40, 292–309.
- [117] **Dvir, K., Giordano, S. & Leone, J.P.** (2024). Immunotherapy in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 7517.
- [118] **Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L.** (1987). Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/ *Neu* Oncogene. *Science*, 235, 177–182.
- [119] **Gutierrez, C. & Schiff, R.** (2011). HER2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135, 55–62.
- [120] **Tovey, S.M., Witton, C.J., Bartlett, J.M., Stanton, P.D., Reeves, J.R. & Cooke, T.G.** (2004). Outcome and Human Epithelial Growth Factor Receptor (HER) 1-4 Status in Invasive Breast Carcinomas with Proliferation Indices Evaluated Using Bromodeoxyuridine (BrdU) Labelling. *Breast Cancer Research*, 6, R246.
- [121] **Capelan, M., Pugliano, L., De Azambuja, E., Bozovic, I., Saini, K.S., Sotiriou, C., Loi, S. & Piccart-Gebhart, M.J.** (2013). Pertuzumab: New Hope for Patients with HER2-Positive Breast Cancer. *Annals of Oncology*, 24, 273–282.
- [122] **Rabindran, S.K., Discafani, C.M., Rosfjord, E.C., Baxter, M., Floyd, M.B., Golas, J., Hallett, W.A., Johnson, B.D., Nilakantan, R., Overbeek, E., Reich, M.F., Shen, R., Shi, X., Tsou, H.-R., Wang, Y.-F. & Wissner, A.** (2004). Antitumor Activity of HKI-272, an Orally Active, Irreversible Inhibitor of the HER-2 Tyrosine Kinase. *Cancer Research*, 64, 3958–3965.
- [123] **Swain, S.M., Baselga, J., Kim, S.-B., Ro, J., Semiglazov, V., Campone, M., Ciruelos, E., Ferrero, J.-M., Schneeweiss, A., Heeson, S., Clark, E., Ross, G., Benyunes, M.C. & Cortés, J.** (2015). Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372, 724–734.
- [124] **Figueroa-Magalhães, M.C., Jelovac, D., Connolly, R.M. & Wolff, A.C.** (2014). Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *The Breast*, 23, 128–136.
- [125] **Demetzos, C. & Pippa, N.** (2014). Advanced Drug Delivery Nanosystems (ADDnSs): A Mini-Review. *Drug Delivery*, 21, 250–257.
- [126] **Rashid, Z.** (2020). PH-Responsive Microgels: Promising Carriers for Controlled Drug Delivery. *Pharmaceutical Formulation Design - Recent Practices*, IntechOpen.
- [127] **Haider, M., Zaki, K.Z., El Hamshary, M.R., Hussain, Z., Orive, G. & Ibrahim, H.O.** (2022). Polymeric Nanocarriers: A Promising Tool for Early Diagnosis and Efficient Treatment of Colorectal Cancer. *Journal of Advanced Research*, 39, 237–255.
- [128] **Abasian, P., Ghanavati, S., Rahebi, S., Nouri Khorasani, S. & Khalili, S.** (2020). Polymeric Nanocarriers in Targeted Drug Delivery Systems: A Review. *Polymers for Advanced Technologies*, 31, 2939–2954.
- [129] **Rizvi, S.A.A. & Saleh, A.M.** (2018). Applications of Nanoparticle Systems in Drug Delivery Technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26, 64–70.
- [130] **Deirram, N., Zhang, C., Kermaniyan, S.S., Johnston, A.P.R. & Such, G.K.** (2019). PH-Responsive Polymer Nanoparticles for Drug Delivery. *Macromolecular Rapid Communications*, 40.

- [131] **Alsehli, M.** (2020). Polymeric Nanocarriers as Stimuli-Responsive Systems for Targeted Tumor (Cancer) Therapy: Recent Advances in Drug Delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28, 255–265.
- [132] **Das, S.S., Bharadwaj, P., Bilal, M., Barani, M., Rahdar, A., Taboada, P., Bungau, S. & Kyzas, G.Z.** (2020). Stimuli-Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery, Imaging, and Theragnosis. *Polymers*, 12, 1397.
- [133] **Koçak, G., Tuncer, C. & Bütün, V.** (2020). Stimuli-Responsive Polymers Providing New Opportunities for Various Applications. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48, 527–574.
- [134] **Zhuo, S., Zhang, F., Yu, J., Zhang, X., Yang, G. & Liu, X.** (2020). PH-Sensitive Biomaterials for Drug Delivery. *Molecules*, 25, 5649.
- [135] **Shi, P., Cheng, Z., Zhao, K., Chen, Y., Zhang, A., Gan, W. & Zhang, Y.** (2023). Active Targeting Schemes for Nano-Drug Delivery Systems in Osteosarcoma Therapeutics. *Journal of Nanobiotechnology*, 21, 103.
- [136] **Yu, Z., Ni, M., Xiong, M., Zhang, X., Cai, G., Chen, H. & Zeng, Q.** (2015). Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanoparticles Conjugated with CD133 Aptamers for Targeted Salinomycin Delivery to CD133+ Osteosarcoma Cancer Stem Cells. *International Journal of Nanomedicine*, 2537.
- [137] **Ai, J., Liu, B. & Liu, W.** (2017). Folic Acid-Tagged Titanium Dioxide Nanoparticles for Enhanced Anticancer Effect in Osteosarcoma Cells. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 1181–1187.
- [138] **Calzoni, E., Cesaretti, A., Polchi, A., Di Michele, A., Tancini, B. & Emiliani, C.** (2019). Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. *Journal of Functional Biomaterials*, 10, 4.
- [139] **Fathi, M. & Barar, J.** (2017). Perspective Highlights on Biodegradable Polymeric Nanosystems for Targeted Therapy of Solid Tumors. *BioImpacts*, 7, 49–57.
- [140] **Hossen, S., Hossain, M.K., Basher, M.K., Mia, M.N.H., Rahman, M.T. & Uddin, M.J.** (2019). Smart Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy and Toxicity Studies: A Review. *Journal of Advanced Research*, 15, 1–18.
- [141] **Allen, T.M.** (2002). Ligand-Targeted Therapeutics in Anticancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2, 750–763.
- [142] **Guo, X., Wang, L., Wei, X. & Zhou, S.** (2016). Polymer-Based Drug Delivery Systems for Cancer Treatment. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 54, 3525–3550.
- [143] **Makadia, H.K. & Siegel, S.J.** (2011). Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3, 1377–1397.
- [144] **Brunella, T., Giovanni, T., Barbara, B., Diego, D., Alessandro, M., Eleonora, D.M., Lorena, U., Barbara, R., Flavio, F., Carla, E., Angela, V.M. & Maria, S.G.** (2015). Use of Polylactide-Co-Glycolide-Nanoparticles for Lysosomal Delivery of a Therapeutic Enzyme in Glycogenesis Type II Fibroblasts. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15, 2657–2666.
- [145] **Gopalsatheeskumar, K., Komala, S. & Mahalakshmi, M.** (2017). An Overview on Polymeric Nanoparticles Used in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Pharmatutor*, 5, 40.
- [146] **Nagarwal, R.C., Kant, S., Singh, P.N., Maiti, P. & Pandit, J.K.** (2009). Polymeric Nanoparticulate System: A Potential Approach for Ocular Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, 136, 2–13.

