T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER TEDAVİSİNE YÖNELİK FONKSİYONEL POLİMERİK NANOPARTİKÜLLER

Yağmur BOZKURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Serap DERMAN

Temmuz, 2019

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANSER TEDAVİSİNE YÖNELİK FONKSİYONEL POLİMERİK NANOPARTİKÜLLER

Yağmur BOZKURT tarafından hazırlanan tez çalışması 16.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serap DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Serap DERMAN, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOĞULLARI, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Fikrettin ŞAHİN, Üye
Yeditepe Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Serap DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Kanser Tedavisine Yönelik Fonksiyonel Polimerik Nanopartiküller" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim

Yağmur BOZKURT

İmza

Bu tez çalışması Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü tarafından FYL-2019-3556 numaralı proje ve TÜBİTAK tarafından 2210 Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu programıyla desteklenmiştir.

İnsanlığa,

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans boyunca yaptığım tez ve diğer bütün bilimsel çalışmalarım süresince bana yardımcı olan ve yaşadığım tüm problemlerin üstesinden gelmemi sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Serap DERMAN'a,

Sitotoksisite çalışmalarında özveri ile yardımcı olan Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan Tayfun ACAR'a, Derman'S LAB Araştırma Grubu üyelerine ve diğer laboratuvar arkadaşlarıma,

Aynı zamanda bu çalışmanın var olması ve tamamlanabilmesi için sağladıkları maddi imkân ve desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a ve Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Beraber büyüdüğümüz, birbirimizin iyi ve kötü anlarına şahitlik ettiğimiz, en sonunda beraber çalışma fırsatı yakaladığım ve bana tüm çalışmalarım boyunca desteğiyle omuzlarımdaki yükü paylaşan değerli arkadaşım Araş. Gör. Fatma Şayan POYRAZ'a,

Hayatıma renk katan ve bana benden daha çok inanan değerli arkadaşlarım Aslı GENÇASLAN, Pavel KUDRYASHOV, Melike Şeyma MWAMBA, Damla GÖKKAYA, Serap HAFIZOĞLU, Burçin YAVUZ ve Alper GÜLER'e,

Beni ben yapan ve her zaman arkamda duran Annem'e ve Babam'a, en yakın arkadaşım canım Ablam'a ve Kuzey'ime,

Güçlü durduğum ve başardığım için kendime teşekkürü borç bilirim.

Yağmur BOZKURT

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ X

KISALTMA LİSTESİ XI

ŞEKİL LİSTESİ XIV

TABLO LİSTESİ XV

ÖZET XVI

ABSTRACT XVIII

1 Giriş 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 3

1.3 Hipotez 3

2 Glioma 5

2.1 Glioma Epidemiyolojisi 5

2.2 Glioma Patofizyoloisi 6

2.2.1 Sınırlı Büyümeli Glioma 6

2.2.2 WHO Aşama II ve III Glioma 7

2.2.3 WHO Aşama IV Glioblastoma 8

2.3 Geleneksel Tedavi Yöntemleri 9

2.4 İlaç Taşıma Sistemleri ile Tedavi 10

3 Nanopartiküller 15

3.1 Genel Bilgiler 15

3.2 Lipozom Nanopartiküller 16

3.3 Protein Bazlı Nanopartiküller 17

3.4 Biyolojik Nanopartiküller 18
3.4.1 Ekzozomlar 18
3.4.2 Lipoproteinler 19
3.4.3 Ferritinler 19
3.4.4 Magnetitler 19
3.4.5 Virüsler 20
3.5 İnorganik Nanopartiküller 20
3.6 Hibrit Nanopartiküller 21
3.7 Polimer Temelli Nanopartiküller 22
3.7.1 Polimerik Miseller 23
3.7.2 Polimerik Nanojeller 24
3.7.3 Polimerik Dendrimerler 25
3.7.4 Polimerik Nanoküre ve Nanokapsüller 25
3.8 Nanopartiküllerde Pasif Hedefleme 27
3.9 Nanopartiküllerde Aktif Hedefleme 28
3.9.1 Antikor ve Antikor Parçaları 29
3.9.2 Aptamerler 29
3.9.3 Karbohidratlar 29
3.9.4 Küçük Moleküller 30
3.9.5 Peptidler 30
3.10 Antikanser Etken Olarak: Kafeik Asit Fenetil Ester 32
4 Materyal ve Metod **34**
4.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar 34
4.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler 35
4.2.1 Fosfat Buffer Saline (PBS) Tamponunun Hazırlanması 35
4.2.2 MES Tamponunun Hazırlanması 35

4.2.3 Farklı Konsantrasyonlardaki *Angiopep-2* Çözeltileri 35
4.2.4 Farklı Konsantrasyonlardaki Polivinil Alkol (PVA) Çözeltileri 36
4.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar 36
4.4 Peptid Sentezi ve Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler 36
4.4.1 Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentez Cihazı 36
4.4.2 Sıvı Kromatografi ve Kütle Spektroskopisi (LC-MS) 37
4.5 Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler 39
4.5.1 UV-Vis Spektroskopisi 39
4.5.2 Zeta Sizer 40
4.5.3 Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopisi 42
4.5.4 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) 43
4.6 Katı Faz Peptid Sentezi Yöntemiyle *Angiopep-2* Peptidinin Sentezi 44
4.6.1 Sentezlenen *Angiopep-2* Peptidinin LC-MS Cihazında Analizi 46
4.7 CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi 46
4.8 Nanopartiküllerin Yüzeyine *Angiopep-2* Peptidinin Bağlanması 47
4.9 Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 48
4.9.1 Reaksiyon Verimi 48
4.9.2 Enkapsülasyon Etkinliği 49
4.9.2 Etken Yükleme Kapasitesi 49
4.9.3 Zeta Sizer ile Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi 49
4.9.4 FT-IR Analizi 50
4.9.5 SEM Analizi 50
4.10 Sentezlenen Nanopartiküllerin *In Vitro* Salımı 50
4.11 Sitotoksisite Çalışmaları 50
5 Sonuç ve Öneriler **52**
5.1 *Angiopep-2* Peptidinin Karakterizasyonu 52

5.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 54
5.3 Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi..... 64
5.3.1 C6 Glioma Hücre Hattında Sitotoksik Etkinin İncelenmesi 64
5.3.2 L929 Fibroblast Hücre Hattında Biyouyumluluğun İncelenmesi..... 67
5.4 Bulgular..... 68
Kaynakça **76**
Tezden Üretilmiş Yayınlar **92**

SİMGE LİSTESİ

L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
λ	Dalgaboyu
M	Molar
µM	Mikromolar
n	Mol
°C	Derece Santigrat
rpm	Dakikada Dönme Hızı
kV	Kilovolt
mV	Milivolt
W	Watt
N	Normalite

KISALTMA LİSTESİ

ATRX	ATP-bağımlı Helikaz
ATR	Attenuated Total Reflection
BSE	Geri Yansıyan Elektronlar
CDC	Hücre Bölünme Geni
CDKNA	Siklin-bağımlı Kinaz İnhibitörü
CIMP	CpG Ada Metilatör Fenotipi
CAPE	Kafeik Asit Fenetil Ester
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DL	Etken Yükleme Kapasitesi
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EPR	Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkoyma
EDC	N-Etil-N-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür
ELS	Elektroforetik Işık Saçılması
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FISH	Floresans In Situ Hibridizasyon
FBS	Fetal Sığır Serumu
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
GLUT	Glukoz Taşıyıcı Geni
GF	Gen Faktörü
H3F3A	Histon Aile Üyesi Geni 3A
IgE	İmmünoglobin E
IDH	İzositrat Dehidrojenaz
IR	Kızılötesi
IC_{50}	Yüzde Elli Hücre Ölüm Oranı için Gereken Doz
LAT	T Hücresi Linker Aktivasyonu
LRP	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör proteini
LC-MS	Likit Kromatografi-Kütle Spektroskopisi
MAPK	Mitojen-başlatıcılı Protein Kinaz

mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MGMT	O-6-Metilguanin-DNA Metiltransferaz
miRNA	mikro Ribo Nükleik Asit
MAO-B	Monoamino Oksidaz tip B
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
NF	Nörofibromin
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NP	Nanopartikül(ler)
POT	Telomeraz Koruma Geni
PHLDB1	Plecktrin Homolog Domain B Geni
PDGFRA	Platelet-Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü Alfa
P53	Tümör Protein 53
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PCR	Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
PLA	Poli Laktik Asit
PNP	Polimerik Nanopartiküller
PVCL	Poli(N-vinilkaprolaktam)
PNIPAAm	Poli(N-izopropilakrilamid)
POEGMA	Poli(oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat)
PAMAM	Poliamidoamin
PNP	Protein Bazlı Nanopartiküller
PGA	Poliglikolik Asit
PLGA	Poli Laktik Ko Glikolik Asit
PDLA	Poli D Laktik Ko Glikolik Asit
PLLA	Poli L Laktik Ko Glikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
PBS	Fosfat Tamponu
PDI	Çoklu Dağılım İndeksi
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
RY	Reaksiyon Verimi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi

SE	Sekonder Elektronlar
SEGA	Subependimal Dev Hücre Astrositomu
TP	Tümor Protein
TNP	Tek Nükleotid Polimorfizm
TERT	Telomeraz Ters Transkriptaz
TSC	Tüberküloz Geni
TSC	2-(N-morfolino)ethanesülfonik asit
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Kan beyin bariyerinin şematik temsili[57] 12
Şekil 2.2 Kan beyin bariyerinde bulunan fizyolojik taşıma mekanizmaları[61] 13
Şekil 3.1 Çift katmanlı Lipozomun yapısı[76] 17
Şekil 3.2 Protein bazlı nanopartikül sentezi[82] 18
Şekil 3.3 Polimerik misel hibrit nanopartiküllerin şematik gösterimi[104] 22
Şekil 3.4 İlacın serbest olarak ve PNP taşıma sistemleriyle verilmesinin ardından kandaki miktarı 23
Şekil 3.5 Aktif hedefleme ajanı ile kaplı ilaç yüklü miselin sıvı ortamdaki yapısı [109] 24
Şekil 3.6 Nanojelin şematik yapısı ve yakınlaştırılmış iç yapısı[113] 25
Şekil 3.7 Dendrimerlerin yapsı ve yakınlaştırılmış ilaç yüklü iç kesiti[114] 25
Şekil 3.8 İlaç içeren (a) nanoküre, (b) nanokapsül, (c) aktif hedeflemeli nanoküre kesitleri[118] 26
Şekil 3.9 Pasif tümör hedeflemesinin şematik gösterimi [133] 28
Şekil 3.10 *Angiopep-2* peptidinin keşfedilmesi temsili [147] 32
Şekil 3.11 CAPE bileşenin kimyasal yapısı [166] 33
Şekil 5.1 Peptidin LC kromatogramı 52
Şekil 5.2 Peptidin MS spektrumu (tarama aralığı m/z = 500-1000) 53
Şekil 5.3 Peptidin MS spektrumu (tarama aralığı m/z = 400-2000) 53
Şekil 5.4 EDC miktarına göre değişen nanopartikül boyutu 56
Şekil 5.5 Kullanılan peptid miktarına göre değişen nanopartikül boyutu 56
Şekil 5.6 Üretilen CAPE yüklü PLGA nanopartiküller (A), *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü PLGA nanopartiküller (B) ve boş PLGA nanopartiküllerin (C) boyut dağılım grafikleri 57
Şekil 5.7 Üretilen CAPE yüklü PLGA nanopartiküller (A), *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü PLGA nanopartiküller (B) ve boş PLGA nanopartiküllerin (C) zeta potansiyel grafikleri 57
Şekil 5.8 Sentezlenen Boş PLGA nanopartiküllerinin FT-IR grafiği 59
Şekil 5.9 Serbest CAPE molekülünün FT-IR grafiği 59
Şekil 5.10 Sentezlenen *Angiopep-2* peptidinin FT-IR grafiği 60
Şekil 5.11 Sentezlenen *Angiopep-2* peptidiyle hedeflendirilmiş CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerinin FT-IR grafiği 60
Şekil 5.12 Boş PLGA NP, ANG-CAPE NP, serbest CAPE molekülü ve *Angiopep-2* peptidinin FT-IR spektrumlarının karşılaştırılması 61
Şekil 5.13 CAPE NP'ye ait SEM görüntüsü 62
Şekil 5.14 pH 7.4'te CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerinin in vitro salım profili 63
Şekil 5.15 pH 7.4'te *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü nanopartiküllerinin in vitro salım profili 63
Şekil 5.16 C6 glioma hattına ait 24. saat hücre canlılık değerleri 65
Şekil 5.17 C6 glioma hattına ait 48. saat hücre canlılık değerleri 66
Şekil 5.18 C6 glioma hattına ait 72. saat hücre canlılık değerler 67
Şekil 5.19 L929 fibroblast hattına 48. saat hücre canlılık değerleri 68

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 Peptid sentezi için kullanılan kimyasallar 44
Tablo 4.2 CAPE Yüklü PLGA Nanopartikülleri ve *Angiopep-2* Peptidinin Konjugasyonu İçin Yapılan Sentezler 48
Tablo 5.1 ANG-CAPE Nanopartikülleri İçin Optimizasyon Sonuçları 54
Tablo 5.2 Boş NP, CAPE NP ve ANG-CAPE NP Boyut, PDI, Zeta Potansiyel, EE, DL ve RY Sonuçlar 55
Tablo 5.3 Yapılan Tez Çalışmasının Literatürle Karşılaştırması 73

ÖZET

Kanser Tedavisine Yönelik Fonksiyonel Polimerik Nanopartiküller

Yağmur BOZKURT

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Serap DERMAN

Glioma yüksek ölüm oranına sahip kötü huylu beyin tümörlerinden biridir. Beyni dolaşım sisteminden ayıran kan beyin bariyeri gliomada kemoterapinin etkinliğini kısıtlamaktadır. Büyük moleküllü ilaçlar kan beyin bariyerini geçemezken, küçük moleküllü ilaçların sadece %2'si geçebilmektedir. Terapötiklerin yetersiz biyodağılımı glioma tedavisindeki en büyük sorunlardan biridir. Bu nedenle ilaç dağılımını arttırmak için çeşitli ilaç taşıma sistemleri geliştirilmekte hatta bu ilaçlar istenilen bölgeye hedeflenmek üzere fonksiyonelleştirilebilmektedirler. Yüzeylerine çeşitli ligantlar bağlanarak hedeflenen taşıma sistemleri özel olarak kan beyin bariyerinde ve glioma hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlanabilirler. Böylelikle, ilacın kan beyin bariyerini aşması ve hastalıklı hücrelerde yoğunlaşması sağlanır.

Bu çalışmanın amacı *Angiopep-2* peptidi ile fonksiyonelleştirilerek, glioma kanser hücrelerinin yüzeyinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla bulunan LRP-1 reseptörlerine hedeflenmiş, Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi, karakterizasyonu ve C6 Glioma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelenmesidir.

Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) molekülü yüklü PLGA nanopartiküller tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle sentezlenmiştir. Daha sonra, üretilen nanopartiküllerin hedeflendirilmesi amacı ile, *Angiopep-2* peptidi mikrodalga destekli katı faz peptid sentezi yöntemiyle sentezlenmiş ve CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerin yüzeyine bağlanmıştır. Boyut ve yüzey yükü analizleri sonucunda nanopartiküllerin 176.4 nm boyutlarında, -10.8 mV zeta potansiyele sahip ve monodispers (PDI<0.3) olarak sentezlendiği görülmüştür. FT-IR spektroskopi, boyut ve yüzey yükü analizleriyle *angiopep-2* peptidinin nanopartiküllerin yüzeyine konjugasyonunun başarıyla gerçekleştiği gösterilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin biyolojik aktivite çalışmaları L929 fibroblast ve C6 glioma hatları üzerinde MTT yöntemiyle incelenmiştir. Sitotoksik aktivite çalışmaları sonucunda serbest CAPE, CAPE yüklü nanopartiküller ve peptid ile hedeflendirilmiş nanopartiküllerin IC_{50} değerleri sırasıyla 50, 45 ve 21 μM olarak bulunmuştur. L929 fibroblast hücre hattıyla yapılan çalışmalar sonucunda literatürle de uyumlu olarak serbest CAPE ve nanopartiküllerin biyouyumlu oldukları görülmüştür. Bu tez çalışması sonucunda elde edilen *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü nanopartiküller, serbest CAPE molekülü ve CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerine kıyasla C6 Glioma hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: PLGA, nanopartikül, glioma, *angiopep-2*, CAPE.

ABSTRACT

Functional Polymeric Nanoparticles for Cancer Treatment

Yağmur BOZKURT

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Serap DERMAN

Glioma is one of the malignant brain tumors with a high mortality rate. Chemotherapy is one of the most important methods in glioma treatment, but the blood-brain barrier limits the effectiveness of chemotherapy. Drugs with big molecular weight cannot cross the blood brain barrier, only 2 percent of drugs with small molecular weight can pass. Inadequate biodistribution of therapeutics is the biggest problem in glioma treatment. Therefore, various drug delivery systems are being studied to increase the drug pharmacokinetics/dynamics. Also, using these systems, drugs can be functionalized to target to the desired diseased region in the body. Targeted drug delivery systems can specifically bind to the cell receptors on the blood-brain barrier and glioma cells. Thus, drugs can pass through the BBB and accumulate in the diseased cells and tissues. In this study polymeric drug delivery system was synthesized for targeting glioma cell line. For this purpose FDA approved PLGA polymer was used to synthesize spherical nanoparticles and targeted with *angiopep-2* peptide. *Angiopep-2* is a synthetic peptide and also a ligand for LRP-1 receptors in the BBB and glioma cells. LRP-1 receptors are overexpressed on the surface of the BBB and glioma cells compared to healthy brain and BBB cells. For this study, polymeric drug delivery systems were designed to target glioma cells and increase the bioavailability of the drug. *Angiopep-2* peptide was synthesized by

microwave assisted solid phase peptide synthesis method. After cleavage of peptide, *angiopep-2* peptide was analyzed with LC-MS. Caffeic acid phenethyl ester is an anticancer molecule and active compound of the propolis. In this study CAPE molecule was encapsulated in PLGA nanoparticles by single emulsion solvent evaporation method. Then, *Angiopep-2* peptide was conjugated to the surface of CAPE loaded PLGA nanoparticles via EDC crosslinking agent. Characterization of the targeted nanoparticles were done with dynamic light scattering, FT-IR spectroscopy and SEM analysis. FTIR analysis showed that CAPE molecule was successfully encapsulated within the nanoparticles. Successful conjugation of *angiopep-2* peptide and nanoparticles was verified with FT-IR, size and zeta potential results. Photon correlation spectroscopy analysis showed that size and zeta potential of the targeted PLGA nanoparticles were 176.4 nm and -10.8 mV, respectively. Biocompatibility and cytotoxic activity of free CAPE, CAPE loaded NPs and targeted NPs were comparatively investigated on L929 fibroblast and C6 glioma cell lines by MTT method. As a result of L929 fibroblast cell viability, both free drug and nanoparticles were biocompatible. IC_{50} values of the free CAPE molecule, CAPE loaded nanoparticles and *angiopep-2* conjugated nanoparticles were 50, 45 and 21 μM, respectively. As a result of this master thesis, targeted nanoparticles showed greater anticancer activity than free CAPE molecule and CAPE loaded nanoparticles.

Keywords: PLGA, nanoparticles, glioma, *angiopep-2*, CAPE.

1
Giriş

1.1 Literatür Özeti

Geleneksel farmakoterapi ile ilaçlar serbest olarak çeşitli yollarla (enteral, intravenöz, intraarter, intramusküler, subkutan, oral vb.) insan vücuduna verilmektedir [1]. Geleneksel terapötiklerin doğası gereği sahip oldukları düşük moleküler ağırlık, ilacın vücutta çeşitli bölgelere, hücrelere ve hücre içi organellere ulaşmasını sağlamaktadır. Fakat geleneksel yollarla verilen ilaç vücutta hedefleme olmaksızın rasgele dağılarak hem sağlıklı hücreleri etkileyip yan etkilere sebep olmakta hem de hedef bölgeye ulaşması gereken ilaç miktarına ulaşılamadığı için yüksek dozlarda uygulamalara sebep olmaktadır. Serbest olarak verilen bu ilaçlar aynı zamanda sahip oldukları düşük moleküler ağırlıklarından dolayı böbreklerden kolayca atılmakta ve vücuttaki etkin doz konsantrasyonu sabit kalmayıp azalan bir karakter göstermektedir. İlacın taşınmasındaki diğer sorunlar ise vücudumuzda bulunan fiziksel bariyerlerdir. Çeşitli organların iç ve dış tabakalarında bulunan epitel hücreler ve bu hücreler arasında bulunan hücreler arası bağlantılar, transepitel elektriksel direnç (TEER), kan damarlarımızda ve bağırsaklarımızda bulunan endotel hücreler ve hücreler arası bağlantılar, mukozal membranlar, ilaçların enzimatik olarak mide ve karaciğerde parçalanarak aktivitelerini kaybetmesine ve hücrelerimizin sahip olduğu efflux sistemi ile ilacın hücre dışına atılmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda ilacın biyoyararlanımı düşmekte ve yeterli farmakolojik etki elde edilememektedir.

Glioma beyin ve omuriliğin bağ doku hücreleri olan glial hücreleri etkileyen bir tümör tipidir. Bugüne kadar glioma tedavisi için kullanılan geleneksel ilaçların ve antikanser bileşenlerin varlığı bilinmektedir. Beyin tümörü ve doğuştan gelen metabolik rahatsızlıklar gibi nörolojik ve nörodejeneratif hastalıkların sistemik tedavisi, geçirgenliği oldukça düşük olan kan-beyin bariyeri (KBB) yüzünden oldukça zordur. KBB vücudun diğer bölgeleriyle karşılaştırıldığında en sıkı bağlantıya ve buna bağlı olarak en az madde geçişine sahip olan bariyerdir. Küçük moleküllü ilaçların %98'i ve büyük moleküllü ilaçların neredeyse tamamı, bu

bölgedeki düşük geçirgenlikten dolayı beyin dokularına ulaşamamaktadır. Bu nedenle araştırmacılar KBB'yi aşabilecek ve geleneksel farmakoterapinin eksikliklerini kapatabilecek, ilaç taşıma sistemlerinin tasarlanmasına yönelmiştir. PLGA (poli [laktik-*ko*-glikolik asit]) polimeri kullanılarak hazırlanan nanopartiküller (NP) diğer nanotaşıyıcı sistemler ile karşılaştırıldığında daha yüksek kararlılığa ve ilaç yükleme kapasitesine sahip olan, uzun süreli salım yapabilen, immünojenik olmayan, ilacın toksisitesini azaltan, ilacın biyoyararlanımı ve etkisini/etki süresini arttıran, FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir ilaç taşıma sistemidir. Literatürde yapılmış *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, PLGA NP'lerinin yüzey modifikasyonları ve hedefleme ajanlarının varlığı ile beraber KBB'yi aşabildikleri belirtilmiştir [2-4]. Ayrıca, serbest ilaçla ilaç yüklü PLGA NP ilaç taşıma sistemleri mukayese edildiğinde, PLGA NP ilaç taşıma sistemlerinin daha etkili oldukları ve KBB'yi aşıp beyin dokularına nüfuz edebilme oranı açısından, literatürdeki yüksek orana sahip bileşenlerden biridir.

Doğal bir polifenolik molekül olan kafeik asit fenetil ester (CAPE) propolisin aktif bileşenidir. Antikanser, antiyangı, antioksidant ve antimikrobiyal özellikleri literatürde birçok çalışma ile kanıtlanmıştır [5-8]. CAPE NF-κB yolağının özel inhibitörüdür. Aynı zamanda biyouyumlu [9] olmasından dolayı CAPE antikanser çalışmaları için büyük bir potansiyele sahip bir moleküldür.

Yapılan literatür taramasında CAPE molekülünün nanopartikül formülasyonlarının kanser çalışmaları ve glioma kanser çalışmalarında daha önce kullanılmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar yalnızca serbest molekülle gerçekleştirilmiş olup bunların sonucunda CAPE molekülünün oldukça iyi bir antikanser ajan olduğu gösterilmiştir [10-12]. Bu nedenle bu tez çalışmasında, antikanser özelliği bilinen CAPE molekülü tekli emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle PLGA nanopartiküllerine yüklenmiştir. Daha sonra bu nanopartiküller tarafımızca sentezlenen *angiopep-2* peptidiyle konjuge edilmiş ve Glioma hücrelerine hedeflendirilmiştir. Karakterizasyon sonucu elde edilen optimum nanopartiküllerin sitotoksisite çalışmaları serbest CAPE ve hedeflenmeyen CAPE yüklü nanopartiküller ile karşılaştırmalı olarak C6 glioma hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Glioma birincil beyin tümörü kaynaklı ölümlerin %80'inden sorumludur. Kötü huylu bir yapıda olan glioma için kemoterapi en çok kullanılan tedavi yöntemlerinden biridir. Kemoterapinin başarısının en büyük engelleri arasında beyine moleküllerin geçişini büyük oranda azaltan kan beyin bariyeri ve kemoterapi kaynaklı yan etkilerin hastanın hayatını olumsuz olarak etkilemesi bulunmaktadır. Bu çalışmada hedefleyici ilaç taşıma sistemleri tasarlanarak ilacın sadece hedef doku ve hücrelere ulaşmasını sağlamak böylelikle ilacın sağlıklı hücreleri etkileyip gösterebileceği olası yan etkileri en aza indirgeyebilmek hedeflenmiştir.