- [147] **C. Tuba; HASCİCEK, S.-T.** (2009). Polimerik Nanopartikuler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Yüzey Modifikasyonu. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 38, 137–154.
- [148] **Park, J., Fong, P.M., Lu, J., Russell, K.S., Booth, C.J., Saltzman, W.M. & Fahmy, T.M.** (2009). PEGylated PLGA Nanoparticles for the Improved Delivery of Doxorubicin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5, 410–418.
- [149] **Kong, N., Deng, M., Sun, X.-N., Chen, Y.-D. & Sui, X.-B.** (2018). Polydopamine-Functionalized CA-(PCL-Ran-PLA) Nanoparticles for Target Delivery of Docetaxel and Chemo-Photothermal Therapy of Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- [150] **Billiet, L., Fournier, D. & Du Prez, F.** (2009). Step-Growth Polymerization and ‘Click’ Chemistry: The Oldest Polymers Rejuvenated. *Polymer*, 50, 3877–3886.
- [151] **Fakirov, S.** (2019). Condensation Polymers: Their Chemical Peculiarities Offer Great Opportunities. *Progress in Polymer Science*, 89, 1–18.
- [152] **Bhatia, S.K., Bhatia, R.K. & Yang, Y.-H.** (2016). Biosynthesis of Polyesters and Polyamide Building Blocks Using Microbial Fermentation and Biotransformation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 639–663.
- [153] **Wang, M., Guo, L. & Sun, H.** (2019). Manufacture of Biomaterials. *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, Elsevier, 116–134.
- [154] **McKeen, L.W.** (2014). Introduction to Plastics and Polymers. The Effect of Long Term Thermal Exposure on Plastics and Elastomers, Elsevier, 1–16.
- [155] **Hageman, H.J.** (1985). Photoinitiators for Free Radical Polymerization. *Progress in Organic Coatings*, 13, 123–150.
- [156] **Tajau, R., Ibrahim, M.I., Yunus, N.M., Mahmood, M.H., Salleh, M.Z. & Salleh, N.G.N.** (2014). Development of Palm Oil-Based UV-Curable Epoxy Acrylate and Urethane Acrylate Resins for Wood Coating Application. 164–169.
- [157] **Obi, B.E.** (2018). Polymer Chemistry and Synthesis. Polymeric Foams Structure-Property-Performance, Elsevier, 17–40.
- [158] **Pearce, H.A., Kim, Y.S., Diaz-Gomez, L. & Mikos, A.G.** (2020). Tissue Engineering Scaffolds. *Biomaterials Science*, Elsevier, 1317–1334.
- [159] **Zhu, S. & Hamielec, A.** (2012). Polymerization Kinetic Modeling and Macromolecular Reaction Engineering. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, 779–831.
- [160] **Matyjaszewski, K. & Spanswick, J.** (2005). Controlled/Living Radical Polymerization. *Materials Today*, 8, 26–33.
- [161] **Matyjaszewski, K.** (1995). Introduction to Living Polymeriz. Living and/or Controlled Polymerization. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 8, 197–207.
- [162] **Percec, V. & Tirrell, D.A.** (2000). Living or Controlled? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 38, 1705–1705.
- [163] **Patten, T.E. & Matyjaszewski, K.** (1998). Atom Transfer Radical Polymerization and the Synthesis of Polymeric Materials. *Advanced Materials*, 10, 901–915.
- [164] **Greszta, D., Mardare, D. & Matyjaszewski, K.** (1994). “Living” Radical Polymerization. 1. Possibilities and Limitations. *Macromolecules*, 27, 638–644.

- [165] **Matyjaszewski, K., Gaynor, S., Greszta, D., Mardare, D. & Shigemoto, T.** (1995). Synthesis of Well Defined Polymers by Controlled Radical Polymerization. *Macromolecular Symposia*, 98, 73–89.
- [166] **Kato, M., Kamigaito, M., Sawamoto, M. & Higashimura, T.** (1995). Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(Triphenylphosphine)Ruthenium(II)/Methylaluminum Bis(2,6-Di-Tert-Butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization. *Macromolecules*, 28, 1721–1723.
- [167] **Percec, V. & Barboiu, B.** (1995). “Living” Radical Polymerization of Styrene Initiated by Arenesulfonyl Chlorides and CuI(Bpy)NCl. *Macromolecules*, 28, 7970–7972.
- [168] **Uegaki, H., Kotani, Y., Kamigaito, M. & Sawamoto, M.** (1997). Nickel-Mediated Living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate. *Macromolecules*, 30, 2249–2253.
- [169] **Matyjaszewski, K., Wei, M., Xia, J. & McDermott, N.E.** (1997). Controlled/“Living” Radical Polymerization of Styrene and Methyl Methacrylate Catalyzed by Iron Complexes. *Macromolecules*, 30, 8161–8164.
- [170] **Becer, C.R., Hoogenboom, R., Fournier, D. & Schubert, U.S.** (2007). Cu(II)-Mediated ATRP of MMA by Using a Novel Tetradentate Amine Ligand with Oligo(Ethylene Glycol) Pendant Groups. *Macromolecular Rapid Communications*, 28, 1161–1166.
- [171] **Simal, F., Demonceau, A. & Noels, A.F.** (1999). Kharasch Addition and Controlled Atom Transfer Radical Polymerisation (ATRP) of Vinyl Monomers Catalysed by Grubbs’ Ruthenium-carbene Complexes. *Tetrahedron Letters*, 40, 5689–5693.
- [172] **Gonçalves, S. de Á. & Vieira, R.P.** (2020). Current Status of ATRP-Based Materials for Gene Therapy. *Reactive and Functional Polymers*, 147, 104453.
- [173] **Moad, G., Rizzardo, E. & Solomon, D.H.** (1982). Selectivity of the Reaction of Free Radicals with Styrene. *Macromolecules*, 15, 909–914.
- [174] **Georges, M.K., Veregin, R.P.N., Kazmaier, P.M. & Hamer, G.K.** (1993). Narrow Molecular Weight Resins by a Free-Radical Polymerization Process. *Macromolecules*, 26, 2987–2988.
- [175] **Grubbs, R.B.** (2011). Nitroxide-Mediated Radical Polymerization: Limitations and Versatility. *Polymer Reviews*, 51, 104–137.
- [176] **Nicolas, J., Guillaneuf, Y., Lefay, C., Bertin, D., Gimes, D. & Charleux, B.** (2013). Nitroxide-Mediated Polymerization. *Progress in Polymer Science*, 38, 63–235.
- [177] **Hawker, C.J., Bosman, A.W. & Harth, E.** (2001). New Polymer Synthesis by Nitroxide Mediated Living Radical Polymerizations. *Chemical Reviews*, 101, 3661–3688.
- [178] **Chiefari, J., Chong, Y.K. (Bill), Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T.P.T., Mayadunne, R.T.A., Meijs, G.F., Moad, C.L., Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S.H.** (1998). Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules*, 31, 5559–5562.
- [179] **Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S.H.** (2006). Living Radical Polymerization by the RAFT Process—A First Update. *Australian Journal of Chemistry*, 59, 669.

- [180] **Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S.H.** (2009). Living Radical Polymerization by the RAFT Process - A Second Update. *Australian Journal of Chemistry*, 62, 1402.
- [181] **Semsarilar, M. & Abetz, V.** (2021). Polymerizations by RAFT: Developments of the Technique and Its Application in the Synthesis of Tailored (Co)Polymers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 222.
- [182] **Perrier, S., Barner-Kowollik, C., Quinn, J.F., Vana, P. & Davis, T.P.** (2002). Origin of Inhibition Effects in the Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization of Methyl Acrylate. *Macromolecules*, 35, 8300–8306.
- [183] **Wan, D., Satoh, K., Kamigaito, M. & Okamoto, Y.** (2005). Xanthate-Mediated Radical Polymerization of *N*-Vinylpyrrolidone in Fluoroalcohols for Simultaneous Control of Molecular Weight and Tacticity. *Macromolecules*, 38, 10397–10405.
- [184] **Shi, L., Chapman, T.M. & Beckman, E.J.** (2003). Poly(Ethylene Glycol)-Block -Poly(*N*-Vinylformamide) Copolymers Synthesized by the RAFT Methodology. *Macromolecules*, 36, 2563–2567.
- [185] **Chong, Y. K., Krstina, J., Le, T.P.T., Moad, G., Postma, A., Rizzardo, E. & Thang, S.H.** (2003). Thiocarbonylthio Compounds [SC(Ph)S-R] in Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization). Role of the Free-Radical Leaving Group (R). *Macromolecules*, 36, 2256–2272.
- [186] **Mayadunne, R.T.A., Rizzardo, E., Chiefari, J., Chong, Y.K., Moad, G. & Thang, S.H.** (1999). Living Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT Polymerization) Using Dithiocarbamates as Chain Transfer Agents. *Macromolecules*, 32, 6977–6980.
- [187] **Tsujii, Y., Ejaz, M., Sato, K., Goto, A. & Fukuda, T.** (2001). Mechanism and Kinetics of RAFT-Mediated Graft Polymerization of Styrene on a Solid Surface. 1. Experimental Evidence of Surface Radical Migration. *Macromolecules*, 34, 8872–8878.
- [188] **Carter, S., Hunt, B. & Rimmer, S.** (2005). Highly Branched Poly(*N*-Isopropylacrylamide)s with Imidazole End Groups Prepared by Radical Polymerization in the Presence of a Styryl Monomer Containing a Dithioester Group. *Macromolecules*, 38, 4595–4603.
- [189] **Vogt, A.P., Gondi, S.R. & Sumerlin, B.S.** (2007). Hyperbranched Polymers via RAFT Copolymerization of an Acryloyl Trithiocarbonate. *Australian Journal of Chemistry*, 60, 396.
- [190] **Nuyken, O. & Pask, S.** (2013). Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review. *Polymers*, 5, 361–403.
- [191] **Koltzenburg, S., Maskos, M. & Nuyken, O.** (2017). Ring-Opening Polymerization. *Polymer Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 321–347.
- [192] **Young, R.J. & Lovell, P.A.** (2011). Introduction to Polymers. CRC Press.
- [193] **Gross, R.A., Ganesh, M. & Lu, W.** (2010). Enzyme-Catalysis Breathes New Life into Polyester Condensation Polymerizations. *Trends in Biotechnology*, 28, 435–443.
- [194] **van Hest, J.C.M. & Tirrell, D.A.** (2001). Protein-Based Materials, toward a New Level of Structural Control. *Chemical Communications*, 1897–1904.

- [195] **Cha, J.N., Stucky, G.D., Morse, D.E. & Deming, T.J.** (2000). Biomimetic Synthesis of Ordered Silica Structures Mediated by Block Copolypeptides. *Nature*, 403, 289–292.
- [196] **Kricheldorf, H.R., Ed.** (1987). α -Aminoacid-N-Carboxy-Anhydrides and Related Heterocycles. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [197] **Woodward, R.B. & Schramm, C.H.** (1947). SYNTHESIS OF PROTEIN ANALOGS. *Journal of the American Chemical Society*, 69, 1551–1552.
- [198] **Webster, O.W.** (1991). Living Polymerization Methods. *Science*, 251, 887–893.
- [199] **Lu, H. & Cheng, J.** (2007). Hexamethyldisilazane-Mediated Controlled Polymerization of α -Amino Acid N -Carboxyanhydrides. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 14114–14115.
- [200] **Dimitrov, I. & Schlaad, H.** (2003). Synthesis of Nearly Monodisperse Polystyrene–Polypeptide Block Copolymers via Polymerisation of N-Carboxyanhydrides. *Chem. Commun.*, 2944–2945.
- [201] **Kolb, H.C., Finn, M.G. & Sharpless, K.B.** (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2004–2021.
- [202] **Qin, A., Lam, J.W.Y. & Tang, B.Z.** (2010). Click Polymerization: Progresses, Challenges, and Opportunities. *Macromolecules*, 43, 8693–8702.
- [203] **Qin, A. & Tang, B.Z., Eds.** (2018). Click Polymerization. The Royal Society of Chemistry.
- [204] **Rostovtsev, V. V., Green, L.G., Fokin, V. V. & Sharpless, K.B.** (2002). A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie*, 114, 2708–2711.
- [205] **Tornøe, C.W., Christensen, C. & Meldal, M.** (2002). Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67, 3057–3064.
- [206] **Haworth, W.N., Hirst, E.L., Streight, H.R.L., Thomas, H.A. & Webb, J.I.** (1930). CCCXLIX.—The Structure of Carbohydrates and Their Optical Rotatory Power. Part II. 4-Glucosido- α -Mannose and Its Derivatives. *J. Chem. Soc.*, 0, 2636–2644.
- [207] **Linhardt, R.J. & Bazin, H.G.** (2001). Properties of Carbohydrates. Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I–III, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 53–61.
- [208] **Goa, K.L. & Benfield, P.** (1994). Hyaluronic Acid. *Drugs*, 47, 536–566.
- [209] **McAlindon, T.E., LaValley, M.P., Gulin, J.P. & Felson, D.T.** (2000). Glucosamine and Chondroitin for Treatment of Osteoarthritis. *JAMA*, 283, 1469.
- [210] **Zhang, Y., Chan, J.W., Moretti, A. & Uhrich, K.E.** (2015). Designing Polymers with Sugar-Based Advantages for Bioactive Delivery Applications. *Journal of Controlled Release*, 219, 355–368.
- [211] **Helferich, B. & Duve, G.** (1958). Zur Synthese von Glykosiden, II. *Chemische Berichte*, 91, 1790–1793.
- [212] **Whistler, R.L. & Goatley, J.L.** (1961). Copolymerization of 1-acrylamido-1-deoxy-D-xylophenylglucitol and of 1-deoxy-1-methacrylamido-D-glucitol with Various Vinyl Monomers. *Journal of Polymer Science*, 50, 127–132.