Antioksidant, antibakteriyel ve antikanser gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olan kafeik asit fenetil ester molekülü oldukça hidrofobik özelliktedir. Bu tez çalışmasında;

- CAPE molekülünü biyobozunur ve biyouyumlu polimerik ilaç taşıma sistemleri içerisine yükleyerek etken maddenin çözünürlüğünü arttırmak ve kontrollü salım sağlayarak biyolojik aktivitesini arttırmak,
- CAPE yüklü nanopartikülleri *Angiopep-2* peptidi ile fonksiyonelleştirerek glioma kanser hücrelerinin yüzeyinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla bulunan LRP-1 reseptörlerine hedeflenmiş, Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlemek,
- Üretilen nanopartiküllerin serbest CAPE ve hedeflendirilmemiş CAPE yüklü nanopartiküller ile karşılaştırmalı olarak C6 Glioma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada antikanser özelliği hâlihazırda bilinen kafeik asit fenetil ester molekülünün biyobozunur ve biyouyumlu polimerik ilaç taşıma sistemlerine yükleyerek, molekülün biyouyumluluğunun, çözünürlüğünün, biyolojik aktivitesinin arttırılabileceği hipotezlenmiştir. Aynı zamanda tez kapsamında bir diğer hipotezimiz ise tasarlanan bu ilaç taşıma sisteminin yüzeyine Glioma hücrelerini hedefleyici *Angiopep-2* peptidi bağlayarak tedavide seçiciliğin arttırılmasıdır. Yüzeyine glioma hücrelerine özel peptid bağlanan polimerik

nanopartiküllerin kanser hücrelerinin içerisine reseptör aracılı transitoz yoluyla girerek etkinliğini hücre içerisinde sergilemesi öngörülmüştür. Böylelikle sentezlenen ilaç taşıma sisteminin antikanser etkinliğinin artacağı beklenmiştir.

2
Glioma

2.1 Glioma Epidemiyolojisi

Beyin tümörleri vücutta konumlandıkları yerden sıklıkla yayılmacı karakterde olduklarından dolayı oldukça yüksek ölüm oranına sahiptirler. Glioma ve menenjiyomlar en sık rastlanan birincil beyin tümörleridir [13]. Glioma tüm birincil beyin tümörlerinin neredeyse %30'unu ve birincil beyin tümörlerinden kaynaklı ölümlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır [14, 15]. Bu grupta olan beyin tümörleri nörogliyal ve öncül kök hücrelerden oluşup astrositom, oligodendrogliom, karışık oligoastrositik glioma veya ependimom tümör hücrelerine dönüşmektedirler. İleri sınıflandırmalar ise tümörün yerleştiği doku (örneğin pons veya optik sinirler), karakteristik farklılaşma modeli (örneğin pilositik veya miksopapillari) ve anaplazi özelliklerine (yüksek mitotik aktivite, mikrovasküler çoğalma, nekroz vb.) göre oluşturulmaktadır. Tümörün anaplazi özellikleri gösterip göstermemesine göre kötü huyluluk derecesi belirlenir. Yetişkinlerde sıklıkla WHO aşama II, WHO aşama III ve IV tipinde glioma vakaları meydana gelmektedir. Pilositik astrositom ve ependimom gibi gliomalar daha az sıklıkla oluşur ve bu tip tümörlere sahip olan hastalar daha iyi seyirli devam ederler. Çocuklarda sıklıkla karşılaşılan glioma çeşitlerinden birisi de pilositik astrositomdur [15].

Son yıllarda gliomaların yetişkin ve çocuklarda moleküler patojenezini anlamada büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Gliomaların epidemiyolojik ve patofizyolojik özelliklerini anlayarak daha iyi tanı ve tedavi mümkündür.

Türkiye'de Glioma ile ilgili herhangi bir istatistiksel çalışma bulunmamakla beraber Amerika Birleşik Devletleri'nde 2007 ve 2011 yılları arasında her 100.000 kişiden 21.4'ünün birincil beyin tümörüne sahip olduğu ve her 100.000 kişiden 6.6'sının Glioma, bunların yarısının ise glioblastoma olduğu belirlenmiştir. Glioma vakalarının genellikle yaşla birlikte arttığı gözlemlenmiştir [16].

Yapılan çalışmalarda alerji veya IgE seviyelerini arttıran atopik hastalıkların varlığı ile azalmış glioma riski arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Ancak bu ilişkinin altında yatan mekanizma henüz bilinmemektedir [17]. Bazı çalışmalarda ise yangı ve glioma riski arasındaki ters ilişki olduğu belirtilmiş ancak bu durumda henüz ispatlanamamıştır [18, 19].

Glioma vakaları bazı nadir kalıtsal hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. Nörofibromatozis tip 1 hastalığı pilositik astrositom; nörofibromatozis tip 2 ise omurga ependimom; tüberküloz ise dev hücre astrositomlarla ilişkilendirilmiştir. Li – Fraumeni sendromu ve Turcot sendromu da aynı zamanda artan glioma vakalarıyla ilişkilendiriliştir. Biyolojik olarak önemli bir etken olsa da kalıtsal sendromların yalnızca gliomaların %1'inden sorumlu olduğu belirtilmiştir [20].

Glioma geçmişi bulunan ailelere yapılan tam genom dizileme analizleri sonucu, telomerlerin korunmasında görevli protein POT1 geninde mutasyonlar bulunmuş ve bu durum kalıtsal olarak oligodendrogliomalarla ilişkilendirilmiştir [21, 22]. Genom çapında yapılan çalışmalar CDCD26, PHLDB1, TP53, EGFR, CDKN2a-2b lokuslarında bulunan tek nükleotit polimorfizm (TNP) mutasyonlarının artmış glioma riskiyle ilşkisini ortaya koymuştur [23-26]. Aynı zamanda telomeraz ters transkriptaz (TERT) ve telomeraz RNA bileşeninden sorumlu genlerin de artmış glioma riskinden sorumlu tutulabileceği ifade edilmektedir [27, 28].

2.2 Glioma Patofizyolojisi

Diğer pek çok tümörlerle benzer bir şekilde, glioma temel olarak hücrelerin genetik hastalığıdır. Spesifik bir şekilde meydana gelen genetik değişiklikler beyin tümörlerinin klinik özelliklerini etkilemekte ve aynı zamanda birincil beyin tümörlerinin sınıflandırılması ve teşhisinde esas alınmaktadırlar.

2.2.1 Sınırlı Büyümeli Glioma

Bu gruptaki tümörler pilositik astrositom, pleomorfik ksantoastrositom ve SEGA olmak üzere üç sınıflandırmada incelenir. Genellikle çocuk ve genç yetişkinlerde kendini gösteren bu gruptaki tümörler yavaş ve genellikle sınırlı bir büyüme gösterirler. Nörofibromatozis tip 1 hastalığına ve pilositik astrositoma sahip hastalar nörofibromin 1 (NF1) geninin ve bulunduğu MAPK yolağının tümör

oluşumunda rol oynadığını göstermektedir [29]. NF1 mutasyonu dışında MAPK yolağında BRAF geninde oluşan diğer tekrarlı nokta mutasyonlar aynı zamanda sporadik pilositik astrositoma işaret etmektedir [30]. Yeni nesil dizileme analizleri sonucunda pilositik astrositomun sadece tek bir yolakta meydana gelen bir hastalık olduğu başka herhangi bir yolakta meydana gelen mutasyonlarla ilgisi olmadığı ispatlanmış ve bu çalışmalar sonucunda hedeflemeli tedavilerin yolu açılmıştır [31]. Pilositik astrositom tedavisi için özel MAPK yolak inhibitörleri de araştırılmaktadır.

Pleomorfik ksantoastrositom ise yüksek derecede hücresel pleomorfizmin kötü huylu tümörlerle karıştırılmasından dolayı teşhisi en zorlu tümör tiplerinden birisidir. Genellikle iyi klinik özelliklere sahip olmasına rağmen bazı durumlarda kötü huylu bir seyir alabilir. Teşhis için histolojik kriterler hala tam olarak tanımlı değildir. Yaklaşık olarak vakaların %60'ı CDKN2A veya CDKN2B genlerinin homozigot olarak silinmesiyle oluşan BRAF mutasyonlarıyla tetiklenir [32]. Fare modellerinde yapılan çalışmalarda, pleomorfik ksantoastrositom hastalığının BRAF mutasyonu ile beraber öncül kök hücrelerde meydana gelen CDKN2A silinmesiyle oluştuğu gözlemlenmiştir [33, 34].

SEGA tipinde tümörler ise tüberküloz sahibi hastaların nadir otozomal baskın kalıtımlarından dolayı oluşur [35]. Bu nedenle bu hastalarda TSC1 veya TSC2 geninin inaktivasyonu ya da mutasyonu görülmektedir. Bu durum da rapamisin sinyal yolağının anormal bir şekilde aktivasyonuna sebep olmaktadır. Rapamisin inhibitörleri kullanılarak yapılan tedavilerde hastalar umut verici sonuçlar elde edilmiştir. [36].

2.2.2 WHO Aşama II ve III Glioma

WHO aşama II ve III gliomaları genç erişkinlerde en sık karşılaşılan beyin tümörlerindendir. Bu gruptaki gliomalar beyin parankimasına yayılması, iyileşmeden sonra tekrar ortaya çıkması ve kötü huyluluğuyla bilinir [37]. Moleküler profilleme çalışmaları sonucunda iki ayrı alt tipe sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar TP53 mutasyonuyla birlikte gelen alfa-talasemi sendromuyla ilişkili ATRX geni mutasyonu (astrositik tip) veya kromozomal silinmelerle birlikte gelen TERT öncü mutasyonuyla (oligodendroglial tip) bilinirler. Her iki gliomanın genotipinde IDH1 mutasyonu veya daha nadir olarak IDH2 mutasyonu bulunur [38].

IDH mutasyonunun tümör tetikleyici değişime sebep olduğu düşünülmektedir [39]. IDH enzimleri normalde izositratı oksidatif dekarboksilasyona uğratarak alfa-ketoglutarata dönüştürmektedir. Bu nedenle IDH – mutant gliomalar artmış R(-)-2-hidroksiglutarat seviyeleri ve azalmış NADPH üretimi göstermektedir [40]. Bu durum artmış histon metilasyonuna ve CpG adalarının hipermetilasyonuna sebep olarak IDH – mutant gliomalar için bir biyobelirteç haline gelmiştir. Fakat IDH mutasyonu tek başına glioma gelişmesi için yeterli değildir. IDH – mutant nöroglial veya öncül kök hücreler TP53 veya ATRX mutasyonu gibi ek genetik değişikliklere ihtiyaç duyar [41]. İkincil WHO IV glioblastomaya dönüşüm, genel olarak astrositik genotipte gözlemlenir ve CDKN2A – CDKN2B lokuslarının silinmesiyle meydana gelebilir [42]. Birçok IDH inhibitörü içeren tedavi ve aşılar erken klinik değerlendirme aşamasındadır [43].

2.2.3 WHO Aşama IV Glioblastoma

WHO aşama IV glioblastoma genellikle 50 yaş üzeri hastalarda görülmekle beraber oldukça kötü huylu bir seyir izler. Fakat glioblastoma genotipik olarak yaşlı glioblastomadan farklı bir formda çocuklar, ergenler ve genç erişkinlerde de görülebilir. Son yıllarda gen bazında yapılan çalışmalarda glioblastoma tipi tümörün DNA metilasyonu ve farklı mutasyonlara sahip en az altı adet alt türü bulunmuştur [44]. Bunlardan iki alt tür H3F3A geninde anlamsız mutasyonuna ve DNA hipometilasyonuna sahip pediyatrik glioblastomayı oluşturmaktadır. Üçüncü alt tür ise g-CIMP ile ilişkili IDH mutasyonu ve pronöral mRNA ifadesine sahip özelliktedir. Bu alt gruptaki tümör çoğunlukla genç erişkinlerde meydana gelmekte olup genellikle WHO aşama II ve III tümörlerinden IDH mutasyonuyla dönüştüğü düşünülmektedir. H3F3A ve IDH mutasyonuna sahip bu alt gruplar aynı zamanda TP53 ve ATRX mutasyonu taşıyabilmektedirler. Dördüncü glioblastoma alt grubu ise moleküler olarak PDGFRA geninin amplifikasyonu ile tanımlanmış olup çoğunlukla ergen ve genç erişkinlerde ortaya çıkmaktadır. Bu alt grup RTK I sınıfına girip IDH mutant alt grupla aynı pronöral ifadeye sahiptir. Glioblastomaya sahip elli yaş üzerindeki çoğu hasta epigenetik olarak sınıflandırılan “klasik (veya RTK II)” ve “mezenkimal” alt gruplarına girer. Bu alt gruplar kendilerine has mRNA ifadelerine

sahiptirler. Ek olarak RTK II alt grubu diğer glioblastoma alt grupları arasında en çok EGFR gen amplifikasyonuna sahip gruptur [42].

Glioblastoma tümörlerinin sahip olduğu genetik değişiklikler MAPK ve protein kinaz B sinyal yolakları gibi birçok tümör başlatıcı yolakların anormal bir şekilde aktifleşmesine sebep olur. Ek olarak, p53 ve retinoblastoma protein 1'e bağlı apoptoziz ve hücre dönüşümünü kontrol eden tümör baskılayıcı yolaklar da bu tümör grubunda oldukça bozulmuştur. Sonuç olarak, hızlı tümör büyümesi doku hipoksisine sebep olarak nekroz ve damar oluşma faktörü VEGF'yi etkileyerek tümörlü dokunun etrafında damar oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Glioblastomanın bir başka önemli özelliği ise hastanın bağışıklık sistemini etkileyerek tümör baskılama mekanizmasını zayıflatmasıdır [21].

2.3 Geleneksel Tedavi Yöntemleri

Glioma tedavisi tümörün lokasyonu, sınıflandırılması, boyutu ve aynı zamanda hastanın yaşı, genel sağlığı ve beslenme gibi birçok etkene bağlı olarak değişmektedir.

Genellikle tümörün çıkarılmasına ek olarak aynı zamanda tümörün getirdiği semptomları azaltmak için ilaç tedavisine başvurulmaktadır. Cerrahi müdahale birçok glioma çeşidinde uygulanan ilk adımdır. Bazı durumlarda tümörlü dokunun küçük olması ve çevredeki sağlıklı dokulardan ayrılmasının kolay olmasından ötürü cerrahi müdahale mümkündür. Fakat diğer durumlarda tümörlü doku çevre dokulardan ayrılamaz veya beyindeki hassas dokuların yakınlarında konumlanmış olabilir. Bu durumda tümörlü dokunun sadece alınabilecek kısımları alınır. Tümörün küçük bir kısmının uzaklaştırılması bile hastalığın getirdiği etkilerin azalmasına yardımcı olmaktadır [45]. Cerrahi müdahalelerin kan kaybı ve yangı gibi riskleri bulunmaktadır.

Cerrahi müdahale sonrasını genellikle ışın tedavisi takip etmektedir. Işın tedavisinde tümör hücrelerini öldürmek için X-ray veya proton gibi yüksek enerjili ışınlar kullanılır. Glioma derecesi ve diğer prognostik faktörler ışın tedavisinin zamanı ve çeşidini etkilemektedir [46].

Radyasyon tedavisine ek olarak hastalara aynı zamanda kemoterapi de uygulanmaktadır. Kemoterapi ilaçları damardan enjeksiyon veya oral yolla hastaya verilmektedir. En sık kullanılan ilaçlardan birisi hap olarak alınan ve etken maddesi temozolomide olan "emodar®'dır. Kemoterapinin en sık karşılaşılan yan etkileri mide bulantısı, kusma, baş ağrısı, saç dökülmesi, ateş ve bağışıklık sisteminin zayıflamasıdır. Bütün bu tedavi yöntemleri glioma sınıflandırması, hastalığın seyri, hastanın yaş ve sağlık durumu gibi etkenlerle değişmektedir [47].

Glioma türüne ve tümör büyüklüğüne bağlı olarak hastaların motor fonksiyonları, iletişim ve bilişsel yetenekleri, genel fiziksel ve sosyal yaşamı olumsuz etkilenmektedir Cerrahi müdahaleler de hastada akut fonksiyonel yetersizliklere sebep olabilirken ışın tedavisi de bilişsel yeteneklerin bozulmasında ana etkenlerden biridir. Kemoterapi de hematolojik ve akut toksisiteye sebep olabilmektedir. Bütün tedavilerin ortak yan etkisi ise kronik yorgunluktur. Sıklıkla kullanılan ilaçlar halsizlik, kas zayıflığı, kilo alımı ve mide bulantısına sebep olmaktadır. Bu ilaç türlerinden biri olan kortikosteroitler uzun süreli kullanım sonucunda depresyon, osteoporozis, diyabet ve hipertansiyona sebep olmaktadır [48]. Kemoterapi ve ışın tedavisinin sebep olduğu bu yan etkilerden dolayı araştırmacılar birçok yönden daha avantajlı olan ilaç taşıma sistemlerine yönelmiştir [49].

2.4 İlaç Taşıma Sistemleri ile Tedavi

Geleneksel tedavi yöntemleri ilaçların emilimine dayalıdır, bu nedenle ilacın biyoyararlanımı; çözünürlük, pKa, moleküler ağırlık, hidrojen bağ sayısı ve kimyasal kararlılık gibi değişkenlerden etkilenirler. Bütün bu etkenler ilacın etkinliğinin artmasında ve dolayısıyla tedaviye cevabın iyileşmesinden sorumludur[50].

Geleneksel terapötikler sahip oldukları düşük moleküler ağırlık sayesinde vücudun çeşitli bölgelerine ve hücre içi organellere ulaşabilmektedirler. Bu nedenle bu ilaçlar hastalıkların tedavisinde oldukça uygundur. Fakat bu ilaçların vücuttaki gelişigüzel dağılımı birçok yan etkiye sebep olmakla birlikte tatmin edici farmakolojik etkinin alınabilmesi için de yüksek dozlara ihtiyaç duyulmasıyla sonuçlanmaktadır. Sahip oldukları düşük moleküler ağırlıktan dolayı hızlı böbrek emilimi, protein

bağlanması, lipofilite, iyonlaşabilme özelliği gibi etkenler sık sık ve yüksek miktarda doz alımına sebep olmaktadır [51].

Araştırmacılar dozların miktar ve verilme sıklığının azalması aynı zamanda daha iyi farmakolojik yanıt için yeni formülasyonlar geliştirmektedirler [52, 53]. Buradaki amaç daha düşük doz ve uygulanma sıklığı ile yan etkilerin minimuma indirilmesi ve aynı zamanda bu ilaçların biyoyararlanımının arttırılmasıdır. Biyoyararlanım, ilacın fiziksel ve kimyasal özellikleri, doz miktarı ve konsantrasyonu, ilacın verilme sıklığı ve yoluna bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle araştırmalar ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin arttırılarak geliştirildiği ilaç taşıma sistemlerine yoğunlaşmıştır [54].

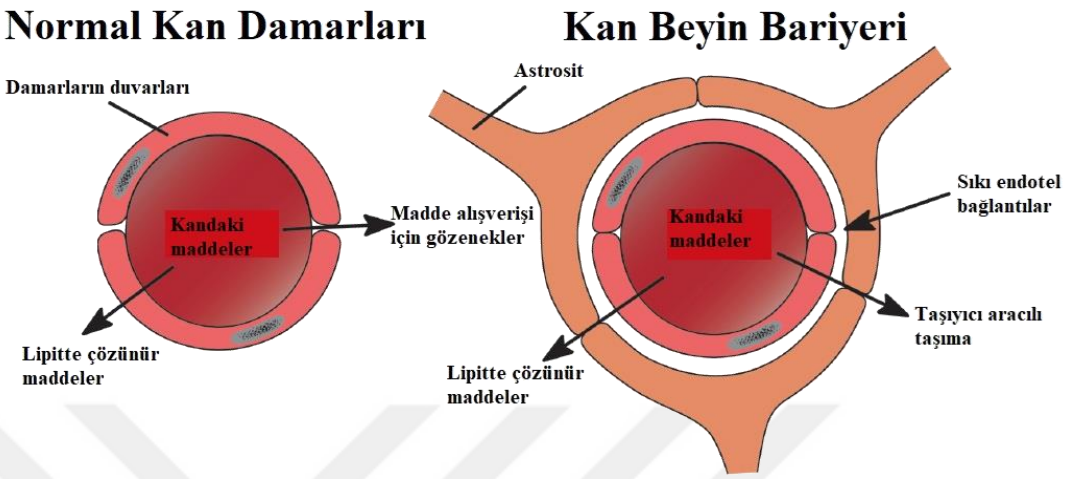
İlaç taşıma sistemleri kontrollü salım, hastalıklı bölgeyi hedefleme, ilacın çözünürlüğünün arttırılması, bağışıklık sisteminden gelen yanıtı azaltma, görüntüleme gibi avantajlar sağlamaktadır. Böylelikle ilacın sabit konsantrasyonda hastalıklı bölgede salımı ile daha düşük miktarlarda daha iyi farmakolojik yanıt ve sağlıklı hücrelerin daha az etkilenmesiyle yan etkilerin minimuma indirilmesi amaçlanmaktadır [55].

Geleneksel tedavilerin eksikliklerinin yanı sıra glioma tedavisindeki en büyük engellerden bir diğeri de kan beyin bariyeridir. Kan beyin bariyeri beyni vücuttan ayıran, vücuttaki toksinlerden ve hastalıkların etkisinden koruyan fiziksel bir bariyerdir. Kan beyin bariyeri; birbirine sıkı bağlantılarla bağlı endotel hücre tabakalarından oluşarak kanı beynin ekstraselüler sıvısından ayırır (Şekil 2.1) ve sahip olduğu seçici geçirgenliğinden dolayı oldukça benzersizdir [56].

Kan beyin bariyerinin sahip olduğu bu düşük geçirgenliğin sebepleri arasında;

- Pinositotik keselerin azlığı,
- Endotel hücrelerde bulunan mitokondri sayısının fazlalığı,
- Sıkı bağlantıların varlığı,
- GLUT1 glukoz taşıyıcısı, LAT1 amino asit taşıyıcısı, aktarıcı reseptörler, insülin reseptörleri, lipoprotein reseptörleri, efflux pompaları ve multi-ilaç dirençli proteinlerin varlığı,

- Astrosit, perisit, makrofaj ve nöronların oluşturduğu ikinci bir katman,
- Lenfatik drenaj ve lenfosit, makrofaj, mast hücreleri gibi bağışıklık sistemi ajanlarının azlığı sayılabilir [57-59].

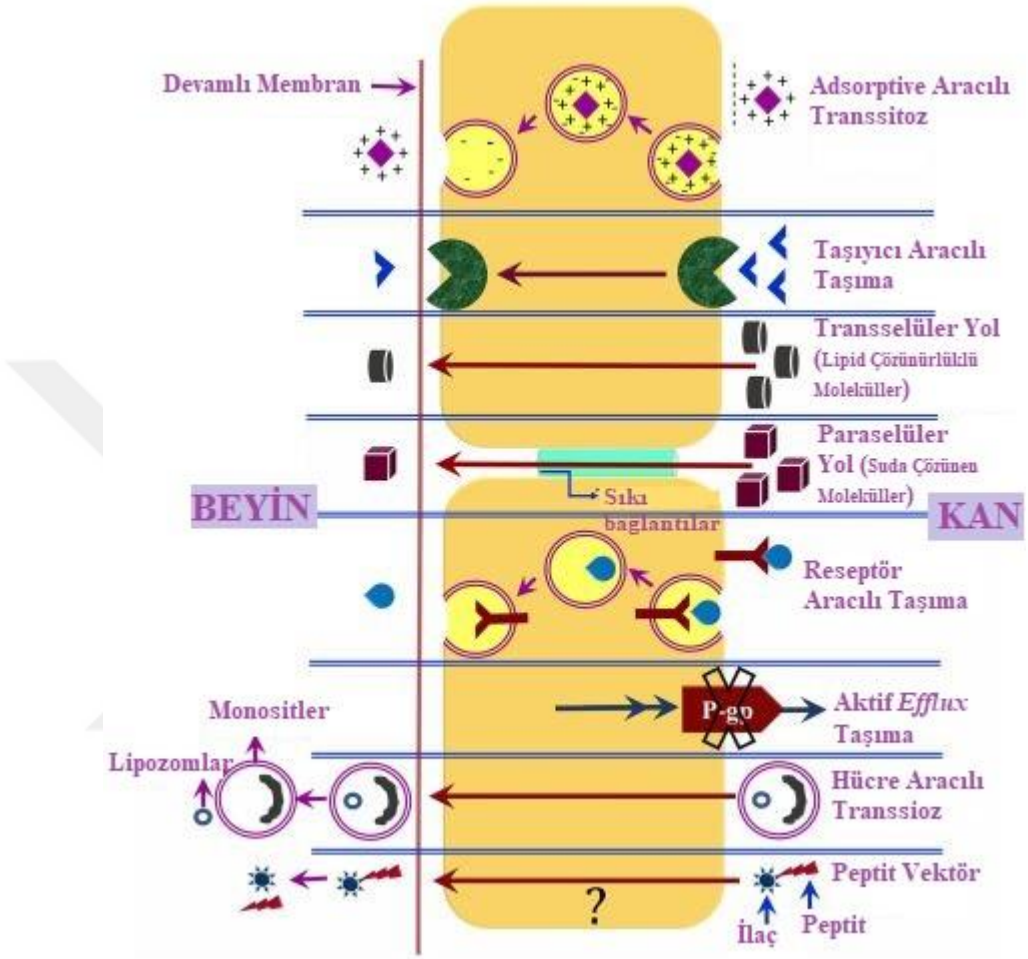


Şekil 2.1 Kan beyin bariyerinin şematik temsili [60]

Adsorptif aracılı taşıma (Şekil 2.2), polikatyonik peptid veya proteinlerin endotel hücrelerin yüzeyinde bulunan mikro-anyonik parçalara elektrostatik etkileşimlerle bağlanmasıyla gerçekleşir. Yapılan bir çalışmada doksorubisin yüklü katı lipit nanopartiküllerine bağlanan katyonik sığır serum albüminin glioblastoma hücre hatlarına transitozis ile girdiği ve daha iyi farmakolojik sonuçlar alındığı görülmüştür [61].

Beyin endotel hücrelerinde P-glikoprotein (P-gp) ve multi-ilaç dirençli proteinler gibi birçok ilaç efflux pompaları bulunmaktadır. Bu efflux pompaları beyne ulaşabilmiş ilaçların geri dışarı atılımından sorumludur ve ilaçların taşınmasında oldukça önemli bir engeldir. Bu pompalar birçok katyonik, amfifilik ve lipofilik molekülleri beyinden dışarı taşıyabilir. Bu nedenle bunların engellenmesi oldukça önem taşımaktadır. VEGF reseptörünün bilinen bir inhibitörü olan Cediranib birçok gliobastoma tümör çeşidinin tedavisinde kullanılmaktadır. Cediranib P-gp için bir substrattır, bu nedenle tek başına kan beyin bariyerini aşması zordur. Bundan dolayı genellikle P-gb inhibitörü olan GF120918 ile birlikte verildiğinde farelerde kan beyin bariyerini yüksek miktarlarda aşabildiği gösterilmiştir [62].

Glukoz, vitamin, amino asit ve nöropeptidler gibi endojen maddelerin kan beyin bariyerini spesifik taşıyıcılarla aştığı bilinmektedir. Bazı ilaçlar kimyasal olarak değiştirilerek yapıları endojen maddelere benzetilerek kan beyin bariyerini aşmaya çalışılmıştır [63].



Şekil 2.2 Kan beyin bariyerinde bulunan fizyolojik taşıma mekanizmaları [64]

Glioma ve glioma çeşitlerinde hücre yüzeyinde bulunan bazı reseptörlerin miktarlarında artış görülmüştür. Bu durumdan ilaç taşıma sistemlerinin aktif hedeflenmesinde yararlanılmaktadır. Bu reseptörlere uygun spesifik ligant bağlı çeşitli taşıma sistemleri araştırılmıştır. Ligant reseptöre bağlandığında reseptör aracılı endositoz gerçekleşerek ilaç taşıma sisteminin kan beyin bariyerini aşarak içeri alındığı görülmüştür [65-67]. Geleneksel tedavi yöntemlerinde tek başına liganta bağlı olan ilaç hücre içerisine alındıktan sonra lizozomlar, enzimler ve endozomlar tarafından indirgenebilir. Bu durum ise ilacın aktivitesini kaybetmesine

neden olur. İlaç taşıma sistemleri tarafından korunan ilacın ise bu durumdan kaçması mümkündür. İlaç taşıma sistemleri tasarlanırken hedef alınan spesifik reseptörlerden bazıları transferrin, folat, lipoprotein reseptör bağlantılı protein (LRP), radikal temizleyici reseptörler, interlökin-13 reseptör alfa-2, insülin ve glutamat reseptörleridir [68, 69].

İlaçların hücrelerin kendisini kullanarak taşınmasına hücre aracılı taşıma denir. Bu hücreler herhangi bir beyin kaynaklı rahatsızlık durumunda bağışıklık sisteminin yangılı bölgeye yolladığı makrofajlar, monositler ve nötrofillerdir. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerinin kullanıldığı bir çalışmada monositlerin bu partikülleri yangılı beyin bölgesine taşıyarak ilacın yüksek oranda kan beyin bariyerine nüfuz etmesini sağlamıştır. Bu stratejinin en büyük dezavantajları düşük ilaç yüklenme kapasitesi, ilacın erken salınması ve taşıyıcı hücresini seçememektir [70, 71].

Glioma tedavisinde kan beyin bariyerini aşmak için kullanılan ilaç taşıma sistemleri;

- Mikropartiküller,
- Lipozomlar,
- Polimerik Nanopartiküller,
- Lipit Nanopartiküller,
- İnorganik Nanopartiküller,
- Nanojeller,
- Dendrimerler,
- Miseller,
- Nanoemülsiyonlar,
- Polimerzomlar,
- Kuantum dotlardır.

3
Nanopartiküller

3.1 Genel Bilgiler

Nanopartiküler sistemlerde ilaç partikül matriksinde çözünmüş, tutulmuş, hapsedilmiş veya nanopartikülün matriksine bağlanmış olabilir. Sentezlenme yöntemine göre çeşitli şekillerde ve boyutlarda nanopartiküller elde edilebilir [72].

Nanopartikülleri ilaç taşıma sistemi olarak tasarlamadaki temel amaç partikül boyutunu, yüzey özelliklerini ve ilaç salımını kontrol edebilmektir. Nanopartiküllerin ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmasının sağladığı avantajlar:

- Partikül boyutu kolayca kontrol edilerek pasif hedefleme sağlanabilmesi,
- Kontrollü ilaç salımının sağlanması ve böylelikle ilacın vücuttaki dağılımının hastalıklı bölgede yoğunlaşması ve yan etkilerin azaltılması,
- Kontrollü salımın ve partikül degredasyonunun kontrol edilebilmesi,
- İlaç yükleme kapasitesinin yüksek oluşu ve ilaçların herhangi bir kimyasal modifikasyona uğramadan sisteme yüklenebilmesi,
- Hedefleme ajanlarıyla istenilen bölgeye ilaç taşınabilmesi,
- Birçok ilaç verilme yoluyla (oral, nazal, parenteral, intra-okular vb.) verilebilmesidir [73].

Bütün bu avantajlara rağmen nanopartiküllerin birçok dezavantajı da bulunmaktadır. Aglomerasyon, erken salım, "burst" etki bunlardan bazılarıdır. Nanopartiküllerin klinik veya ticari olarak kullanılabilmesi için bu sorunların aşılması gerekmektedir.

Nanopartiküller sentezleme yöntemi ve kullanılan kimyasal içeriğe göre birçok farklı çeşitlere sahiptir. Her bir nanopartikül çeşidinin kendi içerisinde birçok avantaj ve dezavantajı bulunmaktadır. Uygun nanopartikül seçimi hedeflenen hastalık ve hastalığın patofizyolojisi, seçilen ilacın fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak yapılmaktadır [74].

3.2 Lipozom Nanopartiküller

Çift tabakalı yapıdaki lipozomlar (Şekil 3.1) sentetik veya doğal fosfolipitlerden oluşmaktadır. Geçirgenlik, yük yoğunluğu ve sterik engelleme gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri yapılarındaki fosfolipitlerin içeriğine bağlıdır. Çift katmanlı lipit yapı fosfolipitlerin yapısında bulunan hidrofobik fosfat grupları ve su gruplarının etkileşimlerinden dolayı kendi üstüne kapanmaktadır. Bu oluşum amfifilik fosfolipitlerin kendi kendine çift katman oluşturmasından dolayı kendiliğinden gerçekleşmektedir [75]. Lipozomların içerisine ilaç yüklenmesi birçok şekilde sağlanabilir:

- Çözünmüş ilaç solüsyonunda lipozom sentezi,
- Organik çözücü ve çözücü değiş tokuş yöntemi,
- Lipofilik ilaçların kullanılması,
- pH gradyan yöntemi [76].

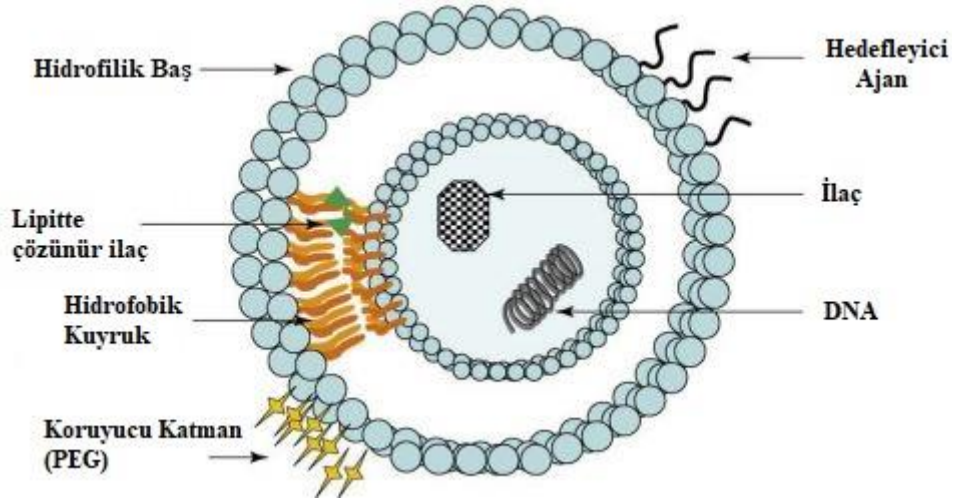
Lipozomlar hedef bölgeye ekstravazasyon ile doku içlerinde bulunan boşluklardan sızarak ulaşır. Lipozomlar dış yüzeylerine ek moleküller eklenilerek aktif hedefleme veya pasif hedeflemeyle spesifik dokulara yönlendirilebilir.

Lipozomların kullanıldığı alanlardan birisi de multi ilaç dirençli kanser türleriyle savaşmaktır [77]. İlaç direncinin oluşmasından sorumlu etkenler:

- Hücre içi üretimi çoğalmış enzimlerden dolayı artan ilaçların metabolik yıkımı,
- İlaç taşıma grupları ve *efflux* pompaları,
- Hedef moleküllerde meydana gelen nokta mutasyonlarıdır.

Ogawara ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PEG kaplı ve doksorubisin yüklü lipozomların multi-ilaç direncine sahip kolon kanseri hücrelerinde oldukça etkili oldukları gözlemlenmiştir [78].

Protein bazlı nanopartiküller (PBN) biyobozunur olmaları ve kolayca yüzeysel veya kimyasal modifikasyona uğramalarından dolayı oldukça kullanışlıdırlar. Bundan dolayı ilaçların kovalent bir şekilde PBN'lere bağlanmaları ve hedef bölgeye taşınmaları mümkündür [79].



Şekil 3.1 Çift katmanlı Lipozomun yapısı [80]

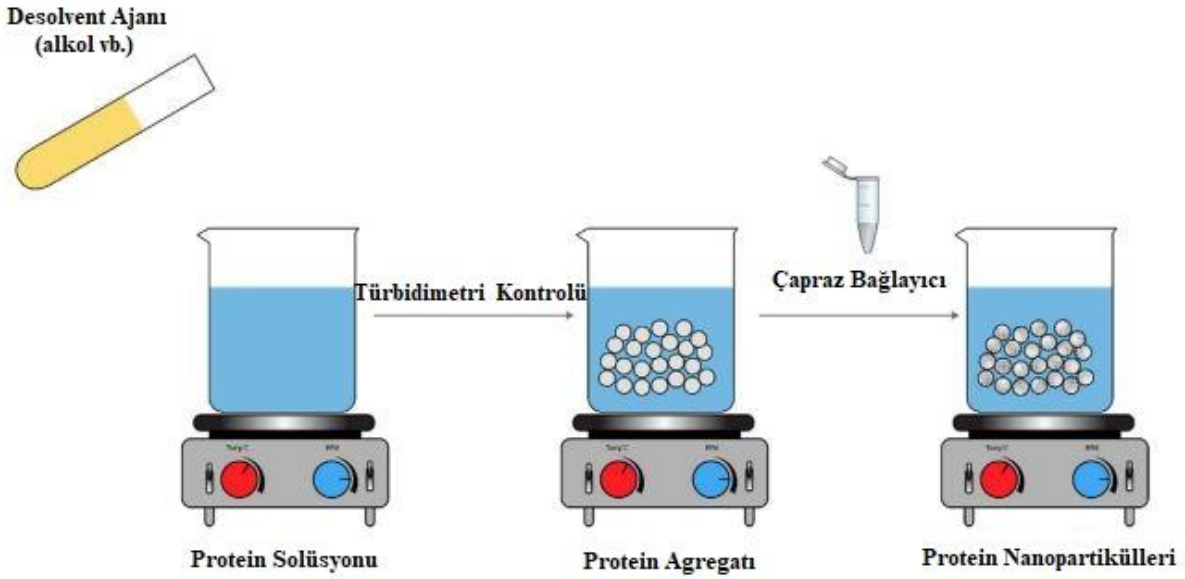
3.3 Protein Bazlı Nanopartiküller

PBN sentezlemek için hayvan veya bitki temelli birçok protein kullanılabilir. Bunların kendi içerisinde çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Hayvan kaynaklı proteinler vücut tarafından metabolik yıkıma uğradıklarında oluşan son ürünlerin düşük toksisitede olması sentetik polimerlere göre daha iyi bir avantajdır. Fakat hayvan temelli proteinlerdeki en büyük risk iyi steril edilememeleri ve bundan dolayı patojen kaynaklı yangı oluşma tehlikesidir [81].

Bitki temelli proteinler ise sahip oldukları hidrofobik karakterden dolayı hayvan kaynaklı proteinlere göre daha avantajlıdır. Bu durum toksik kimyasal çapraz bağlayıcılardan kaçınılmasını sağlayabilir. Aynı zamanda hayvan kaynaklı proteinlerden daha ucuz olmaları da bir diğer avantajlarıdır [82].

Proteinlerin ve ilaçların fiziko-kimyasal özellikleri PBN sentezini etkilemekle birlikte literatürde birçok sentez yöntemi mevcuttur. Bunlar desolvasyon, koaservasyon, emülsifikasyon, nanoçöktürme, nano sprey kurutma, elektropüskürtme ve çapraz bağlama gibi yöntemlerdir. Nanopartiküllerin oluşması proteinin açılma özelliği ve hidrofobik moleküler etkileşimlerin azalmasına bağlıdır. Nanopartikül sentezi sırasında proteinin sahip olduğu kompozisyon, konsantrasyon, reaksiyon koşulları (pH, iyonik kuvvetler, çözücü vb.) ve çapraz bağlama yöntemine göre protein çeşitli konformasyonel değişikliklere uğrar [83].

Sentez yöntemlerindeki değişikliklere rağmen ilacın enkapsülasyon yöntemi (Şekil 3.2) her zaman çöktürülmesine dayanır. Bu çöktürme işlemi kullanılan makromolekülün reaksiyondaki çözünürlüğünün düşmesine karşılık gerçekleşir. Bu reaksiyona çözücü olmayan solüsyon eklenerek veya pH, sıcaklık ve tuzluluk oranı gibi çeşitli fiziko-kimyasal özellikleri değiştirerek gerçekleştirilebilir [84].



Şekil 3.2 Protein bazlı nanopartikül sentezi [85]

3.4 Biyolojik Nanopartiküller

Biyolojik nanopartiküller doğada kendiliğinden oluşan nanopartiküllerdir. Biyolojik bir nanopartikül biyolojik sistem tarafından sentezlenen, kendiliğinden şekil alan ve bir boyutlarının uzunluğu 1 – 100 nm arasında değişen partiküller olarak tanımlanır. Bu partiküller magnetozomlar gibi hücre dışı yapıda olabilirken aynı zamanda lipoprotein ve virüsler gibi hücre içi yapıda da olabilirler. Mineral depolanmasından hücreler arası iletişime kadar çeşitli görevleri bulunmaktadır. Biyolojik nanopartiküller ekzozomlar, lipoproteinler, ferritinler, magnetitler ve virüslerden oluşmaktadır [86].

3.4.1 Ekzozomlar

Ekzozomlar makromoleküllerin salınmasında görev alan nano boyuttaki keseciklerdir. İlk defa 1980 yılında nanokesecik olarak tanımlanmışlardır [87]. Bu

küçük kesecikler birçok hücre tarafından salınmaktadır. Aynı zamanda plazma, ürin, tükürük, anne sütü ve amniyotik sıvı gibi birçok vücut sıvısında da bulunmaktadırlar [88]. Lipit çift katmanından oluşurlar ve boyutları yaklaşık olarak 50 – 160 nm arasındadır. İçerdikleri miRNA'dan dolay hastalık teşhislerinde biyobelirteç, antijen içeriklerinden dolayı aşı geliştirmede ve hedeflemeli ilaç taşınmasında kullanılabilirler [89].

3.4.2 Lipoproteinler

Lipoproteinler, lipitler ve proteinlerden oluşan kendi kendine şekil alabilen 7 – 80 nm arasındaki nanopartiküllerdir. Lipoproteinler ilk olarak karaciğer ve bağırsaklarda sentezlenip çevre dokular tarafından kullanılırlar. Kendi kendine şekil alabilmeleri, spesifik doku ve organlara hedeflenebilmeleri ve hidrofobik ilaçları taşıyabilmelerinden dolayı tanı ve tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar [90].

3.4.3 Ferritinler

Organik nanopartiküllere ek olarak organizmalar aynı zamanda inorganik nanopartiküller de üretmektedirler. Ferritin de bunlardan birisidir. Ferritin bakteri, arke ve ökaryotlarda sentezlenilmektedir [91]. Protein nanokafes olarak da adlandırılan ferritinlerin birincil görevi demir oksitlerin taşınmasıdır. Demir deposu olarak hareket eden ferritin demirin oksidasyonu sayesinde hidroksil radikallerin oluşumunu engeller. Ferritin demir oksit çekirdeği MR görüntüleme ajanlarının geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Çeşitli proteinlerle de hedeflendirilerek istenilen bölgede görüntüleme ve tanı imkânı sağlayabilirler [92].

3.4.4 Magnetitler

Magnetitler de ferritinler gibi inorganik nanopartikül olup magnetotaktik bakterilerin magnetozom adlı organellerinde sentezlenir [93]. Magnetozomlar 50 – 70 nm boyutları arasında olup bakterinin dünyanın manyetik alanına odaklanıp daha bol oksijen bulunan yerleri bulmasını sağlar. Magnetozomlar ağır metallerin sudan uzaklaştırılması, manyetik ayırma, reseptör bağlanma yöntemleri ve DNA ekstraksiyonu gibi alanlarda kullanılmaktadır [94].

3.4.5 Virüsler

Virüsler çoğalabilmek için canlı bir hücreye ihtiyaç duyan, birçok çeşide sahip ve yangıya sebep olan küçük partiküllerdir. Her bir virüs kapsit proteinlerden oluşan DNA veya RNA içeren bir çekirdek yapıya sahiptir. Doğada küre, çubuk veya ikosahedron gibi birçok şekillerde bulunabilirler [95]. Çoğu biyolojik uygulamada virüs yapılı nanopartiküller içerisinde nükleik asit bulunmayan viral kapsitlerinin kullanılmasıyla yapılır. Böylelikle canlıda herhangi bir yangıya veya hastalığa sebep olmamaktadırlar. Virüs yapılı nanopartiküller nanoreaktör, aşılama, antikanser ajan, görüntüleme ajanı veya ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmaktadırlar [96].

3.5 İnorganik Nanopartiküller

İnorganik nanopartiküller son yıllarda biyoteknoloji alanında oldukça sık kullanılmaktadır. İnorganik nanopartiküllerin en büyük avantajı doğal olarak sahip oldukları optik ve süperparamanyetik özellikler ve biyolojik aktiviteleridir (antibakteriyel veya spesifik hücre-doku etkileşimleri vb.). İnorganik nanopartiküller oligonükleotit, peptid, ligand, protein veya antikorların immobilizasyonunda, aynı zamanda sahip oldukları optik ve manyetik özellikleri sayesinde ise görüntüleme/medikal cihaz yapımında sıklıkla kullanılmaktadırlar [97]. İnorganik nanopartiküller demir oksit, silika, altın, gümüş ve kuantum noktalardan oluşmaktadırlar.

Manyetik nanopartiküller manyetik alana maruz bırakıldıklarında süper paramanyetik atom gibi davranırlar. Demir oksitler (Fe_3O_4) süperparamanyetik olmaları, düşük toksisite ve maliyet, biyouyumluluk gibi özelliklerinden dolayı in vitro ve in vivo tanı uygulamalarda oldukça sık kullanılmaktadırlar [98]. Demir oksit nanopartiküller biyomoleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında, DNA/RNA hibridizasyon ve tanımlanmasında, protein ve nükleik asitlerin teşhisinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda görüntü kontrast ajanı olarak da sıklıkla tercih edilmektedirler [99].

Silika nanopartiküller biyomoleküler adsoprsiyon, biyogörüntüleme, ilaç taşıma ve teşhis sistemlerinde kullanılan bir diğer inorganik partiküllerdir [100].

Altın nanopartikülleri yüksek yüzey alanı/hacim oranı, sıvı solüsyonlarda kolayca çözünme, monodispers olmaları ve küçük boyutları, düşük toksisitesi, kolay sentezi, optik ve elektrokimyasal özellikleri sayesinde en sık kullanılan inorganik nanopartiküller arasındadır. Biyosensör, ilaç ve gen taşınması, kanser terapisi ve görüntülemede altın nanopartiküller sıklıkla kullanılmaktadırlar [101].

Gümüş nanopartiküller kataliz, optik, nanoteknoloji ve biyomühendislik alanında kullanılan metalik ve inorganik partiküllerdir. Kimyasal indirgenme, elektrokimyasal yöntemler, fotokimyasal, lazer ve biyokimyasal birçok yöntemle sentezlenebilirler [102].

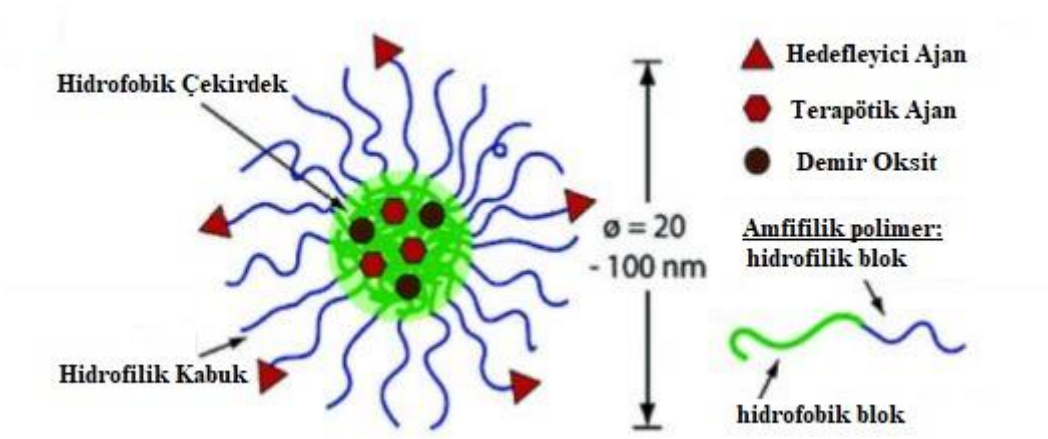
Kuantum dotlar yarıiletken, üç boyutlu ve birkaç nanometreden oluşan nanokristallerdir. Fotokararlılıkları ve iyi tanımlanmış spektral özelliklerinden dolayı biyomedikal tanı ve tedavi (teranostik) alanında işaretleyici veya prob olarak sıklıkla kullanılırlar [103].

3.6 Hibrit Nanopartiküller

Son yıllarda onkolojiye yönelik birden fazla nanoyapı ve nanobileşen içeren nanoaygıtlar geliştirilmiştir [104]. Buna en iyi örnek iki adet nanoyapının özelliklerinden faydalanılan tümör görüntüleme alanıdır. Süperparamanyetik özelliklere sahip demir oksit nanopartiküller ve floresans özelliklere sahip kuantum dotların aynı anda kullanılmasıyla hem MRI görüntülemedeki kontrast arttırılabilir hem de tümör bölgesi yardım almadan gözle görülebilir hale gelebilmektedir [105, 106].

Birden fazla nanoyapıların bir araya gelmesiyle oluşan hem teşhis/görüntüleme hem de terapötik amaçlı kullanılan hibrit yapılar ise teranostik araçlar olarak tanımlanmaktadırlar. Bu sayede kullanılan nanopartiküller tedavi aşamasında gerçek zamanlı takip ve görüntülemeye imkân tanımaktadırlar.

Hibrit yapılar lipozomal hibrit nanopartiküller, misel hibrit nanopartiküller (Şekil 3.3), porlu silika hibrit nanopartiküller, polimerik hibrit nanopartiküller, viral hibrit nanopartiküller, altın ve nanotüp hibrit nanopartiküllerden oluşmaktadır.



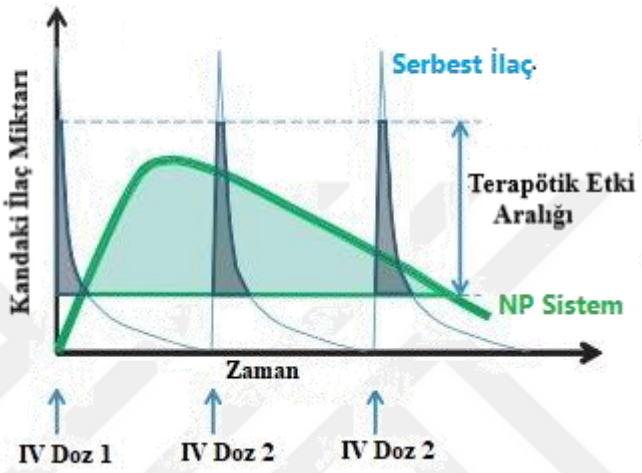
Şekil 3.3 Polimerik misel hibrit nanopartiküllerin şematik gösterimi [107]

İyi bir hibrit nanosistem tasarlamak için yapının boyutu oldukça önemlidir. Birden çok nanoyapıdan oluşan bu sistemin boyutu doğal olarak büyüktür. Büyük boyutlu yapı ise kısa süreli kanda dolaşım demektir. Bu nedenle hibrit yapılar tasarlanırken boyutlarının 20-100 nm arasında olmasına özen gösterilmelidir. Dikkat edilmesi gereken ikinci bir özellik ise hibrit yapının mekanik esnekliğidir. Hibrit yapılar lipozomlar, miseller, nanotüpler gibi esnek yapıları içerirken aynı zamanda manyetik, altın ve silika nanopartiküller gibi sert yapıları da içermektedir. Bu iki farklı tipte yapının ilacı taşıma ve salım karakterleri birbirinden farklı olacaktır. Buradaki denge iyi gözetilmelidir. Son olarak ise görüntüleme nanobileşeni hibrit sisteme ilacın yüklenmesine müdahale edecektir. Bu durum da ilaç yüklenme kapasitesinin düşmesine yol açabilir. Bu nedenle görüntüleme nanobileşeni hibrit yapı içerisinde sınırlı bir yer işgal etmelidir. İdeal bir hibrit sistemde maksimum verimlilik elde edebilmek için; terapötik molekülün içyapıda görüntüleme bileşeninin ise dış yapıda olması önemlidir. [108].