- [213] **Black, W.A.P., Dewar, E.T. & Rutherford, D.** (1963). 849. Polymerisation of Unsaturated Derivatives of 1,2:5,6-Di-O-Isopropylidene-D-Glucofuranose. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 4433.
- [214] **Spain, S.G. & Cameron, N.R.** (2011). A Spoonful of Sugar: The Application of Glycopolymers in Therapeutics. *Polym. Chem.*, 2, 60–68.
- [215] **Slavin, S., Burns, J., Haddleton, D.M. & Becer, C.R.** (2011). Synthesis of Glycopolymers via Click Reactions. *European Polymer Journal*, 47, 435–446.
- [216] **Ghadban, A. & Albertin, L.** (2013). Synthesis of Glycopolymer Architectures by Reversible-Deactivation Radical Polymerization. *Polymers*, 5, 431–526.
- [217] **Gregory, A. & Stenzel, M.H.** (2012). Complex Polymer Architectures via RAFT Polymerization: From Fundamental Process to Extending the Scope Using Click Chemistry and Nature’s Building Blocks. *Progress in Polymer Science*, 37, 38–105.
- [218] **Babiuch, K. & Stenzel, M.H.** (2014). Synthesis and Application of Glycopolymers. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Wiley, 1–58.
- [219] **Kiessling, L.L. & Grim, J.C.** (2013). Glycopolymer Probes of Signal Transduction. *Chemical Society Reviews*, 42, 4476.
- [220] **Lindhorst, T.K.** (2002). Artificial Multivalent Sugar Ligands to Understand and Manipulate Carbohydrate-Protein Interactions. 201–235.
- [221] **Ambrosi, M., Cameron, N.R. & Davis, B.G.** (2005). Lectins: Tools for the Molecular Understanding of the Glycocode. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 1593.
- [222] **Patching, S.G.** (2017). Glucose Transporters at the Blood-Brain Barrier: Function, Regulation and Gateways for Drug Delivery. *Molecular Neurobiology*, 54, 1046–1077.
- [223] **Xie, F., Xie, F., Qin, Yuan, Tang, Zhang, Fan, Chen, Hai, Yao, Li and He, Q.** (2012). Investigation of Glucose-Modified Liposomes Using Polyethylene Glycols with Different Chain Lengths as the Linkers for Brain Targeting. *International Journal of Nanomedicine*, 163.
- [224] **Anraku, Y., Kuwahara, H., Fukusato, Y., Mizoguchi, A., Ishii, T., Nitta, K., Matsumoto, Y., Toh, K., Miyata, K., Uchida, S., Nishina, K., Osada, K., Itaka, K., Nishiyama, N., Mizusawa, H., Yamasoba, T., Yokota, T. & Kataoka, K.** (2017). Glycaemic Control Boosts Glucosylated Nanocarrier Crossing the BBB into the Brain. *Nature Communications*, 8, 1001.
- [225] **Cao, C., Zhao, J., Lu, M., Garvey, C.J. & Stenzel, M.H.** (2019). Correlation between Drug Loading Content and Biological Activity: The Complexity Demonstrated in Paclitaxel-Loaded Glycopolymer Micelle System. *Biomacromolecules*, 20, 1545–1554.
- [226] **Omurtag Ozgen, P.S., Atasoy, S., Zengin Kurt, B., Durmus, Z., Yigit, G. & Dag, A.** (2020). Glycopolymer Decorated Multiwalled Carbon Nanotubes for Dual Targeted Breast Cancer Therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 8, 3123–3137.
- [227] **Lu, M., Chen, F., Noy, J., Lu, H. & Stenzel, M.H.** (2017). Enhanced Antimetastatic Activity of the Ruthenium Anticancer Drug RAPTA-C Delivered in Fructose-Coated Micelles. *Macromolecular Bioscience*, 17.
- [228] **Procházková, E., Cao, C., Rawal, A., Dračinský, M., Bhattacharyya, S., Čísařová, I., Hook, J.M. & Stenzel, M.H.** (2019). Polymorphic Transformation of Drugs Induced by Glycopolymeric Vesicles Designed for

- Anticancer Therapy Probed by Solid-State NMR Spectroscopy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11, 28278–28288.
- [229] **Dag, A., Cakilkaya, E., Omurtag Ozgen, P.S., Atasoy, S., Yigit Erdem, G., Cetin, B., Çavuş Kokuroğlu, A. & Gürek, A.G.** (2021). Phthalocyanine-Conjugated Glyconanoparticles for Chemo-Photodynamic Combination Therapy. *Biomacromolecules*, 22, 1555–1567.
- [230] **Zhao, J., Lu, M., Lai, H., Lu, H., Lalevée, J., Barner-Kowollik, C., Stenzel, M.H. & Xiao, P.** (2018). Delivery of Amonafide from Fructose-Coated Nanodiamonds by Oxime Ligation for the Treatment of Human Breast Cancer. *Biomacromolecules*, 19, 481–489.
- [231] **Xie, J., Lee, S. & Chen, X.** (2010). Nanoparticle-Based Theranostic Agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 1064–1079.
- [232] **Lammers, T., Aime, S., Hennink, W.E., Storm, G. & Kiessling, F.** (2011). Theranostic Nanomedicine. *Accounts of Chemical Research*, 44, 1029–1038.
- [233] **Hosseini, S.M., Mohammadnejad, J., Salamat, S., Beiram Zadeh, Z., Tanhaei, M. & Ramakrishna, S.** (2023). Theranostic Polymeric Nanoparticles as a New Approach in Cancer Therapy and Diagnosis: A Review. *Materials Today Chemistry*, 29, 101400.
- [234] **Silberstein, E.B.** (2012). Radioiodine: The Classic Theranostic Agent. *Seminars in Nuclear Medicine*, 42, 164–170.
- [235] **Maity, D., Sahoo, S.R., Tiwari, A., Ajith, S. & Saha, S.** (2022). Theranostic Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment. *Nanomaterials for Cancer Detection Using Imaging Techniques and Their Clinical Applications*, Springer International Publishing, Cham, 179–223.
- [236] **Zhang, K.Y., Yu, Q., Wei, H., Liu, S., Zhao, Q. & Huang, W.** (2018). Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing. *Chemical Reviews*, 118, 1770–1839.
- [237] **Clement, M., Daniel, G. & Trelles, M.** (2005). Optimising the Design of a Broad-band Light Source for the Treatment of Skin. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 7, 177–189.
- [238] **Chen, G., Qiu, H., Prasad, P.N. & Chen, X.** (2014). Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chemical Reviews*, 114, 5161–5214.
- [239] **Chen, J. & Zhao, J.X.** (2012). Upconversion Nanomaterials: Synthesis, Mechanism, and Applications in Sensing. *Sensors*, 12, 2414–2435.
- [240] **Wang, M., Abbineni, G., Clevenger, A., Mao, C. & Xu, S.** (2011). Upconversion Nanoparticles: Synthesis, Surface Modification and Biological Applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7, 710–729.
- [241] **Yang, D., Ma, P., Hou, Z., Cheng, Z., Li, C. & Lin, J.** (2015). Current Advances in Lanthanide Ion (Ln^{3+})-Based Upconversion Nanomaterials for Drug Delivery. *Chemical Society Reviews*, 44, 1416–1448.
- [242] **Wu, S. & Butt, H.** (2016). Near-Infrared-Sensitive Materials Based on Upconverting Nanoparticles. *Advanced Materials*, 28, 1208–1226.
- [243] **Shen, S., Guo, X., Wu, L., Wang, M., Wang, X., Kong, F., Shen, H., Xie, M., Ge, Y. & Jin, Y.** (2014). Dual-Core@shell-Structured $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NaYF}_4\text{@TiO}_2$ Nanocomposites as a Magnetic Targeting Drug Carrier for Bioimaging and Combined Chemo-Sonodynamic Therapy. *J. Mater. Chem. B*, 2, 5775–5784.