3.7 Polimer Temelli Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller (PNP) kolayca modifikasyona uğrayabilen ve birçok çeşidi olan bu nedenle en sık çalışılan nanopartikül çeşitlerindendir [72]. PNP'ler birçok şekilde, kompozisyonda ve konformasyonda sentezlenebilirler. Bundan dolayı çözünürlüğün arttırılması, immünojenik maskeleme, hedeflendirme, kontrollü salım ve zamanı kolaylıkla kontrol edilebilmektedir [73, 109].

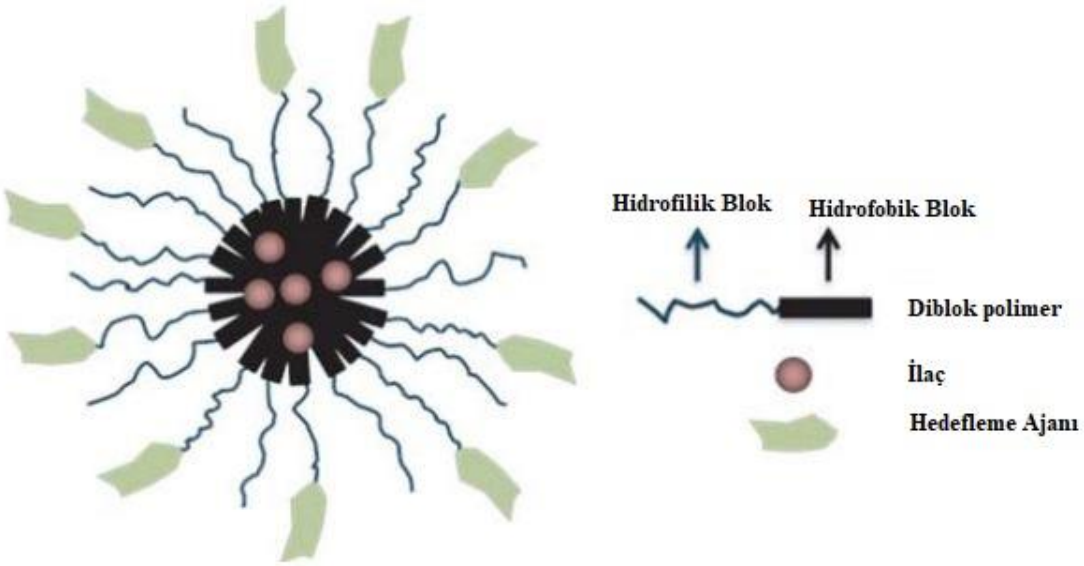
Sahip olduğu avantajları sayesinde PNP'ler tek dozda kanda uzun süre sabit bir ilaç salımı yapmaktadır. Bu sayede ilacın kandaki konsantrasyonu sabit ve terapötik etki aralığında kalmaktadır (Şekil 3.4). Serbest verilen ilaç ise vücutta metabolik yıkıma ve böbrek temizliğine maruz kaldığından konsantrasyonu kısa sürede terapötik etki aralığının altına düşmektedir. Bunun sonucunda sık sık doz tekrarı gerekmektedir [110].



Şekil 3.4 İlacın serbest olarak ve PNP taşıma sistemleriyle verilmesinin ardından zamana bağlı kandaki miktar değişimi

3.7.1 Polimerik Miseller

Polimerik miseller nanokürelerden farklı olarak amfifilik polimerlerin hidrofobik etkileşimleriyle kendi kendine oluşan polimerik nanopartiküllerdir (Şekil 3.5). Polimerik misellerin hidrofobik molekülleri su ortamında taşıma ve sabitleme yeteneklerinden dolayı oldukça kullanımı yaygındır. Hidrofobik moleküllerin serbest olarak verilmesi hedef organ ve doku tarafından alınma miktarını sınırlamaktadır. Hidrofobik ilaçların serbest olarak verilmesi aynı zamanda bağışıklık sisteminin tetiklenmesine sebep olduğundan dolayı ilaçlar yalnızca küçük dozlarda verilebilmektedirler. Polimerik miseller amfifilik yapılarından dolayı hidrofobik bölgede ilacı taşırken hidrofilik bölgeleriyle daha az immünojenik bir yapı teşkil etmektedir [96, 111].

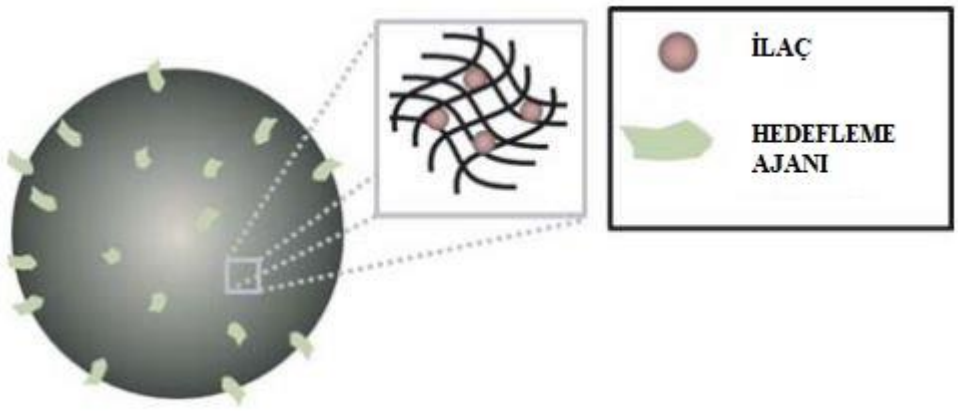


Şekil 3.5 Aktif hedefleme ajanı ile kaplı ilaç yüklü miselin sıvı ortamdaki yapısı [112]

3.7.2 Polimerik Nanojeller

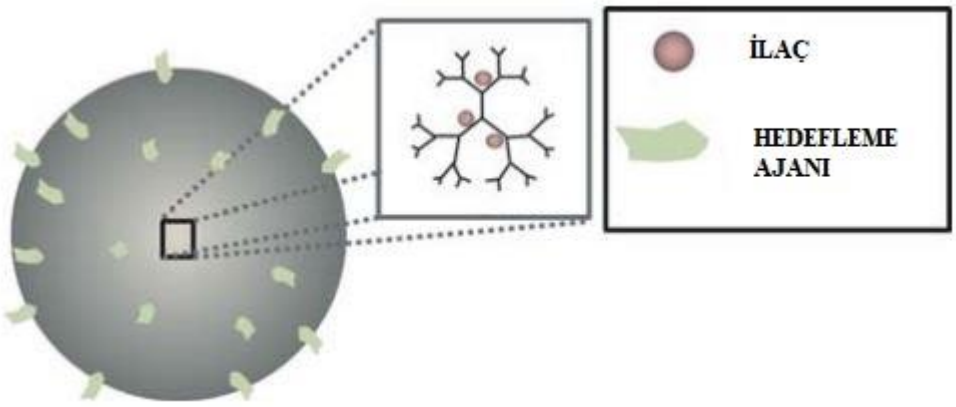
Polimerik nanojeller (Şekil 3.6) sahip oldukları çapraz bağlı yapıları, boyutları ve hazırlandıkları malzemelerin çeşitliliğinden dolayı birçok amaç ve etki için kullanılmaktadırlar. PNP'ler ve nanojeller arasındaki en büyük fark nanojellerin fiziksel veya kimyasal olan çapraz bağlı yapıları ve sulu ortamda şişebilmeleri, kimyasal yapılarına bağlı olarak pH duyarlı olmaları ve bundan dolayı pasif hedeflemede sıklıkla kullanılmalarıdır [113]. Nanojellerin şişmeleri sıvı ortama bırakıldıklarında meydana gelen protonasyon/deprotonasyon olaylarıyla oluşan çapraz bağdaki itme kuvvetler sonucunda boyutlarının artmasıyla gerçekleşmektedir. Poli(N-vinilkaprolaktam)(VCL), PNIPAAm veya poli(oligo(etilen glikol metakrilat)) (POEGMA) gibi ısıya duyarlı nanojeller de bulunmaktadır [114, 115].

Dendritik polimerler, dendrimerler, ağaç gibi dallanmış yapısı ile hidrofobik ve hidrofilik ilaçları taşıma kapasitesindedir. Son derece monodispers ve kompakt yapıya sahip olması aynı zamanda yüzey modifikasyonuna müsait olmasıyla sıklıkla kullanılan ilaç taşıma sistemlerinden biridir.



Şekil 3.6 Nanojelin şematik yapısı ve yakınlaştırılmış iç yapısı [116]

3.7.3 Polimerik Dendrimerler

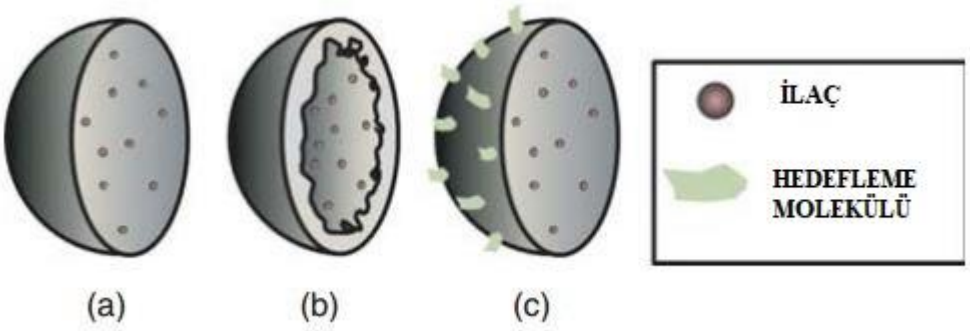


Şekil 3.7 Dendrimerlerin yapsı ve yakınlaştırılmış ilaç yüklü iç kesiti [117]

Dendrimerler, oküler ilaç taşıma gibi birçok alanda uygulamaya sahiptir. En sık kullanılan dendrimerlerden birisi olan poli(amido amin) (PAMAM) ince bağırsaktaki epitel dokuya nüfuz edebilme özelliğiyle oral ilaç taşıma sistemlerinde gelecek vaat etmektedir [118]. Yapılan bir çalışmada ise dendrimerlerin katyonik amino asitlerle kaplanmasının bağırsak ve kan beyin bariyerinde bulunan sıkı bağlantıları aşabilmesini sağladığı gösterilmiştir [119].

3.7.4 Polimerik Nanoküre ve Nanokapsüller

Polimerik nanoküreler, nanokapsüller ve polimerzomlar Şekil 3.8'de görüldüğü üzere benzersiz şekillere sahip olup solüsyonlara bırakıldığında kendi üzerlerine kapanan polimerlerden oluşmaktadır [120].



Şekil 3.8 İlaç içeren (a) nanoküre, (b) nanokapsül, (c) aktif hedeflemeli nanoküre kesitleri [121]

Nanoküreler genellikle katı bir çekirdeğe sahipken nanokapsüller çapraz bağlı yüzeye ve boş bir çekirdeğe sahiptir. Bundan dolayı ilaç nanokürenin matriksine yerleşmişken nanokapsüllerin içerisine hapsedilmiştir. Sentez yöntemine bağlı olarak ilaç yüzeye de bağlanabilmektedir. Nanokürelerin birçoğu amfifilik diblok kopolimerlerden oluşmaktadır. Böylelikle hidrofobik ilaçların kürenin merkezinde toplanarak biyoyararlanımı arttırılmaktadır [122].

Poli-D-L-Laktik-Ko-Glikolik Asit (PLGA)

Birçok ilaç taşıma sistemi ile kan beyin bariyerine ilaç taşımasının iyileştirilmesi için çalışılmaktadır. Bunların arasında nanopartiküller küçük boyutları, yüksek yüzey alanı/hacim oranları ve hedeflenebilirlikleri ile öne çıkmaktadır. 1 ile 200 nm arasındaki nanopartiküllerin ilaçları serbest hallerine kıyasla kan beyin bariyerine daha yüksek miktarda taşıdıyabildiği belirtilmektedir [123]. Bu taşıyıcı sistemler sayesinde kontrollü salım sağlanarak ilaçların yan etkisi azaltılır ve vücutta kalma sürelerini arttırır.

PLGA, polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asitten (PGA) oluşan bir kopolimerdir. PLA içerdiği asimetrik alfa-karbonu sayesinde genellikle D veya L stereokimyasal formu terimleriyle (PDLA veya PLLA) adlandırılır. PLGA ise D ve L formlarının eşit oranda bulunduğu poli-D-L-laktik-ko-glikolik asit için kullanılan kısaltmadır [124].

PLGA neredeyse her şekil ve büyüklükte işlenebilir ve her türlü boyuttaki molekülleri içerisine hapsedebilir. Tetrahidofuran, aseton, etil asetat veya diklorometan gibi birçok çözücüde çözünebilir. PLGA su içerisinde ester bağlarının

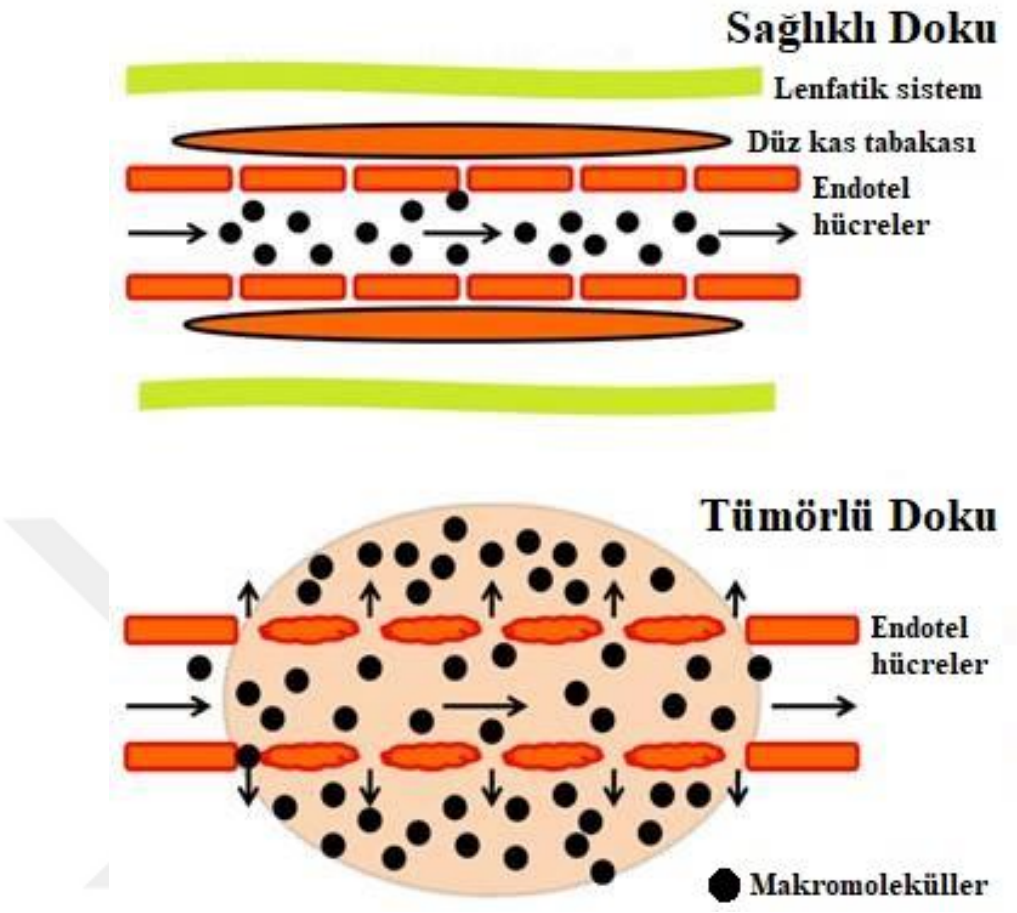
kırılmasıyla hidrolize uğrayarak parçalanır. Sahip olduğu metil yan grupları ile PLA, PGA'dan daha hidrofobik bir yapıdadır. Monomerlerinin bu özellikleri sayesinde PLGA'nın hidrofilikliği değiştirilebilir [125].

PLGA biyouyumluluğu, biyomedikal uygulamalarda uzun süre dayanabilmesi ve parenteral enjeksiyon uygulama kolaylığı ile medikal alanda oldukça sık kullanılan bir polimerdir. PLGA (poli [laktik-*ko*-glikolik asit]) polimeri kullanılarak hazırlanan nanopartiküller (NP) diğer nanotaşıyıcılar ile karşılaştırıldığında daha yüksek kararlılığa ve ilaç yükleme kapasitesine sahip olan, uzun süreli salım yapabilen, immünojenik olmayan, ilacın toksisitesini azaltan, ilacın biyoyararlanımı ve etkisini/etki süresini arttıran, FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir ilaç taşıma sistemidir. Literatürde yapılmış in vitro ve in vivo çalışmalarda, PLGA NP'lerinin yüzey modifikasyonları ve hedefleme ajanlarının varlığı ile beraber KBB'yi aşabildikleri belirtilmiştir [126-128]. Ayrıca, serbest ilaçla PLGA NP ilaç taşıma sistemleri mukayese edildiğinde, PLGA NP ilaç taşıma sistemlerinin daha etkili oldukları ve KBB'yi aşıp beyin dokularına nüfuz edebilme oranı açısından, literatürdeki en yüksek orana sahip bileşenlerden olduğu belirtilmiştir[129, 130].

3.8 Nanopartiküllerde Pasif Hedefleme

Bazı nanopartiküller boyutlarından dolayı vücuttaki biyolojik bariyerleri kolaylıkla geçemezler. İntravenöz olarak verildikten sonra büyük boyuttaki bu nanopartiküller tümör dokularında serbest ilaca kıyasla daha çok birikirler ve daha uzun süre burada kalırlar. Bu fenomenin adı EPR (*Enhanced vascular permeability and* retention) etkisi (Şekil 3.9) olarak bilinmektedir ve iki faktöre bağlıdır [131].

- Arttırılmış vasküler geçirgenlik ve alıkonma *(EPR)*; sağlıklı bir dokunun damarları ile tümörlü bir dokunun damarları yapı olarak birbirlerinden oldukça farklıdır. Sağlıklı damarlar yalnızca küçük moleküllerin geçişine izin veren sıkı endotel hücrelerden oluşur. Diğer yandan tümörlü doku damarları zarar görmüş endotelyuma sahiptir. Bundan dolayı hem küçük moleküller hem de 800 kDa kadar büyük moleküller tümörlü dokunun damarlarından geçebilmektedir. Bu sayede yeterince büyük boyuta sahip nanopartiküller seçici bir şekilde tümörlü dokularda birikebilmektedir [132].



Şekil 3.9 Pasif tümör hedeflemesinin şematik gösterimi [133]

- Makromoleküllerin arttırılmış alıkonması; Tümörlü dokuya ekstravazasyondan sonra küçük moleküllü ilaçların geri temizlenmesi difüzyonla oldukça kolaydır. Büyük moleküllerin temizlenmesi ise lenfatik sisteme bağlıdır. Fakat tümörlü dokulardaki deforme olan lenfatik temizleme, makromoleküllerin iç dokuda 72 saatten fazla süre boyunca beklemesine sebep olur.

  Bu iki faktör belirli boyuttaki nanopartiküllerin tümörlü dokuda birikmesine ve hedeflenmesine yardımcı olmaktadır.

3.9 Nanopartiküllerde Aktif Hedefleme

Pasif hedeflemenin yanı sıra nanopartiküllere çeşitli hedefleme grupları bağlanılarak tümör dokuları spesifik olarak aktif hedeflenebilirler. Bu gruplar doku spesifik işaretlere seçici olarak bağlanır ve nanopartiküllerin doku içerisine

alınmasını tetikler. Peptidler, ligantlar, antikorlar ve oligopeptidler hedefleyici ajan olarak kullanılmaktadır [134].

3.9.1 Antikor ve Antikor Parçaları

Antikorlar yüksek affinite ve hedefteki molekülleri tanıyabilme özelliklerine sahip olduğundan en etkili hedefleme ligantları oalrak tanımlanmaktadırlar. Misel hedefleme çalışmalarında ilk kullanılan ligantlardan birisidir. Antikorlar genellikle iki ağır zincir ve iki adet küçük, hafif zincirlerden oluşurlar. Antikorların genel yapıları benzerlik gösterse de sahip oldukları proteinin uç yapısı her antikor için farklılık göstermekte ve bu nedenle birçok çeşitte antikor bulunmaktadır.

Antikorla kaplanmış nanopartikül sistemleri kanser çalışmalarında (anti-CD3 Mab, anti-HER2 Mab, EGFRMab, DI17E6 Mab, anti FAS Mab, anti-CEA Mab), Alzheimer hastalığında (anti-ABeta Mab), beyne ilaç taşınmasında (29B4, OX26, R17217) ve otoimmün hastalıklarda (anti CD4) gibi birçok alanda kullanılmaktadır [135].

3.9.2 Aptamerler

Aptamerler veya mini-aptamerler hedefli ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan kısa ve tek sarmallı yapıdaki DNA veya RNA oligonükleotit ligantlardır. *İn vitro* taramalarla bulunan ve spesifik moleküllere bağlanma yeteneği olan aptamerler hücre içi proteinler, transmembran proteinler, karbonhidratlar ve küçük ilaç moleküllerine bağlanabilme yeteneğine sahiptirler. Elde edilme süreçleri oldukça zor olsa da yüksek derece hedefe bağlanma oranı, bağışıklık sisteminden kaçabilmeleri ve küçük boyutlarından dolayı hedefleme sistemleri için oldukça ideal ligantlardır. Sahip oldukları en büyük dezavantaj ise kanda bulunan DNA veya RNA parçalayabilen enzimlerdir [136].

3.9.3 Karbonhidratlar

Çoğu karbonhidrat molekülü karaciğerde bulunan lektin reseptörlerinden biri olan asyaloglikoprotein reseptörleri için hedefleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Bu açıdan karbonhidratlar hepatik ve servikal kanserlerde hedefleyic ajan olarak kullanışlıdırlar[137].

3.9.4 Küçük Moleküller

Biyolojik olarak aktif küçük moleküller arasında folik asit ve biyotin gibi vitaminler kanser hücrelerini hedeflemede sıklıkla kullanılmaktadır. Folik asit her hücrede bulunan folat taşıyıcısına zayıf bir kuvvetle bağlanmaktadır fakat kanserli hücrelerin yüzeyinde daha fazla bulunan glikozilfosfatidilinositol folat reseptörüne güçlü bir kuvvetle bağlanmaktadırlar. Bu durumda hedefleyici ajan olarak kullanılan folik asit kanserli hücrelere daha çok bağlanarak seçici bir şekilde doku hedeflemesini mümkün kılar. Kanserli hücrelerin hızlı çoğalmasından dolayı hücre yüzeylerinde biyotin reseptörleri sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla bulunmaktadır. Bu durum da biyotin molekülünü harika bir hedefleyici ajan yapar [138].

Kürkümin, selegilin, selektin veya alendronat gibi diğer küçük moleküller de hedefleyici ajan olarak kullanılmaktadırlar [139]. Kürkimin türmerik baharatının ana maddesini oluşturur ve anitoksidant, antiiskemik ve antikanser özelliklere sahiptir. Selegilin ise metamfetamin türevi olup monoamin oksidaz-B (MAO-B) molekülünün inhibitörü olarak Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [140]. Selektin molekülü, yangı sırasında seviyelerinde artış olan P-selektin ve E-selektinin hedeflenmesinde kullanılır. Alendronat ise kemik hastalıklarının tedavisinde hidroksiapatitle beraber hedefleyici ajanı olarak kullanılmıştır [141].

Biyolojik olarak aktif küçük moleküllerin hedefleyici ajan olarak kullanılması her ne kadar avantajlı bir yöntem olsa da seçici olmayan etkileşimlerde bulunması en kötü yanlarından biridir. Örneğin folat (folik asit) hedefte olmayan dokulara da bağlanabilir. Bunun yanı sıra vitaminler hâlihazırda insan diyetinde bulunur ve kanda seviyeleri yüksek miktarda olabilir. Bu durumda ise serbest vitamin hedefli nanotaşıyıcılarla yarışabilir. Bunun sonucunda ilaç taşıyıcı sistemin verimliliği düşmektedir.

3.9.5 Peptidler

Peptidlerin hedefleyici ajan olarak birçok avantajları bulunmaktadır. Örneğin, üretim maliyetleri nispeten ucuz ve birim ağırlık miktarlarına oranla oldukça yüksek aktiviteye sahiptirler. Kararlı yapılarda olduklarından dolayı uzun süreli

saklanmaları ve kimyasal modifikasyonları mümkündür. Bağışıklık sisteminden gelecek olan tepkiyi azaltmaları ve küçük boyutlarından dolayı partikül boyutunu fazla etkilememeleri bir diğer avantajlarıdır. Ayrıca biyolojik aktivitelerini optimize etmek için sekans yapılarında modifikasyona gidilebilir [142].

Çeşitli polipeptidler ve proteinler de kanser hedeflemesinde, beyine ilaç taşınmasında ve daha birçok hastalıkta hedefleyici ajan olarak kullanılmaktadırlar. Bunların arasından tripeptid olan Arg-Gly-Asp (RGD) ve türevleri tümör ve vasküler hedefleyici ligantıdır. Yapılan çalışmalarda Arg-Gly-Asp tripeptidinin birçok kötü huylu tümör ve tümör damarlarında bulunan $\alpha_v\beta_3$ integrin reseptörlerine bağlandığı gösterilmiştir [143, 144]. Bir başka peptid K237 ise nanopartiküllerin yüzeyine konjuge edildiğinde vasküler endotel büyüme faktör reseptörüne bağlandığı ve böylelikle VEGFR sinyal yolağını inhibasyona uğratarak terapötik etki sağladığı gösterilmiştir [145].

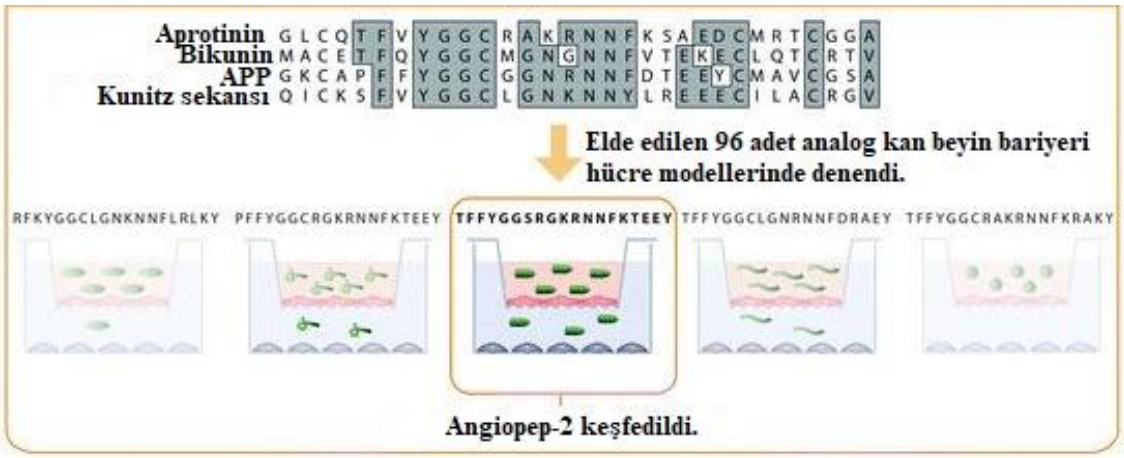
TAT (GRKKRRQRRRPQ) gibi hücre delici peptidler spesifik olarak reseptör tanımayan fakat membran translokasyonunu tetikleyebilen özel ligantlar kategorisindedirler. SynB peptidi hücre delici kategorisinde olan ve kaveola bağımsız yolağıyla kan beyin bariyerini aşabilen ligantlardan birisidir [146].

Faj görüntüleme teknolojisiyle birlikte spesifik moleküllere ve reseptörlere bağlanabilen birçok peptid keşfedilmiştir. Bu peptidler potansiyel hedefleri arttırarak nanopartiküllerin fonksiyonelleştirilme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Lyp-1, LCP, GIRLRG; EGF1, AP ve pep I peptidleri faj teknolojisiyle keşfedilmiş peptidler arasındadır [147].

Angiopep-2 Peptidi

Angiopep-2 peptidi (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH) Kunitz sekansına sahip olan insan proteinleri ve aprotinin sekanslarının biyoinformatik analizi ile keşfedilmiş (Şekil 3.10), LRP-1 hücre reseptörleriyle etkileşime sahip sentetik bir peptittir [148, 149]. Oldukça hidrofilik bir yapıda olan peptidin moleküler ağırlığı 2301.47 g/mol ve izoelektrik noktası pI 9.91'dir. Doksorubisin [150], etoposid ve paklitaksel [151] gibi daha önce kan beyin bariyeriyle başarılı olmuş ilaçların *angiopep-2* peptidiyle

konjuge formülleri daha büyük bir başarı göstererek glioblastoma tedavisi için klinik çalışmalarda faz I ve II'ye kadar ilerlemiştir [152, 153].



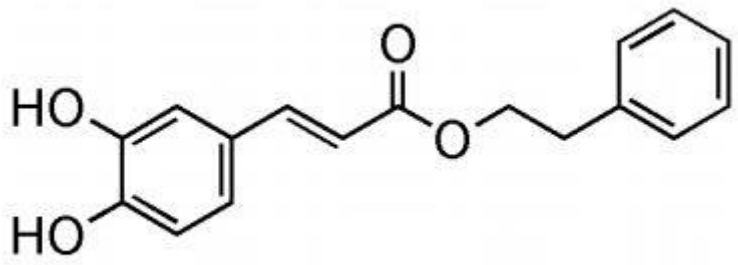
Şekil 3.10 *Angiopep-2* peptidinin keşfedilmesi temsili [154]

Angiopep-2 birçok nanopartiküler sistemlerle küçük moleküllerin, proteinlerin ve oligonükleotitlerin merkezi sinir sistemine hedeflenmesinde kullanılmıştır [155-158]. Kullanılan nanotaşıyıcıların boyutları 7 ile 200 nm arasında olmakta olup merkezi sinir sisteminin hedeflenmesi için oldukça uygun oldukları belirtilmiştir. Özellikle nanotaşıyıcılar için gerekli peptid miktarının az olması (dendronlar için 4 adet, nanopartiküller için 53 adet) etkili taşıma sağlamıştır [159, 160]. Yapılan bu çalışmalarda *angiopep-2* ile hedeflendirilmiş sistemlerin kan beyin bariyerini geçebilmesi 1.5 – 3 oranında arttırılmıştır. *Angiopep-2* peptidi ile daha çok küçük moleküller ve nanotaşıyıcılar çalışılmışsa da antikor taşınmasında da oldukça etkili olduğu belirtilmiştir [161].

3.10 Antikanser Etken Olarak: Kafeik Asit Fenetil Ester

Kaffeik asit fenetil ester balarıları tarafından üretilen propolisin ana bileşenlerinden birisidir. CAPE, anti-bakteriyel, antiviral, mantar önleyici, antioksidan, antienflamatuar ve anti-kanser özellikleri dâhil olmak üzere birçok önemli biyolojik aktiviteye sahiptir [162]. CAPE normal hücrelere karşı böyle bir etkisi olmazken, meme kanseri hücreleri de dahil olmak üzere birçok kanser hücresi türüne sitotoksik olduğu gösterilmiştir [6, 8]. Bu özelliklerinin yanı sıra lipoksijenazlar, siklooksijenaz, glutatyon S-transferaz ve ksantin oksidaz gibi bazı enzim

aktivitelerini, HIV replikasyonunu ve NF-kB'yi etkili bir şekilde inhibe etme özelliklerine sahiptir [10, 12, 163-165].



Şekil 3.11 CAPE molekülünün kimyasal yapısı [166]

CAPE molekülü ve kafeik asit türevleri üzerinde yapılan kimyasal yapı – aktivite çalışmaları sonucunda molekül sahip olduğu katekol halkası (Şekil 3.11) sayesinde sitotoksik ve antioksidant etkisini gösterdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada hidroksil grupların metilasyonunun CAPE molekülünün biyolojik aktivitesini azalttığı gösterilmiştir [167]. Aynı zamanda içerdiği çift bağın da bu aktivite de rol oynadığı bulunmuştur [168, 169].

Sağlıklı hücrelere karşı herhangi bir toksisitesi olmayan ve literatürde serbest formuyla çalışılan hidrofobik CAPE molekülünün ilaç taşıma sistemleri ile taşınarak çözünürlüğünün arttırılması dolayısıyla biyolojik aktivitesinin artması CAPE molekülünü ilaç taşıma sistemleri çalışmaları için en uygun molekül yapmaktadır.

4
Materyal ve Metod

4.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

- Poli(D,L-laktik-*ko*-glikolik asit) (PLGA) Asit uçlu, 50:50, M_A 7.000 – 17.000
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid
- 2-(N-Morfolino)etanesülfonik asit
- Poli(vinil alkol)
- Kafeik Asit Fenetil Ester
- Etanol
- Diklorometan
- Na_2HPO_4 – Riedel-de Haën 04273
- NaH_2PO_4 – Riedel-de Haën 04269
- NaCl – Sigma Aldrich
- Tripsin Solüsyonu
- Fmoc-Trp-Wang rezin LL
- Fmoc-Tyr-OH
- Fmoc-Asn-OH
- Fmoc-Thr(tBu)-OH
- Fmoc-Tyr(tBu)-OH
- Fmoc-Ser(tBu)-OH
- Fmoc-Lys(Boc)-OH
- Fmoc-Phe-OH
- Fmoc-Cys(Trt)-OH
- Fmoc-Arg(Pbf)-OH
- Fmoc-Glu(OtBu)-OH
- Fmoc-Gly-OH
- Tetrahidrofuran (THF)
- Dietil eter
- Tioanisol

- 1,2 etaneditiol (EDT)
- Sodyum Hidroksit
- Hidroklorik Asit
- Dulbecco's Modified Eagle Medium / F-12 Nutrient Mixture (Ham) (DMEM/F-12/1:1/1X)
- L-glutamine 200 mM (100X)
- Penisilin-Streptomisin (PEST)
- Fetal Sığır Serumu
- Tripan Mavisi
- Thiazoyl Blue Tetrazolium Bromide %98 (MTT)
- Triton X

4.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

4.2.1 Fosfat Buffer Saline (PBS) Tamponunun Hazırlanması

1,1998 gr monosodyum fosfat 1,7799 gr disodyum fosfat dihidrat ve 5,85 gr sodyum klorür tartılarak hacim 1 L olacak şekilde saf su eklenerek tamamlandı. Karışım manyetik karıştırıcıda homojen hale geldikten sonra 1 N sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.4 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan tampon daha sonra 0.45 mikronluk filtreden geçirilerek saflaştırıldı.

4.2.2 MES Tamponunun Hazırlanması

0.05 M konsantrasyonundaki MES tamponunun hazırlanması için 2.44 g MES tartılarak üzerine saf su eklenerek hacim 300 ml'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırıldı. Daha sonra 1 M NaOH çözeltisiyle pH değeri 5'e ayarlandı. Elde edilen çözelti 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek saflaştırıldı.

4.2.3 Farklı Konsantrasyonlardaki *Angiopep-2* Çözeltileri

8 mg *Angiopep-2* peptidi tartılarak 8 ml MES tamponunda (0.05 M, pH 5) çözüldü. Elde edilen bu çözeltiden konjugasyon reaksiyonunu optimize etmek için 0.5–4 mg/ml aralığında çeşitli konsantrasyonda peptid çözeltileri elde edildi.

4.2.4 Farklı Konsantrasyonlardaki Polivinil Alkol (PVA) Çözeltileri

%3'lük (M/V) polivinil alkol çözeltisi hazırlamak için; 3 gr PVA tartılarak son hacim 100 ml olacak şekilde suda çözüldü. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra karışım 0,45 µM filtreden geçirildi. Daha sonra %0.1'lik PVA çözeltisi elde edebilmek için bu çözeltiden 6 ml alınarak hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırıldı.

4.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazi
- Manyetik Karıştırıcı
- Çoklu Manyetik Karıştırıcı
- pH ölçer
- Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentezi Cihazı
- Sonikatör
- Ultrasonik su banyosu
- Vorteks
- Zeta Sizer
- UV-Vis Spektrofotometrisi
- LC-MS
- FT-IR Spektrofotometrisi
- Liyofilizatör
- Santrifüj
- Su saflaştırma cihazı
- Çalkalamalı inkübatör
- Etüv
- Steril Kabin

4.4 Peptid Sentezi ve Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

4.4.1 Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentez Cihazı

Katı faz peptid sentezi yönteminin geliştirilmesi yaklaşık 50 yıl önce peptid kimyası alanına yön verdi ve kimyagerlerin peptidleri sentezleme biçiminde devrim yaptı [170]. Katı faz peptid sentezi yöntemi, her adımda gereken saflaştırma işleminin

gerekliliğini ortadan kaldırarak peptid sentezi için en çok tercih edilen metotlardan biri haline geldi. Her ne kadar bu sentez yöntemi uygun bir metot haline geldiyse de sentez sırasında oluşabilecek peptid agregatları var olan bir problemdir. Bu problemin üstesinden gelinebilmesi için araştırmacılar koruma grupları ve bağlanma reaksiyonu ajanları geliştirmektedir.

Mikrodalga ışınlamanın organik senteze göre daha hızlı reaksiyon süreleri, daha temiz ürünler ve daha yüksek verimli reaksiyonlar sağlama kabiliyeti nedeniyle kimyagerler tarafından yoğun kullanımı vardır [171, 172]. Mikrodalga ışınlamasının peptid sentezine uygulanması ilk önce 1992'de rapor edilmiştir. Merrifield'ın geliştirdiği yöntemde katı faz olarak yaklaşık 100 mesh boyutlarında polistiren reçine kullanılmakta ve peptid zinciri bu reçine üzerinde aminoasitlerin birbirlerine eklenmesi ile uzamaktadır. Yine bu metodda aminoasit yan zincirleri (R) ve N uçları Boc (benziloksikarbonil) koruma grubu ile korunmaktadır. Koruma grupları ile hem aminoasidin yan zincirleri birbirleri ile reaksiyondan korunur hem de dizinin doğru olması (yani her aminoasit eklemesinde dizinin sadece 1 aminoasit uzaması sağlanır). Merrifield'ın geliştirdiği metodda N ucundaki koruma gruplarını kaldırmak için TFA (trifloroasetik asit) kullanılması gerekmektedir. TFA çok güçlü bir kimyasaldır, havadaki buharları bilinen en kuvvetli asit olan HF'i oluşturur. Bu zorluklar daha kolay kaldırılabilen bir koruma grubunu akla getirmiş ve bu nedenle Fmoc (florobenziloksikarbonil) koruma grubu Louis Carpino tarafından geliştirmiştir. Fmoc koruma grubu baza karşı duyarlı olduğunda piperidin ile kolayca uzaklaştırılabilir. Peptid sentezinde mikrodalga kullanımı temel olarak agregasyonu ve dizide eksik aminoasit olmasını engeller, aminoasitlerin bağlanmasını kolaylaştırır [173].

4.4.2 Sıvı Kromatografi ve Kütle Spektroskopisi (LC-MS)

Sıvı kromatografi (LC), bir karışımın ayrı bileşenlerini izole etmek için kullanılan bir ayırma işlemidir. Bu işlem, bir numunenin bir polar mobil faz ve polar olmayan bir sabit fazdan kütle transferini içerir. Sıvı kromaotgrafi cihazı, numunenin enjekte edildiği ve çözücünün (yani mobil faz) numunenin taşınması için geçtiği, polimerler ve silika gibi granüler bir katı malzemeden (yani durağan faz) yapılmış gözenekli bir ortam ile doldurulmuş bir kolondur.

Bir numune enjekte edildiğinde, sabit fazda adsorbe edilir ve çözücü, paketleme malzemelerine ve solvente nispi afinitelerine bağlı olarak bileşikleri birer birer ayırmak için kolondan geçer. Sabit faza en çok benzeyen bileşen, ayrılan en son bileşendir. Bu durum, yüksek afiniteye sahip bileşenin sütun sonuna kadar seyahat etmek için daha fazla zamana ihtiyaç duymasından kaynaklanmaktadır.

Kütle spektrometresi (MS), moleküler kütleleri ve yükleri (kütle/yük oranı) uyarınca ayrılma ve tespit edilmelerini kolaylaştırmak için atomları veya molekülleri iyonize eder. MS, çeşitli uygulamalarda, örneğin biyokimyasallar ve atom fiziğinde kullanılır. Bir kütle spektrometresinde gerçekleşecek süreçler şunlardır:

- Numunenin Tanıtımı: Numune gaz halindeki bir faza dönüştürülür (gaz halindeki numuneler veya termal olarak kararsız olan numuneler hariç) ve giriş boyunca iyonizasyon odasına verilir
- İyonlaşma: katyon oluşturmak için gaz numune iyonize edilir (çoğu durumda ancak birkaç tür anyonla birlikte çalışabilir)
- Ayırma: iyonları ayrı bir kütle analizörü ile kütle / yük oranına göre
- Algılama: bir dedektör, iyon türü ve miktarını belirlemek için kullanılır.

MS ve HPLC arasındaki kombine teknik, yaygın olarak LC-MS olarak bilinir. İki analitik yöntemi birleştiren sistem deneysel hataları azaltır ve analizin doğruluğunu artırır. Bu teknik, çevresel atıkların, bitki ve hücre ekstraktlarının analizi gibi çok sayıda bileşiği içeren örneklerde çok kullanışlıdır [174-176].

LC-MS, karışımların fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre ayrılmasını, ardından her tepe noktasındaki bileşenleri tanımlamayı ve kütle spektrumlarına göre tespit etmeyi içerir. LC-MS'de kullanılan akış hızları, HPLC için kullanılanlardan daha düşük olmalıdır. Bu nedenle, LC-MS'deki sütun, daha düşük çözücü akış hızlarına ve numune hacimlerine uyum sağlamak için çok daha küçüktür. Bu, şırınga pompalarını LC-MS için çok uygun yapar, çünkü bu şırıngalar çok düşük akış hızları sağlayabilir. Ek olarak, sisteme numune enjeksiyonu için çok hassas numune dozajı verebildiklerinden şırınga pompaları kullanmak mümkündür [177].

4.5 Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

4.5.1 UV-Vis Spektroskopisi

Elektromanyetik ışıma uzayda dalga hareketiyle ilerleyen değişken elektrik ve manyetik alanların birleşiminden oluşur. Işıma dalga gibi davrandığından dolayı aşağıdaki denklemle ilgili olan dalga boyu veya frekans olarak adlandırılabilir:

$$v=c/\lambda \tag{4.1}$$

Eşitlik 4.1'de gösterilen v frekansı; c ışık hızını; λ ise dalga boyunu temsil etmektedir. UV-Vis spektroskopide dalga boyu genellikle nanometre (1 nm = 10^{-9} m) olarak gösterilmektedir.

Eşitlik 4.1'e göre dalga boyu azaldıkça daha az enerji üretilir. UV-Vis spektroskopide düşük dalga boylu UV ışınları en yüksek enerjiye sahiptir. Bazı durumlarda ise bu enerji istenmeyen fotokimyasal tepkimelere sebep olmak için yeterlidir.

Işıma madde ile etkileşime girdiğinde yansıma, saçılma, absorbans, floresans/fosforesans ve fotokimyasal tepkimeler (asborbans ve bağ kırılması) gibi çeşitli olaylara sebep olabilir. Genellikle UV-Vis spektroskopi ile analiz yapıldığında sadece absorplanma olayının gerçekleşmesi istenir.

Işık bir enerji türü olduğundan dolayı ışığın madde tarafından absorpsiyonu moleküllerin veya atomların enerjilerinin artmasına sebep olur. Moleküllerin toplam potansiyel enerjisi elektronik, titreşimsel ve dönel enerjilerin toplamından oluşmaktadır:

$$E(toplam) = E(elektronik) + E(titreşimsel) + E(dönel) \tag{4.2}$$

Her bir formdaki enerji toplamı devamlı değil ayrık seviyelerden oluşmaktadır. Her bir seviyedeki enerji farklılığı aşağıdaki sıralamadaki gibidir:

$$E(elektronik) > E(titreşimsel) > E(dönel) \tag{4.3}$$

Bazı molekül ve atomlarda, UV fotonları ve görünür ışık farklı elektronik enerji seviyeleri arasında geçişi mümkün kılacak kadar enerjiye sahiptirler. Absorplanan ışının dalga boyu bir elektronu düşük enerji seviyesinden daha yüksek enerji seviyesine hareket ettirecek kadar enerjiye sahip olmalıdır. Bu enerji geçişleri dalga

boylarının karakteristik olduğu çok dar bir absorbans bandında olmalıdır. Atomlar için bu durum geçerliyken moleküller sadece bir absorbans bandında değil geniş bir bant aralığında çeşitli enerji geçişleri yapar.

UV-Vis spektroskopide maddenin karakteristik bant aralığını bulmak için aşağıdaki prensibe göre analiz yapılır:

$$T = \frac{I}{Io} \qquad veya \qquad \%T = \left(\frac{I}{Io}\right) x100 \tag{4.4}$$

Absorbans ise aşağıdaki gibidir:

$$A = -logT \tag{4.5}$$

Örnek maddeden geçen veya yansıyan ışıklar sonucunda absorpsiyon edilen ışık miktarı kırılma saçılması (Io) ve iletilen saçılma arasındaki farka eşittir. Absorpsiyon edilen ışık miktarı absorbans (Eşitlik 4.4) veya transmitans (Eşitlik 4.5) olarak adlandırılır. Absorbans ve konsantrasyon arasındaki ilişki lineer olduğundan dolayı birçok uygulamada absorbans değerleri gösterilir.

Spektrum türevinin üretebilmek için optik, elektronik ve matematiksel yöntemler kullanılır. UV-Vis spektroskopinin erken dönemlerinde optik ve elektronik yöntemler kullanılsa da yeni nesil cihazlarda çoğunlukla matematiksel metotlar kullanılmaktadır.

Spesifik bir dalga boyundaki türevi hesaplamak için ± n adet veri noktası seçilerek polinom hale getirilerek en küçük kareler metotuna uydurulur.

$$l = a_0 + a_1 l + \ldots + a_l l \tag{4.6}$$

Her bir dalga boyundaki $a_0 \ldots a_l$ katsayıları türev değerlerdir. Türevle oluşturulmuş spektrum karakteristik piklerin belirginleşmesinde, üst üste binen

bantların ayrılmasında oldukça yararlı bir yöntemdir [178].

4.5.2 Zeta Sizer

Nanopartiküllerin farmakodinamik ve farmakokinetik davranışları etkileyen en önemli unsurlardan birisi boyut ve yüzey yüküdür. Zeta sizer cihazı dinamik ışık saçılma (DLS) yöntemiyle Brownian hareketi ölçerek partiküllerin boyut ve

elektroforetik ışık saçılmasıyla yüzey yükü analizlerini gerçekleştirir. Işık saçılma tekniği en temel analiz yöntemlerinden birisi olup özellikle kollodial sistemler, nanopartiküller ve makrormoleküller için boyut, moleküler ağırlık, yüzey yükü/elektroforetik hareketlerin analizinde kullanılır.

Brownian hareket partiküllerin bulundukları çözücü içerisinde yaptıkları rastgele hareketlerdir. DLS yöntemi partiküllerin sıvı içerisindeki bu hareketleriyle ilgilenir.

Partiküllerin boyutu arttıkça yaptıkları brownian hareket daha yavaş olur. Daha küçük partiküller ise çözücünün içerisinde oldukça hızlı hareket etmektedirler. Ortamın sıcaklığı viskozite bilgisi (ortamın sıcaklığı çözücünün viskozitesini etkiler) gerektiğinden ölçümler için önemlidir. Partiküllerin hareketinin stabil olması dolayısıyla ölçümün doğru olması açısından sıcaklık oldukça önemlidir. Brownian hareketin hızı (D) translasyonel difüzyon kat sayısı olarak da bilinmektedir. Partikülün boyutu Stokes – Einstein denklemi kullanılarak translasyonel difüzyon kat sayısı üzerinden hesaplanır:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \tag{4.7}$$

d(H) = hidrodinamik çap

D = translasyonel difüzyon katsayısı

k = Boltmann sabiti

T = mutlak sıcaklık

η = viskozite

Translasyonel difüzyon katsayısı sadece boyut değil aynı zamanda partikülün şekline, konsantrasyona ve çözücüde bulunan iyonların varlığına da bağlıdır.

Çözücüde bulunan iyonlar ve toplam iyonik konsantrasyon Debye uzunluğu (K^{-1}) olarak adlandırılan elektrik çift katmanının kalınlığını değiştirerek partiküllerin difüzyon hızını etkileyebilir. Bu nedenle düşük iletkenliğe sahip çözücü partiküllerin etrafındaki çift katmanı daha da genişlemesine sebep olarak partiküllerin difüzyon hızını azaltır ve daha büyük boyutlu sonuçlar elde etmesine yol açar. Tam tersi bir

durum ise yüksek iletkenliğe sahip çözücülerde daha küçük boyutlar elde edilmesine sebep olur.

Partikülün yüzeyinde meydana gelen herhangi bir değişiklik yine partikülün difüzyon hızını etkileyerek boyut değişimine sebep olabilir. Örneğin partikül yüzeyi tarafından adsorbe edilen polimer tabaka partikül yüzeyinde uzanan polimer tabakadan daha etkili bir şekilde difüzyon hızını azaltarak boyut artışını ölçüme yansıtır.

Partikül boyut ölçümü yapan bütün sistemler küresel olmayan partikülleri ölçmede problem yaşarlar. Bunun sebebi ise küresel şeklin boyutunun tek bir figürle kesin bir şekilde ölçülebilmesidir. Küresel olmayan bir partikülün hidrodinamik çapı ise kendisiyle aynı translasyonel hıza sahip küresel partikülün çapına eşittir. Eğer partikülün şekli hızını etkileyecek bir yapıda ise bu durumda hidrodinamik çap da değişir. Örneğin çubuk şeklindeki partiküllerin boyutunda meydana gelen bir değişiklik difüzyon hızlarını dolayısıyla boyut sonuçlarını etkilerken, çap uzunluklarındaki değişiklik difüzyon hızını etkilemediğinden boyut değişiminin tespiti oldukça zor olacaktır.