- [244] **Teng, B., Ding, B., Shao, S., Wang, Z., Tong, W., Wang, S., Cheng, Z., Lin, J. & Ma, P.** (2021). Intracellular RNA and Nuclear DNA-Dual-Targeted Tumor Therapy via Upconversion Nanoplatfoms with UCL/MR Dual-Mode Bioimaging. *Chemical Engineering Journal*, 405, 126606.
- [245] **Gulzar, A., Xu, J., Xu, L., Yang, P., He, F., Yang, D., An, G. & Ansari, M.B.** (2018). Redox-Responsive UCNPs-DPA Conjugated NGO-PEG-BPEI-DOX for Imaging-Guided PTT and Chemotherapy for Cancer Treatment. *Dalton Transactions*, 47, 3921–3930.
- [246] **Liu, B., Li, C., Ma, P., Chen, Y., Zhang, Y., Hou, Z., Huang, S. & Lin, J.** (2015). Multifunctional NaYF₄:Yb, Er@mSiO₂@Fe₃O₄-PEG Nanoparticles for UCL/MR Bioimaging and Magnetically Targeted Drug Delivery. *Nanoscale*, 7, 1839–1848.
- [247] **Roti Roti, J.L.** (2008). Cellular Responses to Hyperthermia (40–46 °C): Cell Killing and Molecular Events. *International Journal of Hyperthermia*, 24, 3–15.
- [248] **Pérez-Hernández, M., del Pino, P., Mitchell, S.G., Moros, M., Stepien, G., Pelaz, B., Parak, W.J., Gálvez, E.M., Pardo, J. & de la Fuente, J.M.** (2015). Dissecting the Molecular Mechanism of Apoptosis during Photothermal Therapy Using Gold Nanoprisms. *ACS Nano*, 9, 52–61.
- [249] **Han, H.S. & Choi, K.Y.** (2021). Advances in Nanomaterial-Mediated Photothermal Cancer Therapies: Toward Clinical Applications. *Biomedicines*, 9, 305.
- [250] **Bao, Z., Liu, X., Liu, Y., Liu, H. & Zhao, K.** (2016). Near-Infrared Light-Responsive Inorganic Nanomaterials for Photothermal Therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 349–364.
- [251] **Yang, K., Liu, Y., Wang, Y., Ren, Q., Guo, H., Matson, J.B., Chen, X. & Nie, Z.** (2019). Enzyme-Induced in Vivo Assembly of Gold Nanoparticles for Imaging-Guided Synergistic Chemo-Photothermal Therapy of Tumor. *Biomaterials*, 223, 119460.
- [252] **Li, K., Xu, K., Liu, S., He, Y., Tan, M., Mao, Y., Yang, Y., Wu, J., Feng, Q., Luo, Z. & Cai, K.** (2023). All-in-One Engineering Multifunctional Nanoplatfoms for Sensitizing Tumor Low-Temperature Photothermal Therapy In Vivo. *ACS Nano*, 17, 20218–20236.
- [253] **Chen, Z., Zhao, P., Luo, Z., Zheng, M., Tian, H., Gong, P., Gao, G., Pan, H., Liu, L., Ma, A., Cui, H., Ma, Y. & Cai, L.** (2016). Cancer Cell Membrane-Biomimetic Nanoparticles for Homologous-Targeting Dual-Modal Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Nano*, 10, 10049–10057.
- [254] **Zhou, J., Yu, Q., Song, J., Li, S., Li, X., Kang, B., Chen, H. & Xu, J.** (2023). Photothermally Triggered Copper Payload Release for Cuproptosis-Promoted Cancer Synergistic Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 62.
- [255] **Jumaa Ahmed, A. & Saadi, H.** (2021). Gene Therapy Approaches. *Qubahan Academic Journal*, 1, 52–56.
- [256] **Foldvari, M., Chen, D.W., Nafissi, N., Calderon, D., Narsineni, L. & Rafiee, A.** (2016). Non-Viral Gene Therapy: Gains and Challenges of Non-Invasive Administration Methods. *Journal of Controlled Release*, 240, 165–190.
- [257] **Lin, G., Revia, R.A. & Zhang, M.** (2021). Inorganic Nanomaterial-Mediated Gene Therapy in Combination with Other Antitumor Treatment Modalities. *Advanced Functional Materials*, 31.
- [258] **Tunç, C.Ü. & Aydin, O.** (2022). Co-Delivery of Bcl-2 SiRNA and Doxorubicin through Gold Nanoparticle-Based Delivery System for a