Protein ve makromoleküllerin konformasyonu ise çözücünün yapısına bağlıdır. Konformasyonlarında meydana gelen herhangi bir değişiklik doğrudan difüzyon hızlarını etkilediğinden DLS cihazı bu tarz değişikliklerin tespit edilmesinde oldukça hassastır [179].

4.5.3 Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektroskopisi

FT-IR spektroskopisi titreşim spektroskopi türlerinden biri olup moleküler yapıların aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Bu teknikte örnek kızılötesi bir kaynaktan gelen ışınlara maruz bırakılır ve bu ışınlar örnek tarafından absorpsiyon edilip titreşim hareketlerine dönüştürülür. Bu titreşim hareketleri yalnızca örneğin sahip olduğu görünür ve kısa dalgalar arasındaki elektromanyetik spektruma denk gelen moleküler titreşim yapısında olabilir. Bu tireşim spektrumundaki her bir bant frekans ve şiddet olarak karakterize edilir.

Kızılötesi bölgesi (1 – 100 μM) uzak (100 – 25 μM), orta (25 – 2.5 μM) ve yakın IR (2.5 – 1 μM) olarak üçe ayrılmıştır. Orta IR bölgesi birincil moleküler titreşimlere

denk gelmekle birlikte kimyasal ve adli analizlerde en sık kullanılan bölgedir. Tüm moleküller bu bölgenin bir kısmında (1350 cm^{-1} - karakteristik absorbans bantlarına dolayısıyla parmak izi bölgesine sahiptir. Uzak ve yakın IR bölgeleri yalnızca ikincil titreşimlere ait olduğundan dolayı sık kullanılmamaktadır. Biyolojik ve kimyasal örneklerin birçoğunun IR frekansı 4000 ve 1000 cm^{-1} arasındadır [180].

4.5.4 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Taramalı elektron mikroskopu (SEM), mikro ve nano yapıların morfolojisi ve kimyasal karakterizasyonu için oldukça önemli bir görüntüleme tekniğidir. Optik mikroskopi görüş açısını optik lenslerle genişleterek yaklaşık 2000 A çözünürlüğe sahip görüntü imkanı tanımaktadır. Bu mikroskopi türü bilimsel araştırmalarda oldukça büyük bir öneme sahiptir. 1890 yıllarında elektronların manyetik alanla kontrol edilebilmesinin keşfinden beri ışık kaynağı yüksek enerjili elektron demetiyle değiştirilip elektron mikroskopisi geliştirilmiştir.

SEM görüntüleme tekniğinde görüntünün oluşması örnek ile elektron demetinin etkileşimlerinden meydana gelen sinyallerle gerçekleşir. Örnek ve elektron demeti arasında oluşan bu etkileşimler elastik ve inelastik etkileşimler olmak üzere iki grupta incelenir. Elastik saçılma elektronların örneğin atomik çekirdeği veya aynı enerjiye sahip dış kabuk elektronları tarafından saptırılmasıyla meydana gelir. Bu tip bir etkileşim çarpışma sırasında meydana gelen önemsiz enerji kayıpları ve sapan elektronun hareket açısının değişmesiyle tanımlanır. 90 dereceden daha büyük bir açıyla sapan elektronlar geri saçılan elektronlar (BSE) olarak adlandırılır ve görüntüleme için oldukça iyi sinyal verirler. İnelastik saçılma ise elektron demetini oluşturan elektronların bir kısım enerjiyi örnekteki atomlara vermesiyle meydana gelir. Sonuç olarak bu durum ikincil elektronların (SE) oluşmasına yol açar ve bu elektronlar 50 eV'den daha az enerjide olup örneğin görüntülenmesi ve analizinde kullanılır. Görüntüleme esnasında BSE ve SE sinyallerine ek olarak x-ray, auger elektronları ve katodoluminesans gibi daha birçok sinyal oluşmaktadır. Örnekten gelen bütün bu sinyaller sonucunda örneğin yüzey morfolojisi ve kimyasal yapısı hakkında bilgi sahibi olunur [181].

4.6 Katı Faz Peptid Sentezi Yöntemiyle *Angiopep-2* Peptidinin Sentezi

T-F-F-Y-G-G-S-R-G-K-R-N-N-F-K-T-E-E-Y-W dizisine sahip *Angiopep-2* peptidinin sentezlenmesi için önce karboksilik ucunu oluşturan W (Triptofan) amino asitinin Fmoc koruma gruplu rezine bağlı Fmoc-Trp(Boc)-Wang adlı madde 143 mg olarak tartıldı. 25 ml DMF üzerine eklenerek rezinin şişmesi için gece boyu çalkalayıcıda bırakıldı.

Peptid sentez cihazının yazılımı olan Pep Driver programına sentezlenecek dizi girilerek her bir aminoasit ve diğer kimyasallar için gereken miktarlar hesaplandı.

Bu dizinin sentezi için kullanılan madde miktarları aşağıdaki tablodaki gibidir:

Tablo 4.1 Peptid sentezi için kullanılan kimyasallar

Madde	Kullanılan Miktar	Açıklama
Arg	2.984 g	Aminoasit
Asn	1.432 g	Aminoasit
Glu	1.021 g	Aminoasit
Gly	1.070 g	Aminoasit
Lys	1.125 g	Aminoasit
Phe	1.395 g	Aminoasit
Ser	0.614 g	Aminoasit
Thr	0.954 g	Aminoasit
Tyr	1.103 g	Aminoasit
HCTU	12.411 g	Karboksilik asit gruplarının aktivasyonu

$HOBt.H_2O$	4.595 g	Karboksilik asit gruplarının aktivasyonu
DIEA	10.5 ml	Amin gruplarının aktivasyonu
NMP	19.5 ml	Amin gruplarının aktivasyonu
Piperidin	%20'lik çözelti	Deprotektör – koruma gruplarının kaldırılması

Her bir aminoasit tartıldıktan sonra 0.2 M konsantrasyon elde edilecek şekilde üzerilerine DMF eklendi. HCTU ile HOBt 0.2 M konsantrasyon elde edilecek şekilde DMF içerisinde birlikte çözülerek sentez sırasında aminoasitlerin karboksilik asit gruplarının aktivasyonunda kullanıldı. DIEA ile NMP de aynı şekilde 0.2 M'lık çözelti oluşturacak şekilde DMF içerisinde birlikte çözültü. Bu çözelti ise sentez sırasında aminoasitlerin amin gruplarının aktivasyonunda kullanıldı. Aynı zamanda aktivatör olarak da adlandırılan bu çözeltiler amid bağının kurulmasında ve peptid dizisinin oluşmasında rol aldı. Piperidin ise aminoasitlerin N-terminal ucundaki amin gruplarının koruma gruplarının (Fmoc) kaldırılmasında deprotektör olarak kullanıldı.

Her bir çözelti peptid cihazına özel büyük viallerin içerisinde hazırlandıktan sonra bu viyaller cihaza yerleştirildi. Daha sonra Pep Driver yazılımı kullanılarak peptid sentezi başlatıldı. Sentez sonrasında elde edilen peptid solüsyonundan DMF ve DCM uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonra elde edilen peptid hala rezine bağlı olduğundan dolayı aşağıdaki maddelerden oluşan kimyasal kokteyl hazırlanarak kırma işlemi gerçekleştirildi;

- %86.5 TFA
- %5 Thioanisole
- %1 TIS
- %2.5 EDT

- %5 Su

Peptidin üzerine bu kokteyl yavaş yavaş eklenerek 3 saat çeker ocak altında manyetik karıştırıcıda bırakıldı. Daha sonra rotari evaporatörde +4 C'de kimyasal kokteylin uçurulması gerçekleştirildi. Kalan jelimsi kıvamdaki madde soğuk eter ile çöktürülerek ham peptid elde edildi. Peptid tartıldı ve sonraki aşamalarda kullanılmak üzere buzdolabında saklandı.

4.6.1 Sentezlenen *Angiopep-2* Peptidinin LC-MS Cihazında Analizi

Sentezlenen peptidin saflık oranını ve molekül ağırlığını belirlemek için LC-ESI-MS analizi yapıldı. Saflık hesaplaması kromatografide elde edilen piklerin alanları hesap edilerek bulundu. Molekül ağırlığı ise ESI yöntemiyle peptid moleküllerinin iyonlaşması sağlanarak elde edilen iyonlardan yola çıkarak hesaplandı.

4.7 CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi

Polimerik nanopartiküllerin sentezinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin seçimi sentezlenecek nanopartiküllerin şekline ve içerisine yüklenecek ilacın kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Tez doğrultusunda kullanılacak olan CAPE molekülü hidrofobik yapıda olduğundan dolayı nanopartikül sentezlerinde tekli emülsiyon çözücü uçurma (o/w) yöntemi kullanılmıştır [182]. Bu doğrultuda sürfaktant olarak ve su fazı oluşturulması için sırasıyla %3 ve %0.1 konsantrasyonlarında PVA çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra yağ fazını oluşturmak için 100 mg PLGA polimeri 1.5 mL DCM içerisinde çözülmüştür. Bu yağ fazının içerisine 500 mikrolitre etanolde çözünen CAPE eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra yağ fazı şırınga yardımıyla sonikasyon (70 W, %100 power) altında 4 mL %3 PVA'dan oluşan su fazına damla damla eklenerek emülsiyon oluşturulmuştur. Sonikasyon işlemi 90 saniye boyunca devam etmiştir. Oluşan bu emülsiyon tekrardan şırınga içerisine çekilerek 35 mL %0.1'lik PVA solüsyonuna damla damla eklenmiştir. Elde edilen tekli emülsiyon çözücülerin uzaklaştırılması için 3 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de karıştırılmıştır. Çözücü uzaklaştırma aşamasından sonra ise partiküller santrifüjle yıkanarak toplanmıştır. Bu yıkama toplama işlemi 10000 rpm ve 4 C'de 40 dakika ve üç tekrarlı olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonunda pelet halinde elde edilen nanopartiküller

daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere 48 saat liyofilize edilmiştir. Boş nanopartiküllerin sentezinde de aynı işlem ilaç eklenmeden yapılmıştır.

4.8 Nanopartiküllerin Yüzeyine *Angiopep-2* Peptidinin Bağlanması

Çapraz bağlayıcılar ilaç taşıma sistemlerinde ilaçların bağlanmasında ve yüzey modifikasyonlarında oldukça sıklıkla kullanılmaktadırlar. Çapraz bağlanma iki ya da daha fazla molekülün kovalent bağla birbirine bağlanmasını içeren kimyasal bir işlemdir. Çapraz bağlayıcı ajanlar ise bu işlemlerde kullanılan proteinler veya diğer moleküllerdeki özel fonksiyonel gruplara (birincil aminler, sülfhidriller vb.) bağlanabilen reaktif uçlara sahip moleküllerdir. Proteinlerde ve peptidlerde bulunan çeşitli kimyasal gruplar onları konjugasyon ve hedefleme çalışmaları için ideal adaylar haline getirmiştir. Bu doğrultuda glioma hücre hatlarının yüzeyinde bulunan LRP-1 reseptörünü hedeflemek için *angiopep-2* peptidi sentezlenen PLGA nanopartiküllerinin yüzeyine EDC karbodiimid çapraz bağlayıcı ajanı kullanılarak bağlanmıştır. EDC çapraz bağlayıcı ajanı sıfır-uzunlukta kabul edilir. Bunun sebebi ise karboksilat (-COOH) gruplarını birincil aminlere (-NH_2) bağın içine katılmadan direk olarak bağlamasıdır.

Tezde yapılan konjugasyon çalışmasında PLGA nanopartiküllerinin yüzeyinde bulunan karboksilat gruplarına *angiopep-2* peptidinin N-ucunda bulunan amin grupları EDC çapraz bağlayıcı ajanla bağlanmıştır. Konjugasyon reaksiyonlarında ortamın pH değeri, EDC miktarı ve peptid miktarı oldukça önemlidir. Bu nedenle reaksiyonun optimizasyonu için çeşitli miktarlarda EDC ve peptid ile çalışmalar (Tablo 4.2) yapılmıştır. İlk olarak sentezlenen nanopartiküller çözücü uçurma aşamasından sonra MES tamponuna (0.05 M, pH = 5) aktarılmıştır. Daha sonra çeşitli miktarda EDC damla damla eklenerek karboksilik gruplarının aktivasyonu için 2 saat manyetik karıştırıcıda 600 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra çeşitli miktarlarda *angiopep-2* peptidi damla damla eklenerek konjugasyonun gerçekleşmesi için 15 dakika manyetik karıştırıcıda aynı hızda bekletilmiştir. Konjugasyonun doğrulanması için reaksiyondan örnekler alınarak ZetaSizer cihazında boyut ve yüzey yükü analizi yapılmıştır. Konjugasyonu tamamlanan nanopartiküller ortamdaki fazla peptid ve EDC'nin uzaklaştırılması için 10000 rpm ve 4 C'de santrifüj edilip üst faz atılarak saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi 3 kere

tekrarlandıktan sonra pellet olarak toplanan peptid bağlı nanopartiküller 48 saat boyunca liyofilize edilerek ileriki aşamalarda kullanılmak üzere saklanmıştır.

Tablo 4.2 CAPE Yüklü PLGA Nanopartikülleri ve *Angiopep-2* Peptidinin Konjugasyonu İçin Yapılan Sentezler

Deney No.	PLGA NP Miktarı	EDC Miktarı	Peptid Miktarı	Reaksiyon Hacmi
ANG-CAPE 1	10 mg	1 mg	1 mg	15 mL
ANG-CAPE 2	10 mg	1 mg	0.75 mg	15 mL
ANG-CAPE 3	10 mg	1 mg	0.5 mg	15 mL
ANG-CAPE 4	10 mg	0.5 mg	1 mg	15 mL
ANG-CAPE 5	10 mg	0.5 mg	0.5 mg	15 mL
ANG-CAPE 6	10 mg	2 mg	1 mg	15 mL
ANG-CAPE 7	10 mg	2 mg	0.75 mg	15 mL
ANG-CAPE 8	10 mg	2 mg	0.5 mg	15 mL
ANG-CAPE 9	10 mg	4 mg	0.75 mg	15 mL
ANG-CAPE 10	10 mg	-	1 mg	15 mL

4.9 Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.9.1 Reaksiyon Verimi

Katı olarak elde edilen nanopartikül miktarının (mg) nanopartikül hazırlanmasında kullanılan CAPE ve PLGA toplam miktarına (mg) oranlanmasıyla gravimetrik olarak reaksiyon verimi elde edildi.

$$\%\ Reaksiyon\ Verimi = \frac{Elde\ edilen\ madde\ miktarı\ (mg)}{Başlangıçtaki\ toplam\ madde\ miktarı\ (mg)} x100 \qquad (4.8)$$

4.9.2 Enkapsülasyon Etkinliği

Sentezlenen nanopartiküllerin yıkama ve toplama aşamasında elde edilen üst fazın UV analizi sonucunda elde edilen 323 nm'deki absorbans değeri daha önce çizilmiş CAPE kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak üst fazdaki CAPE miktarı (mg) bulundu. Bu miktar nanopartiküller tarafından enkapsülasyonu gerçekleşmeyen CAPE miktarını göstermekte olup dolaylı yoldan enkapsüle edilen CAPE miktarı bulundu. Böylelikle enkapsülasyona uğrayan CAPE miktarı (mg) ile başlangıçta eklenen CAPE (mg) miktarı oranlanarak enkapsülasyon etkinliği bulundu.

$$\%\ Enkapsülasyon\ etkinliği = \frac{Yüklenen\ CAPE\ miktarı\ (mg)}{Başlangıçtaki\ CAPE\ miktarı\ (mg)} x100 \qquad (4.9)$$

4.9.3 Etken Yükleme Kapasitesi

Enkapsülasyon etkinliği hesaplanmasında bulunan nanopartikül içerisindeki etken madde miktarı (mg) ve katı olarak elde edilen nanopartikül miktarı (mg) kullanılarak (3.3)'den etken yükleme kapasitesi hesaplandı.

$$Etken\ Yükleme\ Kapasitesi = \frac{Nanopartikül\text{e}\ yüklenen\ CAPE\ miktarı\ (mg)}{Elde\ edilen\ nanopartikül\ miktarı\ (mg)} x100 \quad (4.10)$$

4.9.4 Zeta Sizer ile Boyut ve Zeta Potansiyel Analiz

Nanopartiküllerin sentezlenmesi sırasında çözücü uçurma aşamasından sonra, MES tamponuna aktarılmasından sonra, EDC ile aktivasyon ve peptid ile konjugasyon sonrasında nanopartiküllerin boyut ölçümleri gerçekleştirildi. Örnekler dinamik ışık saçılması tekniği, 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) ile donatılmış Zetasizer cihazı kullanılarak nanopartiküllerin Z-Ave (boyut) ve PDI değerlerini belirlemek için kullanıldı. Ölçümler, 0.8872 cP viskozite ve 1.330 kırılma indisi kullanılarak, 25 +- 0.1 C'de yürütüldü. Tüm analizler otomatik modda ve 3 tekrar ile yapıldı.

Nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümleri ise kapiler küvetlerde elektroforetik ışık saçılması (ELS) tekniği kullanılarak yine aynı cihazda 25 C'de +-0.1 C hassasiyeti ile 3 tekrarda gerçekleştirildi. Ölçüm süreleri ve gerilim seçimleri otomatik moda ayarlandı.

4.9.5 FT-IR Analizi

Polimer ve etken madde CAPE arasında etkileşim olup olmadığının belirlenebilmesi ve etken madde varlığının tespit edilmesi doğrultusunda serbest CAPE, PLGA, boş, etken madde yüklü ve hedeflemeli nanopartikül formülasyonlarının Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopi (FT-IR) ölçümleri, FT-IR spektrofotometre kullanılarak ATR (attenuation total reflectance) modunda gerçekleştirildi. 650 ile 4000 cm^{-1} arasında değişen FT-IR spektrumları 4 cm^{-1} çözünürlükle elde edildi.

4.9.6 SEM Analizi

Angiopep-2 peptidiyle hedeflendirilmiş CAPE yüklü ve hedeflendirilmemiş CAPE yüklü nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve şekli taramalı elektron mikrokobu (SEM) kullanılarak analiz edildi. Bir damla nanopartikül süspansiyonu çift taraflı siyah karbon bant üzerine yerleştirildi. Kurutulduktan sonra numuneler vakum altında altın katmanla kaplandı ve 5 kV'de SEM ile analiz edildi [183].

4.10 Sentezlenen Nanopartiküllerin *In Vitro* Salım Çalışmaları

In vitro ilaç salım çalışması modifiye bir çözünme yöntemi kullanılarak farklı nanopartikül konsantrasyonları için gerçekleştirildi. Kurutulmuş nanopartiküllerden 5 mg tartılarak 10 mL PBS tamponunun (pH = 7, 0.01 M, %0.01 sodyum azid) içerisine eklenerek 0.5 mg/mL konsantrasyonunda salım süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlar çalkalamalı inkübatöre yerleştirilerek 150 rpm ve 37 C'de salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (1 sa., 2 sa., 3 sa., 4 sa, 24 sa, 48 sa, 72 sa, 96 sa, 7 gün, 9 gün, 11 gün, 15 gün, 17 gün) salım süspansiyonları 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek üst fazları salınan ilaç mikarını bulmak için saklanmıştır. PBS tampon solüsyonu yenilenerek salım devam ettirilmiştir. Üst fazlar UV-Vis spektroskopide analiz edilerek CAPE kalibrasyon eğrisi kullanılarak salınmış ilaç miktarı hesaplanmıştır. Salınan ilaç miktarları kümülatif olarak toplanarak zamana bağlı salım grafiği oluşturulmuştur [183].

4.11 Sitotoksisite Çalışmaları

DMEM/F12 Tam Besiyeri Hazırlanması

Ticari olarak alınan besiyeri içerisine %1 Penisilin-Streptomisin; 1X, %1 olacak Şekilde L-Glutamin eklendi. C6 Glioma hücreleri için %5, L929 Fibroblast hücreleri için %10 FBS (Fetal Sığır Serumu) eklendi. Hücre kültürü çalışmalarında tam besiyeri kullanıldı.

MTT Çözeltisi Hazırlanması

MTT çözeltisi 0,6 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 6 mg MTT molekülü 10 mL PBS tamponunda çözülerek filtreden geçirildi. Hazırlanan solüsyon +4 C'de karanlık ortamda bekletildi.

MTT Yöntemiyle Sitotoksisitenin İncelenmesi

Canlı hücre mitokondrisinde bulunan oksidatif enzimlerin tetrazolyum halkasını parçalaması sonucu sarı renkli MTT boyası mor fomazan kristallerine dönüşmekte, böylece ölü ve canlı hücreler spektrofotometrik olarak belirlenebilmektedir. MTT çalışması C6 Glioma hücre hatları üzerinde 24, 48 ve 72. saat deneyleri şeklinde uygulanmıştır. Çalışmada her bir hücre hattı için 2 adet 96 kuyucuklu steril plate kullanılmış, belirlenen hücre sayısı tüm kuyulara mikropipet yardımı ile 100 µl ekilmiştir. 24 saat inkübatörde bırakılan hücrelere sitotoksik analizlerini yapmak üzere serbest CAPE molekülü ve optimize CAPE yüklü ve hedefli nanopartiküller 5 – 150 µM konsantrasyon aralığında uygulanmıştır. 24, 48 ve 72. saatlerde ilgili plate içerisindeki tüm kuyucuklardan besiyeri çekilmiş, 50 µl MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası MTT solüsyonu çekilerek yerine 100 µl DMSO eklenmiş, Elisa okuyucu cihazında 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü yapılmıştır. Deney 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Alınan ölçümlerin her biri için yüzde olarak canlılık oranı Eşitlik 4.11 kullanılarak hesaplanmıştır. Hücrelerdeki canlılık oranının %50'den düşük olması maddenin IC_{50} değerinin belirlenmesinde kullanıldı.

$$\% \text{ Canlılık} = (OD\ 570e\ /OD\ 570b\ )x\ 100 \qquad (4.11)$$

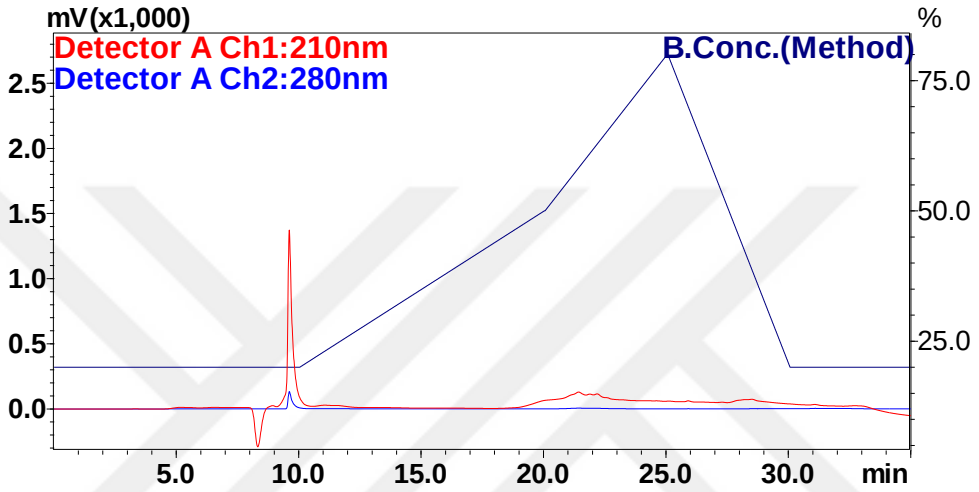
OD 570e : 570 nm'de örneklerin verdiği absorbans değeridir.

OD 570b : 570 nm'de kontrol grubunun verdiği absorbans değeridir.