- Combined Cancer Therapy Approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, 103603.
- [259] **Qian, J., Xu, M., Suo, A., Xu, W., Liu, T., Liu, X., Yao, Y. & Wang, H.** (2015). Folate-Decorated Hydrophilic Three-Arm Star-Block Terpolymer as a Novel Nanovehicle for Targeted Co-Delivery of Doxorubicin and Bcl-2 SiRNA in Breast Cancer Therapy. *Acta Biomaterialia*, 15, 102–116.
- [260] **Dong, C., Wang, Y., Chen, Z., Yan, C., Zhang, J., Song, C. & Wang, L.** (2024). Deformable Smart DNA Nanomachine for Synergistic Intracellular Cancer-Related MiRNAs Imaging and Chemo-Gene Therapy of Drug-Resistant Tumors. *Small*, 20.
- [261] **Zheng, T., Wang, W., Mohammadniaei, M., Ashley, J., Zhang, M., Zhou, N., Shen, J. & Sun, Y.** (2022). Anti-MicroRNA-21 Oligonucleotide Loaded Spermine-Modified Acetalated Dextran Nanoparticles for B1 Receptor-Targeted Gene Therapy and Antiangiogenesis Therapy. *Advanced Science*, 9.
- [262] **Kwak, G., Kim, H., Park, J., Kim, E.H., Jang, H., Han, G., Wang, S.Y., Yang, Y., Chan Kwon, I. & Kim, S.H.** (2021). A Trojan-Horse Strategy by *In Situ* Piggybacking onto Endogenous Albumin for Tumor-Specific Neutralization of Oncogenic MicroRNA. *ACS Nano*, 15, 11369–11384.
- [263] **Yu, Q., Gao, Y., Dai, W., Li, D., Zhang, L., Hameed, M.M.A., Guo, R., Liu, M., Shi, X. & Cao, X.** (2024). Cell Membrane-Camouflaged Chitosan-Polypyrrole Nanogels Co-Deliver Drug and Gene for Targeted Chemotherapy and Bone Metastasis Inhibition of Prostate Cancer. *Advanced Healthcare Materials*, 13.
- [264] **Lauffer, M.C., van Roon-Mom, W. & Aartsma-Rus, A.** (2024). Possibilities and Limitations of Antisense Oligonucleotide Therapies for the Treatment of Monogenic Disorders. *Communications Medicine*, 4, 6.
- [265] **Li, Y., Chen, X., Jin, R., Chen, L., Dang, M., Cao, H., Dong, Y., Cai, B., Bai, G., Gooding, J.J., Liu, S., Zou, D., Zhang, Z. & Yang, C.** (2021). Injectable Hydrogel with MSNs/MicroRNA-21-5p Delivery Enables Both Immunomodification and Enhanced Angiogenesis for Myocardial Infarction Therapy in Pigs. *Science Advances*, 7.
- [266] **Subhan, M.A. & Torchilin, V.P.** (2019). Efficient Nanocarriers of SiRNA Therapeutics for Cancer Treatment. *Translational Research*, 214, 62–91.
- [267] **M. G., A., K. S., A., B. S., U., P. L., R., H. P., S., J., S., Joseph, M.M. & T. T., S.** (2024). HER2 SiRNA Facilitated Gene Silencing Coupled with Doxorubicin Delivery: A Dual Responsive Nanoplatfrom Abrogates Breast Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16, 25710–25726.
- [268] **Zhang, C., Zhu, W., Liu, Y., Yuan, Z., Yang, S., Chen, W., Li, J., Zhou, X., Liu, C. & Zhang, X.** (2016). Novel Polymer Micelle Mediated Co-Delivery of Doxorubicin and P-Glycoprotein SiRNA for Reversal of Multidrug Resistance and Synergistic Tumor Therapy. *Scientific Reports*, 6, 23859.
- [269] **Butowska, K., Han, X., Gong, N., El-Mayta, R., Haley, R.M., Xue, L., Zhong, W., Guo, W., Wang, K. & Mitchell, M.J.** (2023). Doxorubicin-Conjugated SiRNA Lipid Nanoparticles for Combination Cancer Therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13, 1429–1437.
- [270] **Nahta, R.** (2003). Bcl-2 Antisense Oligonucleotides: A Potential Novel Strategy for the Treatment of Breast Cancer. *Seminars in Oncology*, 30, 143–149.
- [271] **Chen, A.M., Zhang, M., Wei, D., Stueber, D., Taratula, O., Minko, T. & He, H.** (2009). Co-delivery of Doxorubicin and Bcl-2 SiRNA by Mesoporous

- Silica Nanoparticles Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Multidrug-Resistant Cancer Cells. *Small*, 5, 2673–2677.
- [272] **van Oosterwijk, J.G., Herpers, B., Meijer, D., Briaire-de Bruijn, I.H., Cleton-Jansen, A.M., Gelderblom, H., van de Water, B. & Bovée, J.V.M.G.** (2012). Restoration of Chemosensitivity for Doxorubicin and Cisplatin in Chondrosarcoma in Vitro: BCL-2 Family Members Cause Chemoresistance. *Annals of Oncology*, 23, 1617–1626.
- [273] **Yan, T., Zhu, S., Hui, W., He, J., Liu, Z. & Cheng, J.** (2020). Chitosan Based PH-Responsive Polymeric Prodrug Vector for Enhanced Tumor Targeted Co-Delivery of Doxorubicin and SiRNA. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116781.
- [274] **Yang, Y., Liu, F., Liu, X. & Xing, B.** (2013). NIR Light Controlled Photorelease of SiRNA and Its Targeted Intracellular Delivery Based on Upconversion Nanoparticles. *Nanoscale*, 5, 231–238.
- [275] **Chen, G., Ma, B., Xie, R., Wang, Y., Dou, K. & Gong, S.** (2018). NIR-Induced Spatiotemporally Controlled Gene Silencing by Upconversion Nanoparticle-Based SiRNA Nanocarrier. *Journal of Controlled Release*, 282, 148–155.
- [276] **Zhang, Y., Ren, K., Zhang, X., Chao, Z., Yang, Y., Ye, D., Dai, Z., Liu, Y. & Ju, H.** (2018). Photo-Tearable Tape Close-Wrapped Upconversion Nanocapsules for near-Infrared Modulated Efficient SiRNA Delivery and Therapy. *Biomaterials*, 163, 55–66.
- [277] **Wang, L., Gao, C., Liu, K., Liu, Y., Ma, L., Liu, L., Du, X. & Zhou, J.** (2016). Cypate-Conjugated Porous Upconversion Nanocomposites for Programmed Delivery of Heat Shock Protein 70 Small Interfering RNA for Gene Silencing and Photothermal Ablation. *Advanced Functional Materials*, 26, 3480–3489.
- [278] **Bai, X., Xu, S., Liu, J. & Wang, L.** (2016). Upconversion Luminescence Tracking of Gene Delivery via Multifunctional Nanocapsules. *Talanta*, 150, 118–124.
- [279] **Kong, L., Xing, L., Zhou, B., Du, L. & Shi, X.** (2017). Dendrimer-Modified MoS₂ Nanoflakes as a Platform for Combinational Gene Silencing and Photothermal Therapy of Tumors. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9, 15995–16005.
- [280] **Shen, J., Kim, H., Mu, C., Gentile, E., Mai, J., Wolfram, J., Ji, L., Ferrari, M., Mao, Z. & Shen, H.** (2014). Multifunctional Gold Nanorods for SiRNA Gene Silencing and Photothermal Therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 3, 1629–1637.
- [281] **Niu, G., Zhao, L., Wang, Y. & Jiang, Y.** (2023). PDA/Gold Nanorod-Based Nanoparticles for Synergistic Genetic and Photothermal Combination Therapy for Cancer Treatment. *ChemPhysMater*, 2, 83–89.
- [282] **Pearson, S., Vitucci, D., Khine, Y.Y., Dag, A., Lu, H., Save, M., Billon, L. & Stenzel, M.H.** (2015). Light-Responsive Azobenzene-Based Glycopolymer Micelles for Targeted Drug Delivery to Melanoma Cells. *European Polymer Journal*, 69, 616–627.
- [283] **Zhao, J., Babiuch, K., Lu, H., Dag, A., Gottschaldt, M. & Stenzel, M.H.** (2014). Fructose-Coated Nanoparticles: A Promising Drug Nanocarrier for Triple-Negative Breast Cancer Therapy. *Chem. Commun.*, 50, 15928–15931.
- [284] **Chung, H., Glass, P., Pothen, J.M., Sitti, M. & Washburn, N.R.** (2011). Enhanced Adhesion of Dopamine Methacrylamide Elastomers via Viscoelasticity Tuning. *Biomacromolecules*, 12, 342–347.