5
Sonuç ve Öneriler

5.1 *Angiopep-2* Peptidinin Karakterizasyonu

Peptidin, Şekil 5.1' de verilen kromatogramında alıkonma zamanının yaklaşık 10. dk olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 5.1 Peptidin LC kromatogramı

Peptidin molekül ağırlığı ESI-MS sistemi ile doğrulanmıştır. Farklı tarama aralıklarındaki kütle spektrumları Şekil 5.2 ve 5.3' de verilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen fragmentlerden yola çıkarak peptidin molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

518.00 = [M + ACN + Na + K]5+ M = 2486.87 Da

621.01 = [M + 4H]4+ M = 2480.01 Da

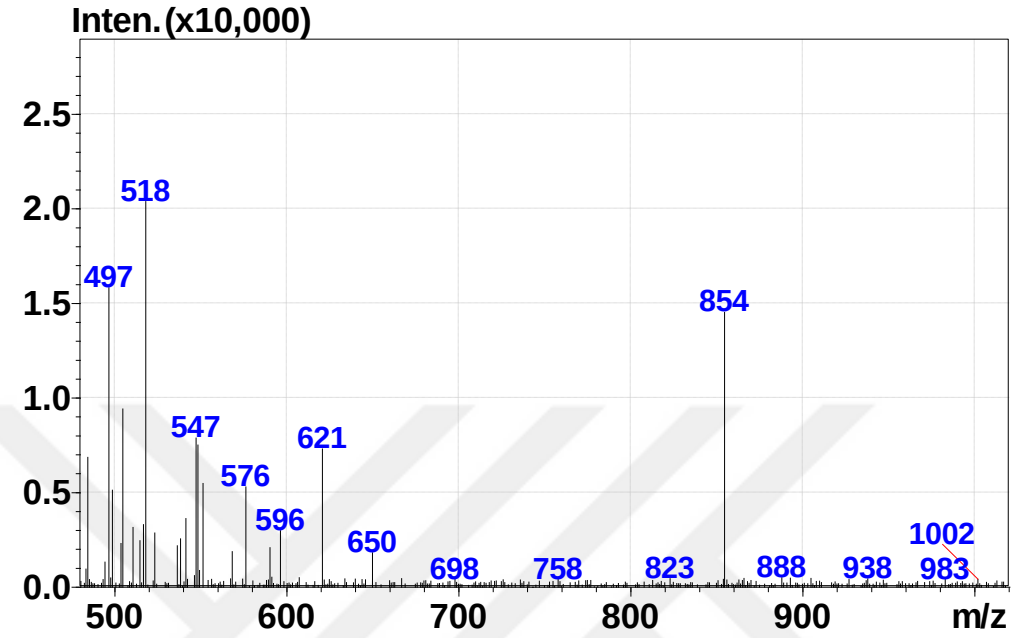
854.05 = [M + 3Na]3+ M = 2493.18 Da

1268.00 = [M + 2Na]2+ M = 2490.02 Da

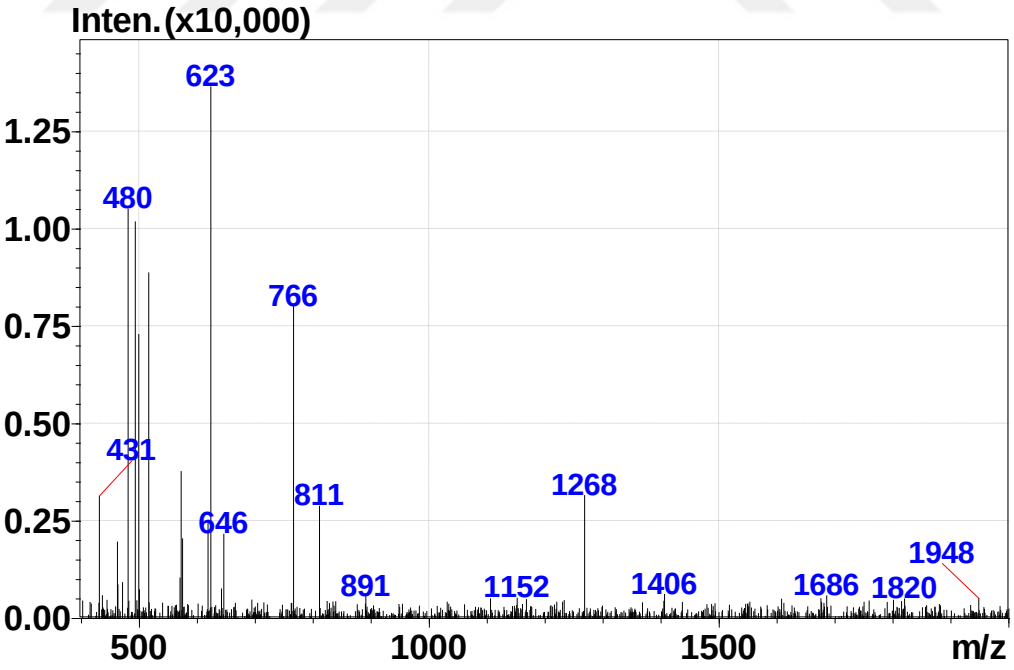
$M_{\text{elde edilen}}$ = 2487.57 Da M_{teorik} = 2487.68 Da

Hesaplamalarda H: 1.008 g/mol; Na: 22.99 g/mol; K: 39.09 g/mol; ACN: 41.05 g/mol olarak alınmıştır.

Yapılan hesaplamalar sonucunda sentezlenen peptidin molekül ağırlığı ile *Angiopep-2* peptidinin teorik ağırlığının yaklaşık olarak aynı olduğu görülmüştür. Böylelikle peptid sentezinin başarıyla gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.2 Peptidin MS spektrumu (tarama aralığı m/z = 500-1000)



Şekil 5.3 Peptidin MS spektrumu (tarama aralığı m/z = 400-2000)

5.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Bu tezde nanopartiküler sistemlerin hazırlanması tekli emülsiyon (y/s) çözücü uçurma yöntemi ile gerçekleştirildi. Nanopartikül taşıyıcı sistemlerin hedeflendirilmesi ise EDC çapraz bağlayıcı ajanları ile konjugasyon reaksiyonu ile gerçekleştirildi.

Liyofilize edilmiş nanopartiküller tartılarak kuru ağırlıkları ölçüldü. Bu bilgiler ışığında ilaç yüklenmemiş boş nanopartiküller (Boş NP), CAPE yüklü nanopartiküller (CAPE NP) ve peptid bağlanmış nanopartiküllerin (ANG-CAPE NP) reaksiyon verimi (RY), enkapsülasyon etkinliği (EE), ilaç yüklenme verimi (DL), boyut (Z-Ave), çoklu dağılım indeksi (PDI) ve zeta potansiyel (mV) değerleri elde edildi. (Tablo 5.1 ve 5.2).

Tablo 5.1 ANG-CAPE Nanopartikülleri İçin Optimizasyon Sonuçları

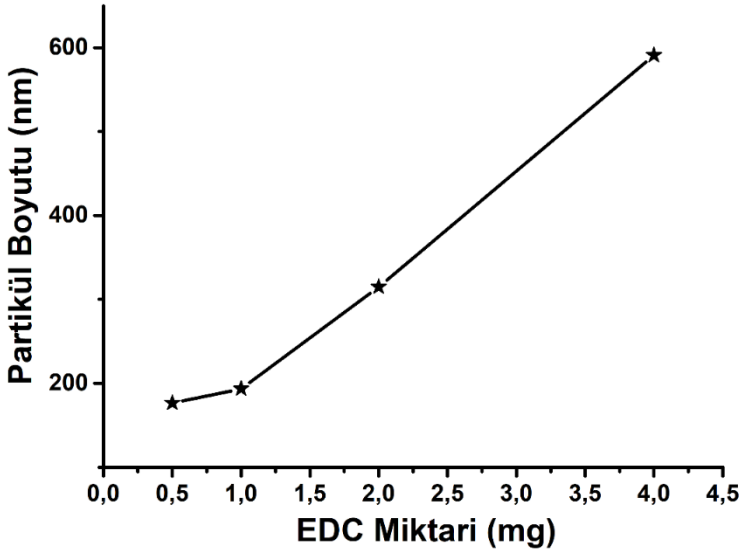
Deney No.	**Boyut Z-Ave (nm)**	**Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)**	**Zeta Potansiyel (mV)**
ANG-CAPE 1	285.5	0.336	-2.57
ANG-CAPE 2	200.1	0.236	-2.3
ANG-CAPE 3	186.8	0.29	-1.7
ANG-CAPE 4	239	0.307	-6.49
ANG-CAPE 5	176.4	0.299	-10.8
ANG-CAPE 6	408.7	0.305	-4.5
ANG-CAPE 7	370.3	0.155	-5.47
ANG-CAPE 8	259.6	0.284	-6
ANG-CAPE 9	591	0.522	-1.62
ANG-CAPE 10	1939	0.957	-4.82

Tablo 5.2 Boş NP, CAPE NP ve ANG-CAPE NP Boyut, PDI, Zeta Potansiyel, EE, DL ve RY Sonuçları

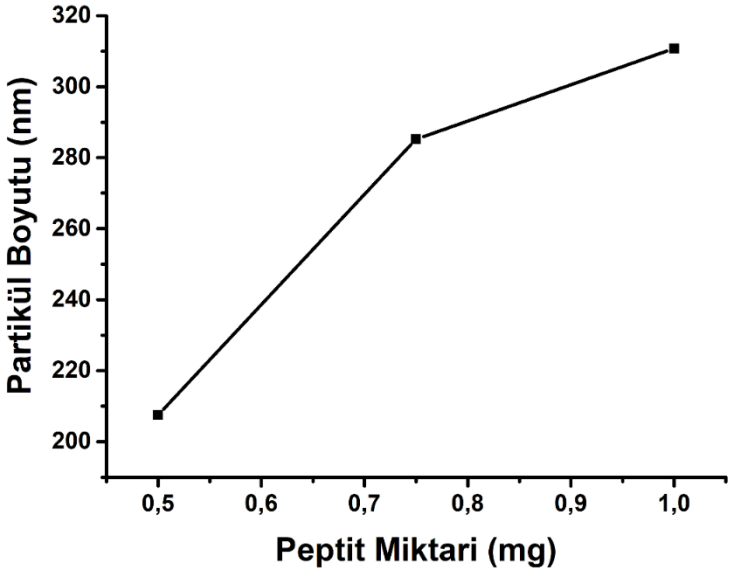
Deney No.	Boyut Z-Ave (nm)	Çoklu Dağılım İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)	% (EE)	% (DL)	% (RY)
Boş NP	120.1	0.142	-26	-	-	19.6
CAPE NP	136.8	0.206	-28.7	91.3	52	43.6
ANG-CAPE NP	176.4	0.299	-10.8	81.5	47.36	49.1
Angiopep-2	12	0,8	12.6			

Konjugasyon reaksiyonu için CAPE yüklü PLGA nanopartikülleri ve *angiopep-2* peptidiyle yapılan optimizasyonlar sonucunda ve Tablo 5.1'deki sonuçlar ve şekil 5.4'e göre EDC çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça partikül boyutunun arttığı gözlemlenmiştir. EDC çapraz bağlayıcısı nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan karboksilik asit fonksiyonel gruplarını active ederek peptidin amino gruplarının bağlanmasını sağlar. Böylelikle konjugasyon reaksiyonu gerçekeşir. Artan EDC miktarı ile aktive edilmiş karboksilik grupların sayısının artması nanopartiküllerin yüzeyine daha fazla peptidin bağlanmasına dolayısıyla boyutun artmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Aynı şekilde peptid miktarı arttıkça yine boyutların artışı (Şekil 5.5) görülmüştür. Zeta potansiyel ise peptid miktarı arttıkça artmıştır. Optimizasyon sonucunda 10 mg CAPE yüklü PLGA nanopartikülleri için uygun EDC ve *Angiopep-2* miktarları sırasıyla 0,5 mg ve yine 0,5 mg olmasına karar verilmiştir.

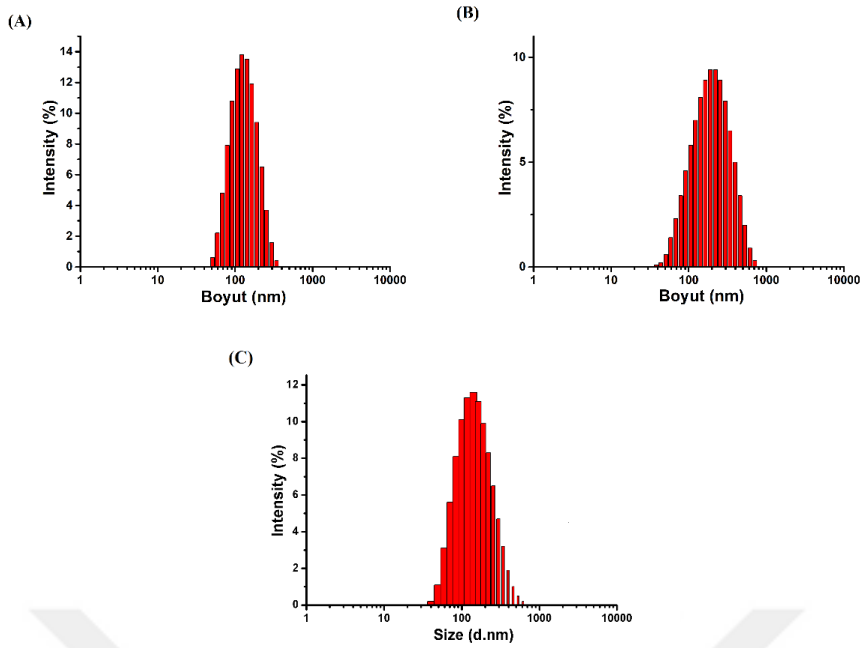
CAPE yüklü PLGA nanopartikülleri için laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada [182] gerekli optimizasyonlar yapılmıştır. Partiküller bu çalışmadan elde edilen uygun miktarda CAPE molekülü ve PLGA ile sentezlenmiştir.



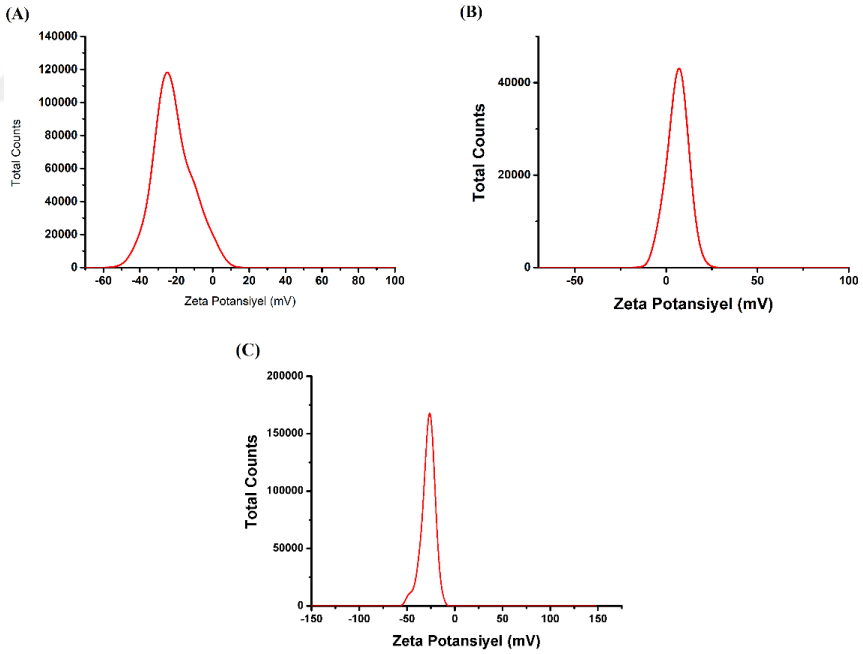
Şekil 5.4 EDC miktarına göre değişen nanopartikül boyutu



Şekil 5.5 Kullanılan peptid miktarına göre değişen nanopartikül boyutu



Şekil 5.6 Üretilen CAPE yüklü PLGA nanopartiküller (A), *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü PLGA nanopartiküller (B) ve boş PLGA nanopartiküllerin (C) boyut dağılım grafikleri

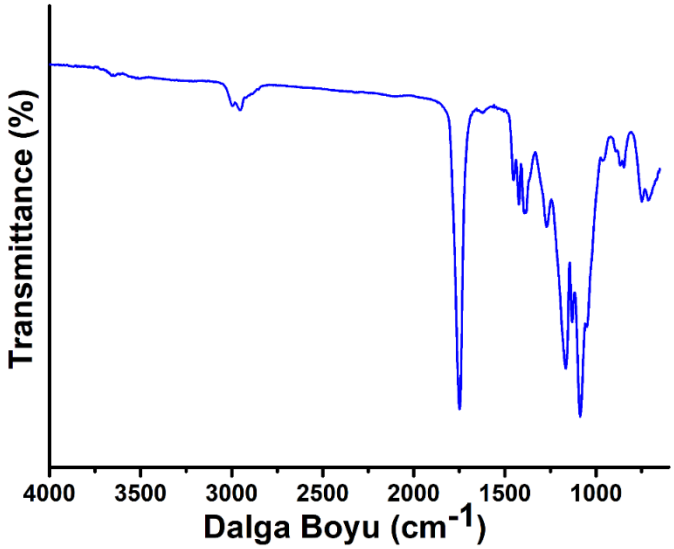


Şekil 5.7 Üretilen CAPE yüklü PLGA nanopartiküller (A), *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü PLGA nanopartiküller (B) ve boş PLGA nanopartiküllerin (C) zeta potansiyel grafikleri

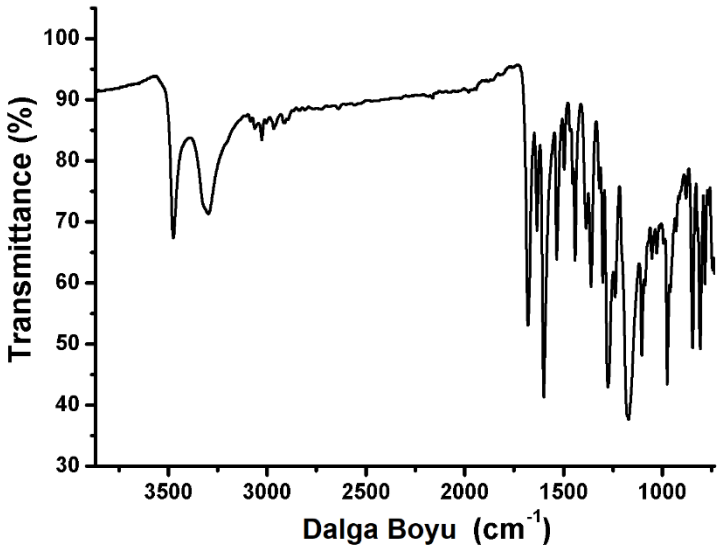
CAPE yüklü nanopartiküller ve hedeflendirilmiş nanopartiküller için enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %91.3 ve %81.5 olarak hesaplanmıştır. Aynı partiküller için etken yükleme kapasitesi sırasıyla %52 ve %47.36 olarak bulunmuştur.

Boş PLGA nanopartiküllerin, CAPE yüklü nanopartiküllerin ve *angiopep-2* ile hedeflendirilmiş nanopartiküllerin boyut dağılım grafikleri Şekil 5.6'da ve zeta potansiyel grafikleri Şekil 5.7'de gösterilmiştir. Nanopartiküllerin partikül boyutu dinamik ışık saçılması yöntemi, zeta-potansiyeli ise elektroforetik ışık saçılması yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Sentezlenen partiküllerin boyutları boş nanopartiküller için 120.1±1.041; CAPE yüklü nanopartiküller için 136.8±2.793; peptid ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü nanopartiküller için ise 176.4±1,626 nm olarak bulunmuştur. Peptid ile konjugasyon sonrasında partiküllerin boyutunun artması peptidin başarılı bir şekilde nanopartiküllerin yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Şekil 5.6'den görüleceği üzere partiküllerin boyut dağılımı dar ve tek bir popülasyon halindedir. Boş, CAPE yüklü, CAPE yüklü hedeflendirilmiş partiküllerin çoklu dağılım indisi (PDI) sırasıyla 0.142±0.008, 0.206±0.188 ve 0.299±0.012'dur. Sentezlenen nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinin ölçümü hem partikül kararlılığı hem de konjugasyonu doğrulamak açısından oldukça önemlidir. Sentezlenen boş, CAPE yüklü, hedeflendirilmiş ve CAPE yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyelleri sırasıyla -26±1.11, -28.7±0.624 ve -10.8±0.702 mV olarak ölçülmüştür. Şekil 5.7'de de görüleceği üzere konjugasyon sonrası zeta potansiyel grafiğinin pozitif değerlere kayması ve artması konjugasyonun başarılı olduğu ve bu pozitif artışın partiküllerin yüzeyindeki negative yüklü karboksilik grupların konjugasyonundan (nanopartiküllerin karboksilik asit gruplarının peptidin amin gruplarına bağlanmasıyla nötral amid bağlarının oluşması sonucunda) kaynaklandığı düşünülmektedir.

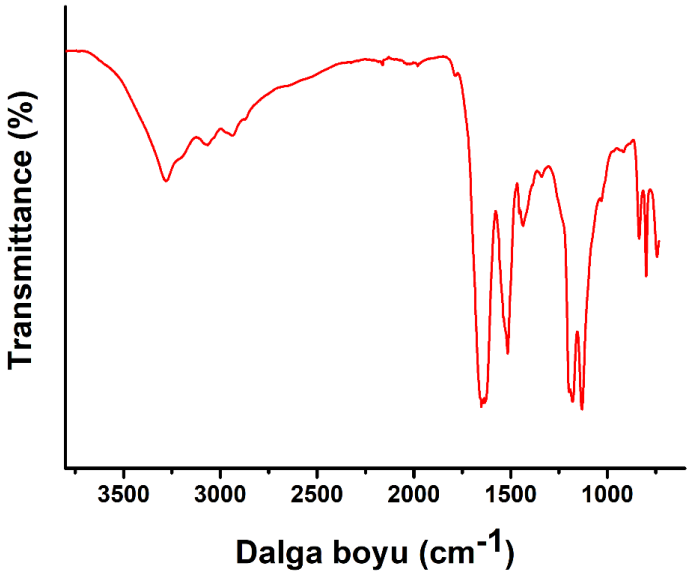
Sentezlenen nanopartiküller kurutulduktan sonra FT-IR analizleri yapıldı. Spektrumların karşılaştırılabilmeleri için aynı zamanda *Angiopep-2* peptidi ve serbest CAPE molekülünün de FT-IR analizi yapıldı.



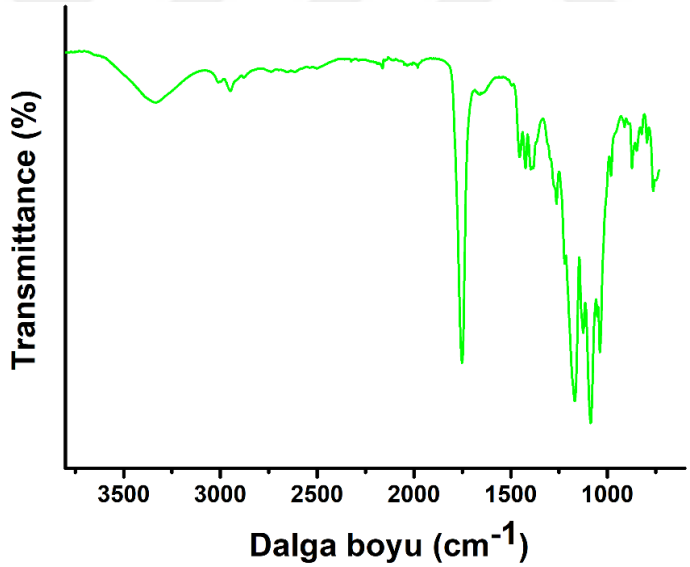
Şekil 5.8 Sentezlenen Boş PLGA nanopartiküllerinin FT-IR grafiği



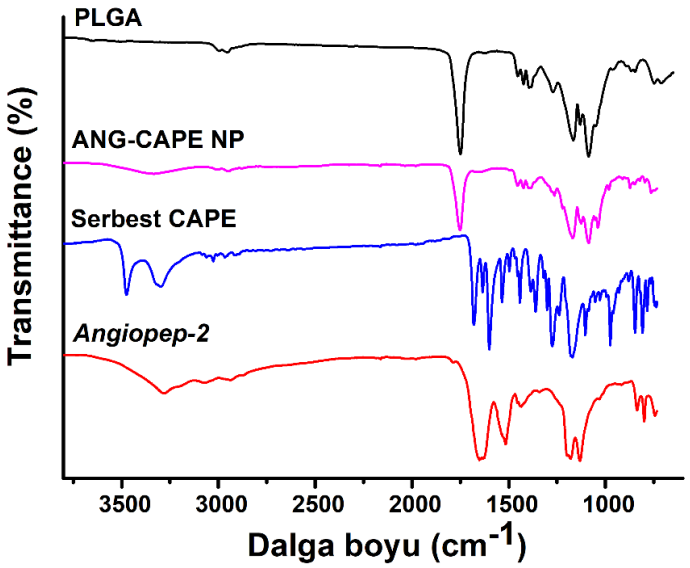
Şekil 5.9 Serbest CAPE molekülünün FT-IR grafiği



Şekil 5.10 Sentezlenen *Angiopep-2* peptidinin FT-IR grafiği



Şekil 5.11 Sentezlenen *Angiopep-2* peptidiyle hedeflendirilmiş CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerinin FT-IR grafiği



Şekil 5.12 Boş PLGA NP, ANG-CAPE NP, serbest CAPE molekülü ve *Angiopep-2* peptidinin FT-IR spektrumlarının karşılaştırılması

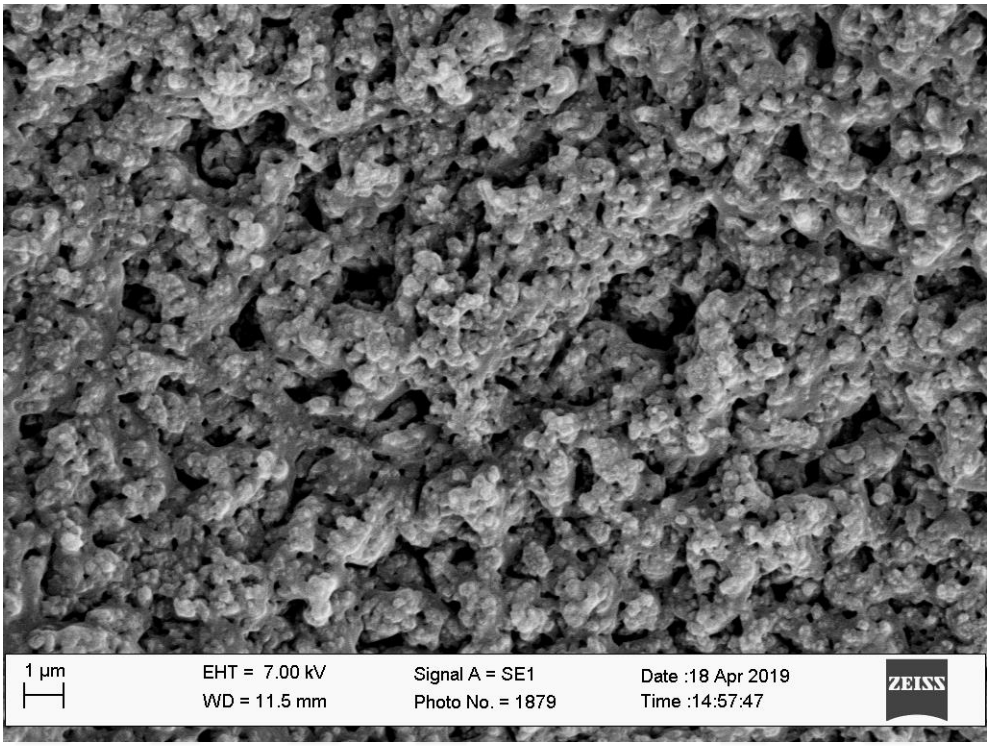
Şekil 5.8'te Boş PLGA nanopartiküllerinin FT-IR spektrumları görülmektedir. Şekilde de görüleceği üzere 2993 cm^{-1} ve 2989 cm^{-1} bantları sırasıyla CH_2'nin C – H gerilmesini ve – C – H'ın C – H gerilmesini temsil etmektedir. 1751 cm^{-1}'deki tek bant ester bağının C = O gerilmesine ve 1165 – 1087 cm^{-1}'deki bantlar ise PLGA'nın karakteristik C – O gerilmesine aittir.