- [285] **Babiuch, K., Dag, A., Zhao, J., Lu, H. & Stenzel, M.H.** (2015). Carbohydrate-Specific Uptake of Fucosylated Polymeric Micelles by Different Cancer Cell Lines. *Biomacromolecules*, 16, 1948–1957.
- [286] **Omurtag, P.S., Gunay, U.S., Dag, A., Durmaz, H., Hizal, G. & Tunca, U.** (2013). Diels-alder Click Reaction for the Preparation of Polycarbonate Block Copolymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 51, 2252–2259.
- [287] **Hernández, J.R. & Klok, H.** (2003). Synthesis and Ring-opening (Co)Polymerization of ϵ -lysine *N*-carboxyanhydrides Containing Labile Side-chain Protective Groups. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41, 1167–1187.
- [288] **Dag, A., Lu, H. & Stenzel, M.** (2015). Controlling the Morphology of Glyco-Nanoparticles in Water Using Block Copolymer Mixtures: The Effect on Cellular Uptake. *Polymer Chemistry*, 6, 7812–7820.
- [289] **Basuki, J.S., Duong, H.T.T., Macmillan, A., Erlich, R.B., Esser, L., Akerfeldt, M.C., Whan, R.M., Kavallaris, M., Boyer, C. & Davis, T.P.** (2013). Using Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy to Monitor Theranostic Nanoparticle Uptake and Intracellular Doxorubicin Release. *ACS Nano*, 7, 10175–10189.
- [290] **Park, J., An, K., Hwang, Y., Park, J.-G., Noh, H.-J., Kim, J.-Y., Park, J.-H., Hwang, N.-M. & Hyeon, T.** (2004). Ultra-Large-Scale Syntheses of Monodisperse Nanocrystals. *Nature Materials*, 3, 891–895.
- [291] **Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L. & Muller, R.N.** (2008). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108, 2064–2110.
- [292] **Zhang, H., Xu, D., Huang, Y. & Duan, X.** (2011). Highly Spectral Dependent Enhancement of Upconversion Emission with Sputtered Gold Island Films. *Chem. Commun.*, 47, 979–981.
- [293] **Li, Z., Zhang, Y. & Jiang, S.** (2008). Multicolor Core/Shell-Structured Upconversion Fluorescent Nanoparticles. *Advanced Materials*, 20, 4765–4769.
- [294] **Liu, Q., Feng, W., Yang, T., Yi, T. & Li, F.** (2013). Upconversion Luminescence Imaging of Cells and Small Animals. *Nature Protocols*, 8, 2033–2044.
- [295] **Naccache, R., Chevallier, P., Lagueux, J., Gossuin, Y., Laurent, S., Vander Elst, L., Chilian, C., Capobianco, J.A. & Fortin, M.** (2013). High Relaxivities and Strong Vascular Signal Enhancement for NaGdF₄ Nanoparticles Designed for Dual MR/Optical Imaging. *Advanced Healthcare Materials*, 2, 1478–1488.
- [296] **Boyer, C., Whittaker, M.R., Bulmus, V., Liu, J. & Davis, T.P.** (2010). The Design and Utility of Polymer-Stabilized Iron-Oxide Nanoparticles for Nanomedicine Applications. *NPG Asia Materials*, 2, 23–30.
- [297] **Zhou, T., Zhou, X. & Xing, D.** (2014). Controlled Release of Doxorubicin from Graphene Oxide Based Charge-Reversal Nanocarrier. *Biomaterials*, 35, 4185–4194.
- [298] **Wang, L., Liu, J., Dai, Y., Yang, Q., Zhang, Y., Yang, P., Cheng, Z., Lian, H., Li, C., Hou, Z., Ma, P. & Lin, J.** (2014). Efficient Gene Delivery and Multimodal Imaging by Lanthanide-Based Upconversion Nanoparticles. *Langmuir*, 30, 13042–13051.

- [299] **Goncu, B., Sevgi, E., Kizilarслан Hancer, C., Gokay, G. & Ozten, N.** (2020). Differential Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Lichen Species on Human Prostate Carcinoma Cells. *PLOS ONE*, 15, e0238303.
- [300] **Dag, A., Zhao, J. & Stenzel, M.H.** (2015). Origami with ABC Triblock Terpolymers Based on Glycopolymers: Creation of Virus-Like Morphologies. *ACS Macro Letters*, 4, 579–583.
- [301] **Tekedereli, I., Alpay, S.N., Akar, U., Yuca, E., Ayugo-Rodriguez, C., Han, H.-D., Sood, A.K., Lopez-Berestein, G. & Ozpolat, B.** (2013). Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered SiRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (–) and ER (+) Breast Cancer. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2, e121.
- [302] **Russo, J. & Russo, I.H.** (2000). Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 5, 187–200.
- [303] **Rudolph, P., Peters, J., Lorenz, D., Schmidt, D. & Parwaresch, R.** (1998). Correlation between Mitotic and Ki-67 Labeling Indices in Paraffin-Embedded Carcinoma Specimens. *Human Pathology*, 29, 1216–1222.
- [304] **Çavuşoğlu, K., Acar, A. & Yalçın, E.** (2018). Cıva (Hg) Ağır Metal İyonunun *Allium Cepa* L. (Soğan)'da Teşvik Ettiği Fizyolojik, Sitogenetik ve Anatomik Değişimlerin Araştırılması. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6, 887–892.
- [305] **Carcangiu, M.L., Chambers, J.T., Voynick, I.M., Pirro, M. & Schwartz, P.E.** (1990). Immunohistochemical Evaluation of Estrogen and Progesterone Receptor Content in 183 Patients with Endometrial Carcinoma: Part I: Clinical and Histologic Correlations. *American Journal of Clinical Pathology*, 94, 247–254.
- [306] **Nahorniak, M., Patsula, V., Mareková, D., Matouš, P., Shapoval, O., Oleksa, V., Vosmanská, M., Machová Urdzíkova, L., Jendelová, P., Herynek, V. & Horák, D.** (2023). Chemical and Colloidal Stability of Polymer-Coated NaYF₄:Yb,Er Nanoparticles in Aqueous Media and Viability of Cells: The Effect of a Protective Coating. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 2724.
- [307] **Yang, W., Bu, C., Zhao, M., Li, Y., Cui, S., Yang, J. & Lian, H.** (2024). Full-Spectrum Utilization of ZIF-67/Ag NPs/NaYF₄:Yb,Er Photocatalysts for Efficient Degradation of Sulfadiazine: Upconversion Mechanism and DFT Calculation. *Small*.
- [308] **Pop, D., Buzatu, R., Moacă, E.-A., Watz, C.G., Cîntă Pînzaru, S., Barbu Tudoran, L., Nekvapil, F., Avram, Ștefana, Dehelean, C.A., Crețu, M.O., Nicolov, M., Szuhaneck, C. & Jivănescu, A.** (2021). Development and Characterization of Fe₃O₄@Carbon Nanoparticles and Their Biological Screening Related to Oral Administration. *Materials*, 14, 3556.
- [309] **Shen, S., Kong, F., Guo, X., Wu, L., Shen, H., Xie, M., Wang, X., Jin, Y. & Ge, Y.** (2013). CMCTS Stabilized Fe₃O₄ Particles with Extremely Low Toxicity as Highly Efficient Near-Infrared Photothermal Agents for in Vivo Tumor Ablation. *Nanoscale*, 5, 8056.
- [310] **Puiggali-Jou, A., Wedepohl, S., Theune, L.E., Alemán, C. & Calderón, M.** (2021). Effect of Conducting/Thermoresponsive Polymer Ratio on Multitasking Nanogels. *Materials Science and Engineering: C*, 119, 111598.

- [311] **Gao, G., Sun, X. & Liang, G.** (2021). Nanoagent-Promoted Mild-Temperature Photothermal Therapy for Cancer Treatment. *Advanced Functional Materials*, 31.
- [312] **Yang, Y., Fan, X., Li, L., Yang, Y., Nuernisha, A., Xue, D., He, C., Qian, J., Hu, Q., Chen, H., Liu, J. & Huang, W.** (2020). Semiconducting Polymer Nanoparticles as Theranostic System for Near-Infrared-II Fluorescence Imaging and Photothermal Therapy under Safe Laser Fluence. *ACS Nano*, 14, 2509–2521.
- [313] **Liu, X., Li, B., Fu, F., Xu, K., Zou, R., Wang, Q., Zhang, B., Chen, Z. & Hu, J.** (2014). Facile Synthesis of Biocompatible Cysteine-Coated CuS Nanoparticles with High Photothermal Conversion Efficiency for Cancer Therapy. *Dalton Transactions*, 43, 11709.
- [314] **Sebaugh, J.L.** (2011). Guidelines for Accurate EC50/IC50 Estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10, 128–134.



EKLER

EK A: Bezmialem Vakıf Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu karar metni.



EK A



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gülşah YİĞİT ERDEM

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Yigit Erdem, G., Goncu, B., Atasoy, S., Yıldız Uysal, A., Dag, S., & Dag, A.** (2025). Multifunctional Theranostic Glyconanoprobes for Synergistic Eradication of Breast Cancer. *Journal of Materials Chemistry B*.
- **Dag, A., Yigit Erdem, G., Goncu, B., Atasoy, S., Yıldız Uysal, A., & Dag, S.** "Bionanoprobes". *PCT Patent No: PCT/TR2025/050090 (Başvuru Yapıldı)*.
- **Yiğit Erdem, G., Omurtag Ozgen, P. S., & Dag, A.** (2021). Investigation Of The Effectiveness Of Glycopolymer Based Theranostic Nanosystems In Breast Cancer. *The 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, June 22-25, Ankara, Turkey.
- **Dağ, A., Yiğit, G., Omurtag Özgen, P. S., Atasoy, S., & Gürek, A. G.** (2019). Hedefli Upconversion Lüminesans Biyonanoprobların Hazırlanması ve Teranostik Uygulamaları. *6. Biyomalzeme Günleri*, 9 - 10 Aralık, İstanbul, Türkiye.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Dag, A., Cakilkaya, E., Omurtag Ozgen, P. S., Atasoy, S., Yigit Erdem, G., Cetin, B., ... & Gurek, A. G.** (2021). Phthalocyanine-conjugated glyconanoparticles for chemo-photodynamic combination therapy. *Biomacromolecules*, 22(4), 1555-1567.

- **Atasoy, S., Goncu, B., Yiğit Erdem, G., Omurtag Ozgen, P. S., & Dağ, A.** (2021). Development of targeted drug/gene bio-nanoprobes and investigation of their therapeutic potential. *XVII. Congress of Medical Biology and Genetics*, October 28-31, Turkey.
- **Gençoğlu Katmerlikaya, T., Çetin Ersen, B., Yiğit Erdem, G., Omurtag Özgen, P.S & Dağ, A.** (2021). Synthesis of Cisplatin and/or Gemcitabine Containing Polymeric Nanodrug Formulations for Breast Cancer Treatment. *The 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*, June 22-25, Ankara, Turkey.
- **Ozgen, P. S. O., Atasoy, S., Kurt, B. Z., Durmus, Z., Yigit, G., & Dag, A.** (2020). Glycopolymer decorated multiwalled carbon nanotubes for dual targeted breast cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(15), 3123-3137.
- **Dag, A., Omurtag Ozgen, P. S., Atasoy, S., Zengin Kurt, B., Durmuş, Z., & Yiğit Erdem, G.** (2020). "Kanser Tedavisi İçin Glikopolimer İçeren Karbon Nanotüplerin Sentezi", *T.C. Patent No: 2020/22203 (Tescil Edildi)*.
- **Omurtag Özgen, P. S. , Atasoy, S., Zengin Kurt, B., Durmuş, Z., Yiğit, G., & Dağ, A.** (2019). Meme Kanseri Tedavisinde Doksorubisin Konjuge Glikopolimer ile Kaplanmış Karbon Nanotüpler (CNT). *6. Biyomalzeme Günleri*, 9 - 10 Aralık, İstanbul, Türkiye.
- **Dağ, A., Çakılıkaya, E., Yiğit, G., Atasoy, S., & Gürek, A. G.** (2019). Phtalocyanine Conjugated Glyconanoparticles for Combination Therapies. *The 16th Pasific Polymer Conference*, December 8 - 12, Singapore.
- **Yigit, G., & Arıcıoğlu, F.** (2015). Günümüz ve Gelecekte Parkinson Hastalığı için Farmakolojik Tedavi Yaklaşımları. *Clinical and Experimental Health Sciences*, 5(4), 265-273.