Şekil 5.9'teki CAPE molekülünün 3471 ve 3320 cm^{-1}'deki bantları –OH gruplarını temsil etmektedirler. 1681, 1600 ve 1172 cm^{-1}'deki bantlar ise sırasıyla C = O, C = C ve C – O gerilmelerini temsil eder.

Şekil 5.10'teki *Angiopep-2* peptidine ait olan spektrumda 3250, 3000 ve 2875 cm^{-1}'deki bantlar amid II ve N – H gerilmesi arasında oluşan Fermi rezonansıyla meydana gelen Amid A'yı temsil etmektedir. 1600, 1500 ve 1400 cm^{-1}'deki bantlar sırasıyla C = O gerilmesiyle Amid I, N – H ve C – N gerilmleriyle Amid II ve Amid III olarak adlandırılan peptid ve proteinlerin kızılötesi spektrumundaki önemli bantları temsil ederler.

Şekil 5.11'da görülen *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü nanopartiküllerin FT-IR analizinde 3250 cm^{-1}'deki bandın peptidten gelen Amid bağı olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği doğrulandı.

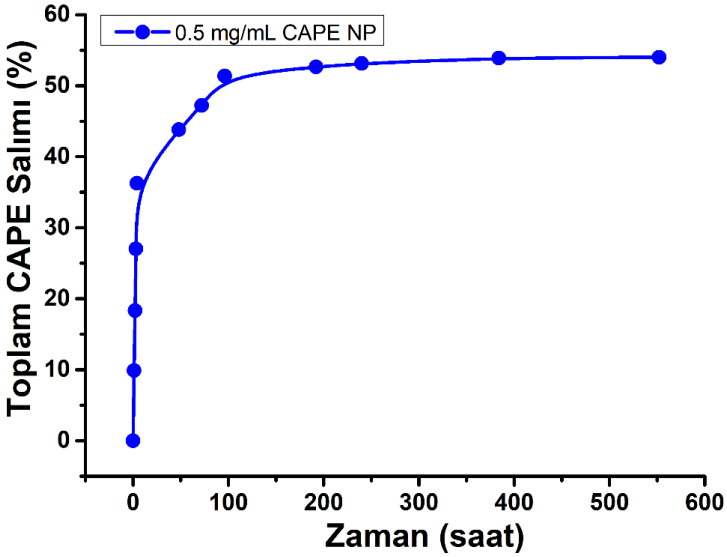
2993 ve 2989, 1751, 1165 ve 1087 cm^{-1}'deki bantlar ise yukarıda bahsedilen PLGA'nın yapısında bulunan karakteristik gerilmelere aittir. CAPE molekülüne ait bir bant gözlemlenememesi ise enkapsülasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve partikül yüzeyine herhangi bir adsorpsiyon olmadığını gösterdi.



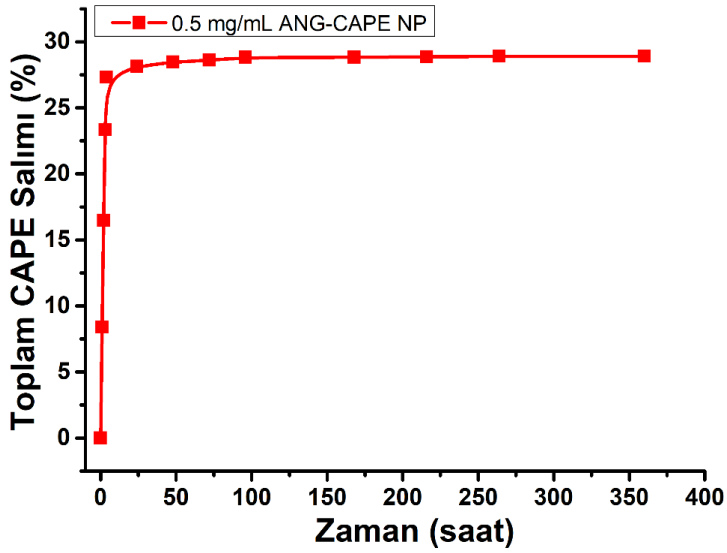
Şekil 5.13 CAPE NP'ye ait SEM görüntüsü

CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerinin SEM görüntüsü (şekil 5.13) incelendiğinde yüzeylerinde herhangi bir etken madde görülmediği, partiküllerin küresel yapıda oldukları ve oldukça monodispers oldukları görülmüştür.

Sentezlenen nanopartiküllerin *in vitro* salım çalışmaları PBS (0.05 M, pH 7.4, %0.01 sodyum azid) tamponunda fizyolojik koşullar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Partiküllerin salımı 552 saat boyunca gözlemlenmiş ve zamanın bir fonksiyonu olarak CAPE molekülünün kümülatif yüzdesi Şekil 5.14 ve 5.15'te gösterilmiştir. PLGA'nın bozunması yüzey difüzyonu, bulk (yığın) difüzyonu, yüzey erozyonu ve yığın erozyonunun birlikte oluşmasıyla gerçekleşir.



Şekil 5.14 pH 7.4'te CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerinin *in vitro* salım profili



Şekil 5.15 pH 7.4'te *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerinin *in vitro* salım profili

Şekil 5.14'de görüleceği üzere CAPE molekülünün salımı üç aşamalı şekilde gerçekleşmiştir. İlk dört saatte partikül yüzeyine yakın bölgede duran CAPE molekülleri burst salım yaparak %36'lık bir değere ulaşmışlardır. Bunu takip eden dört gün boyunca polimerin hidrofilik kısımlarının büyük bir kısmı su ile hidrolize

uğramaları sonucunda lineer bir salımla %51'lik bir değere ulaşılmıştır. Daha sonra polimerin bozunmasıyla salım sabit bir hızda devam ederek 23. gün sonunda %54'lük bir salım elde edilmiştir.

Şekil 5.15'de görüleceği üzere hedeflendirilmiş nanopartiküllerin CAPE salımı iki fazdan oluşmaktadır. İlk dört saat sonunda partikül yüzeyine yakın polimerlerin salımı sonunda %27'lik bir değere ulaşılmıştır. Daha sonraki zamanlarda ise salım sabit hızda devam ederek %29'luk bir salıma ulaşılmıştır. Hedeflendirilmiş nanopartiküllerin salım profilinin iki aşamadan oluşması ve daha az bir konsantrasyonda salım yapması yüzeyindeki bağlanmış peptidlerin içerdiği hidrofobik aminoasitlerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle hedeflendirilmiş nanopartiküllerde daha kontrollü ve uzun süreli bir salım gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

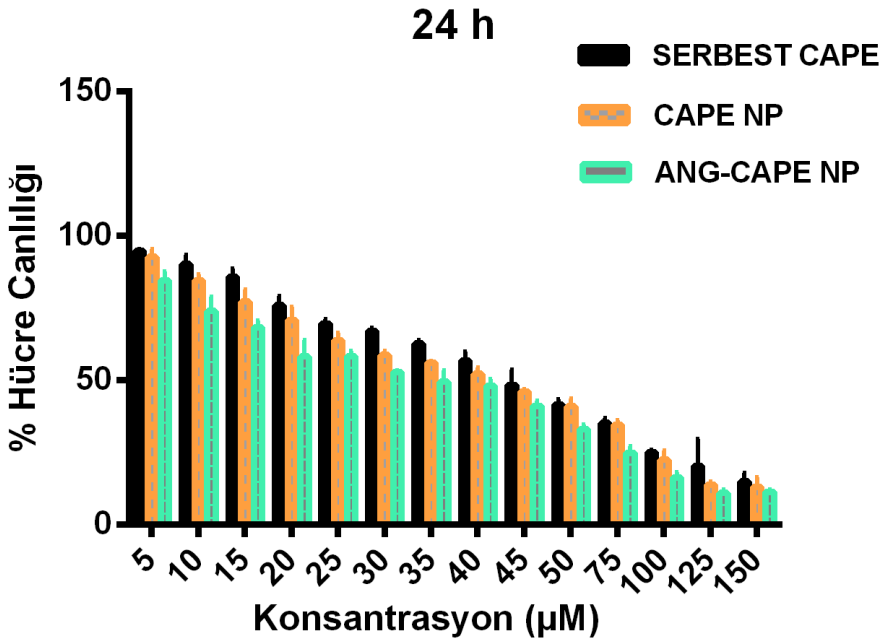
Partiküllerin *in vitro* salım profilleri incelenerek ilk 24, 48 ve 72. saatte saldıkları CAPE miktarı bulunarak etken madde yükleme kapasitesi ile birlikte elde edilen değerlerle hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak doz miktarları belirlenmiştir.

5.3 Nanopartiküllerin Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi

5.3.1 C6 Glioma Hücre Hattında Sitotoksisitenin İncelenmesi

Sentezlenen nanopartiküllerin sitotoksik etkileri incelenmek üzere C6 glioma hücre hatlarında MTT testi gerçekleştirilmiştir.

Hücerelere verilecek olan dozlar *in vitro* salım çalışması sonucu 24, 48 ve 72. saatlerde salınan CAPE molekülünün konsantrasyonu ve nanopartiküllerin etken madde yükleme kapasitesi yardımıyla hesaplanarak belirlenmiştir. Bunun sonucunda serbest CAPE molekülü, CAPE yüklü PLGA nanopartikülleri, *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü nanopartiküllerin 5 – 150 µM arasındaki konsantrasyonlarda hücrelere uygulanmasına karar verilmiştir. Şekil 5.16, 5.17 ve 5.18'de çeşitli konsantrasyonlardaki nanopartikül ve serbest CAPE molekülü verilen C6 glioma hücrelerinin canlılık oranları gösterilmiştir. Elde edilen grafikler sonucunda hücre hatlarına etki eden serbest molekülün ve nanopartiküllerin IC_{50} değerleri tespit edilmiştir.

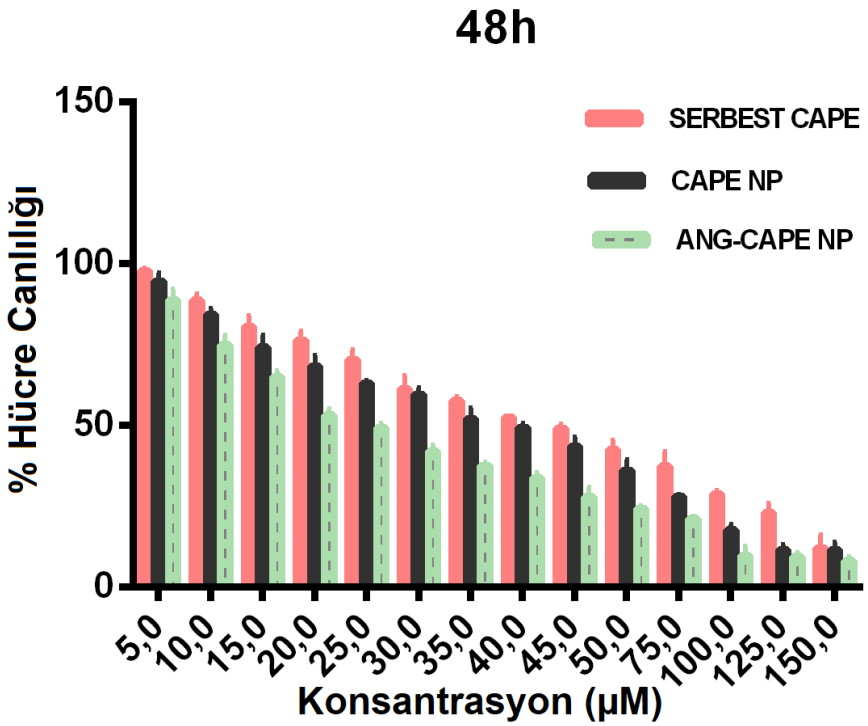


Şekil 5.16 C6 glioma hattına ait 24. saat hücre canlılık değerleri

Şekil 5.16'da görüldüğü üzere serbest CAPE molekülünün artan dozlarda etkili olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan çalışmalara uygun bir şekilde serbest CAPE molekülünün IC_{50} değeri 60 µM olarak bulunmuştur [11, 184-186]. Partiküler sistemin ise etken maddeye kıyasla hücre canlılık oranını daha etkili bir şekilde azaltmıştır. CAPE yüklü nanopartiküller için IC_{50} değeri 50 µM olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra *Angiopep-2* peptidiyle hedeflendirilmiş CAPE yüklü nanopartiküller ise hem diğer partiküler sistem hem de serbest etken maddeye kıyasla hücre canlılığı üzerinde oldukça etkili olmuştur. *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş nanopartiküllerin IC_{50} değeri 40 µM olarak hesaplanmıştır.

Şekil 5.17'de gösterilen 48. saat MTT sonuçlarına göre etken maddenin IC_{50} değeri 50 µM olarak bulunmuştur. CAPE yüklü nanopartiküllerin IC_{50} değeri ise 45 µM olarak bulunmuştur. *Angiopep- 2* ile hedeflendirilmiş nanopartiküllerin IC_{50} değeri ise 21 µM olarak bulunmuştur. 48. saat sonunda partiküler sistemin serbest maddeye kıyasla daha etkili olmasının sebebi ise CAPE yüklü nanopartiküllerin *in vitro* salım grafiğinde de görüleceği üzere 48. saat sonunda artan bir şekilde burst salım ile ortamda bulunan CAPE moleküllerinin konsantrasyonunu arttırmasıdır. Hedeflendirilmiş nanopartiküllerin gösterdikleri büyük fark ise burst salım ile ortamdaki artan CAPE konsantrasyonu ve partiküllerin yüzeylerindeki peptid

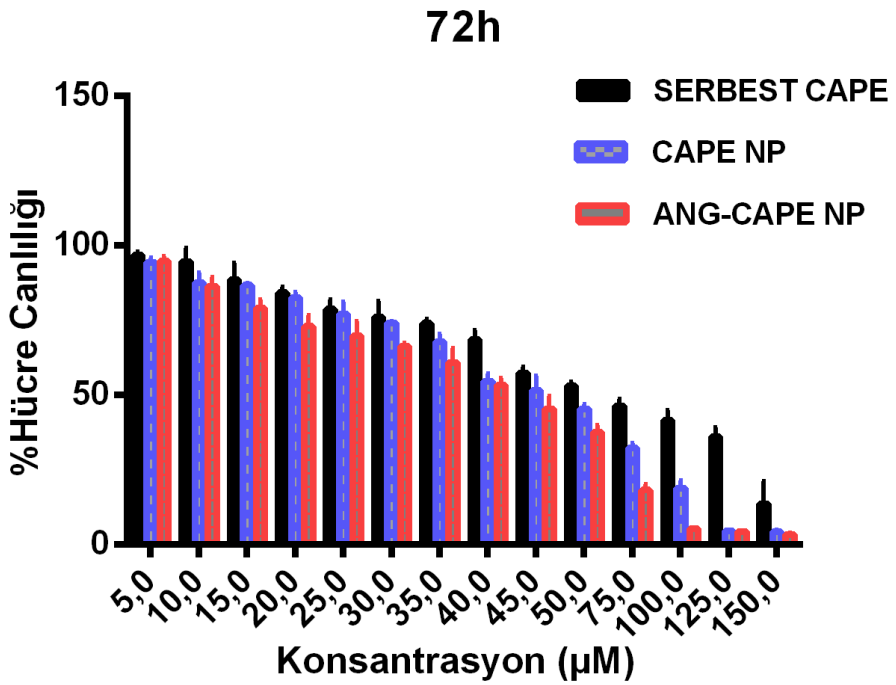
sayesinde glioma hücrelerinin yüzeyinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla bulunan LRP-1 reseptörlerine bağlanarak transitoz yoluyla hücre içerisine alınarak salım yapmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 5.17 C6 glioma hattına ait 48. saat hücre canlılık değerleri

Literatürde serbest CAPE molekülüyle yapılan çalışmalarda etken maddenin cyclin D1, EGFR gibi kanser yolaklarının ekspresyonunu azalttığı, kanser hücre hatlarında redoks sistemini (GSH seviyelerini) kontrol ederek apoptozu tetiklediği ve DNA fragmentasyonuna sebep olduğu ve NF-jB yolağını susturarak sitotoksik etkisi gösterdiği bilinmektedir [10, 12, 162-164]. 48. saat sonunda elde edilen bu sonuçların 24. saate göre daha iyi olması, etken madde ve diğer partiküler sisteme göre daha büyük bir etki göstermesi hücre içerisine reseptör aracılı transitoz [187] yoluyla alınan partiküllerin burada salım yaparak hücre içerisindeki yolaklara ulaşmasının ve etki etmesinin kolay olmasıyla açıklanabilir.

Şekil 5.18'de görüleceği gibi 72. saatin sonucunda serbest CAPE molekülü, CAPE yüklü nanopartiküller ve *angiopep-2* ile hedeflendirilmiş nanopartiküller için IC_{50} değerleri sırasıyla 75 µM, 50 µM ve 43 µM olarak bulunmuştur.



Şekil 5.18 C6 glioma hattına ait 72. saat hücre canlılık değerleri

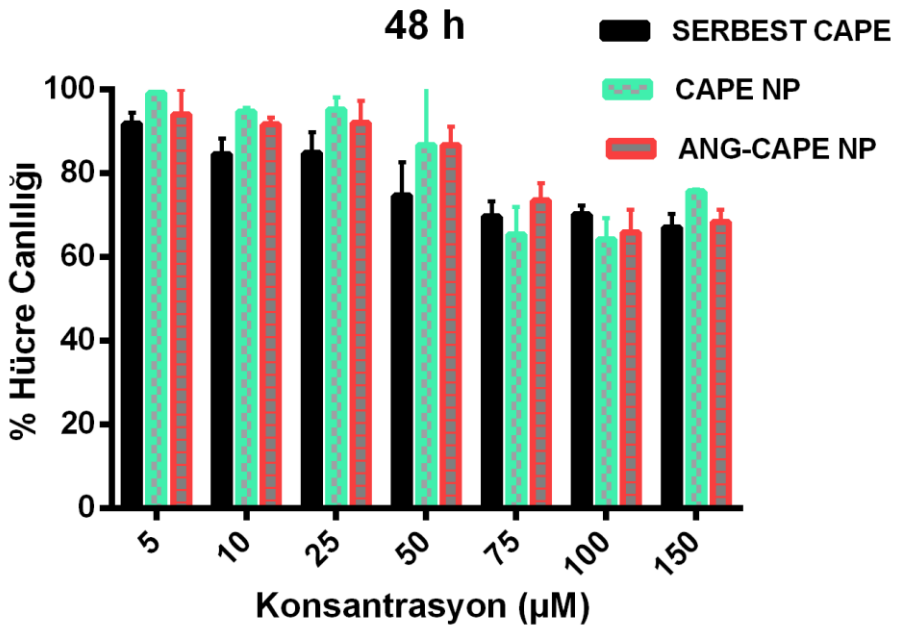
72. saatte meydana gelen IC_{50} değerlerindeki bu artış C6 glioma hattı hücrelerinin agresif bir şekilde çoğalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hedeflendirilmiş nanopartiküllerin etken madde ve diğer partiküler sisteme kıyasla daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak uygun doz aralıkları belirlenmiş ve C6 glioma hücre hatları üzerinde MTT ile sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü nanopartiküllerin etken maddeye ve CAPE yüklü nanopartiküllere kıyasla C6 glioma hücre hatlarına karşı daha etkili olduğu ve sitotoksik etkisinin daha fazla olduğu kanıtlanmıştır.

5.3.2 L929 Fibroblast Hücre Hattında Biyouyumluluğun İncelenmesi

Serbest CAPE ve nanopartiküllerin biyouyumluluk çalışmaları için L929 fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Her bir madde için uygulanan doz aralığı C6 glioma hücre hatlarında uygulanan aralıktır (5 – 150 µM).

48 saat sonunda MTT testi uygulanarak hücre canlılık değerleri elde edilmiştir (Şekil 5.19). Şekil 5.19'da görülebileceği üzere kullanılan doz aralığında hiçbir madde için önemli bir toksisite gözlemlenmemiştir.



Şekil 5.19 L929 hücre hattına ait 48. saat hücre canlılık değerleri

Yalnızca yüksek konsantrasyonlarda (>75 µM) yaklaşık %20 civarında toksisite gözlemlenmiştir. Sonuçlar serbest CAPE için literatürle de uyumludur [162]. Sonuç olarak sentezlenen nanopartiküllerin oldukça biyouyumlu oldukları bulunmuş ve IC_{50} konsantrasyonlarında sağlıklı hücrelere karşı herhangi bir toksik etkiye sahip olmadıkları görülmüştür.

5.4 Bulgular

Bu tez çalışması ile literatürde ilk kez CAPE yüklü PLGA nanopartikülleri yüzeyine *Angiopep-2* peptidi konjuge edilmiştir. İlk defa CAPE molekülünün nanopartiküler sistemlerle ve peptid ile hedeflendirilmiş nanopartiküler ilaç taşıma sistemleriyle glioma hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisi incelenmiştir. Partiküler sistemlerle etken madde; hedeflendirilmiş sistem ise hem etken madde hem de diğer partiküler sistemle karşılaştırılmıştır.

Angiopep-2 peptidi mikrodalga destekli katı faz peptid sentezleme cihazında sentezlenmiştir. Sentezlenen peptid LC-MS ile analiz edilerek %85 üzerinde saflıkla elde edildiği bulunmuştur ve çalışmalar için bu saflığın yeterli olduğuna karar kılınmıştır. Laboratuvarımızda daha önce yapılan tez çalışmasıyla optimizasyonu gerçekleştirilen CAPE yüklü PLGA nanopartiküllerinin sentezi tekli emülsiyon

çözücü uçurma yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Sentez sonucunda 136.8 nm ve -28.7 zeta potansiyele sahip nanopartiküller elde edilmiştir. *Angiopep-2* peptidi ile CAPE yüklü nanopartiküllerin konjugasyonu için EDC çapraz bağlayıcı ajan kullanılmıştır. Nanopartiküllerin hücreyle etkileşimi ve hücre içerisine girebilmesi için boyut ve yüzey yükü potansiyeli (zeta potansiyel) oldukça önemlidir. Bu nedenle konjugasyon reaksiyonu uygun boyut ve zeta potansiyel değerleri elde edilmesi amacıyla optimize edilmiştir. Bunun için farklı miktarlarda peptid ve EDC çapraz bağlayıcı ajan kullanılmıştır. Literatürde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kan beyin bariyerinin geçilebilmesi için partiküler sistemlerin 200 nm altında boyuta sahip olmaları gerektiği belirtilmiştir [188, 189]. Bu doğrultuda, 10 mg CAPE yüklü PLGA nanopartikülleri için 0.5 mg EDC ve 0.5 mg *angiopep-2* peptidi optimum değerler olarak kabul edilmiş ve yapılan konjugasyon reaksiyonu sonucunda 176.4 nm ve -10.8 mV değerinde zeta potansiyele sahip peptid ile kaplı nanopartiküller elde edilmiştir. Konjugasyon reaksiyonu sonucunda artan boyut reaksiyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermiştir. *Angiopep-2* peptidi konjugasyon reaksiyonları koşulunda (0.05 M, pH 5, MES tamponu) boyutu 12 nm ve zeta potansiyeli 12.6 mV olarak ölçülmüştür. Reaksiyon sonrası elde edilen nanopartiküllerin zeta potansiyelinin artması da yüzeye bağlanan pozitif yüklü peptidlerden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bu durum da bizlere yine konjugasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen uygun nanopartiküller liyofilizatörde kurutularak karakterizasyon ve hücre çalışmalarında toz formları kullanılmıştır.

Kuru haldeki nanopartiküller, etken madde ve peptid için 600 – 4000 cm^{-1} dalga boyları arasında FT-IR analizi yapılmıştır. Yapılan FT-IR analizi sonucunda CAPE molekülünün başarılı bir şekilde nanopartiküller içerisine enkapsülasyonunun gerçekleştiği ve partikül yüzeyinde herhangi adsorpsiyona rastlanmadığı görülmüştür. *Angiopep-2* peptidiyle hedeflendirilmiş nanopartiküllerin FT-IR analizinde 3250 cm^{-1} dalga boyunda partikül yüzeyine bağlı peptidlerden dolayı amid bağına ait bant gözlemlenmiştir. Aynı dalga boyundaki bant *Angiopep-2* peptidinin FT-IR grafiğinde de görülmüş ve peptid sentezinin de başarıyla gerçekleştiğini göstererek LC-MS analizini de doğrulamıştır. Böylelikle peptid ile

nanopartiküller arasındaki konjugasyon reaksiyonunun başarıyla gerçekleştiği kanıtlanmıştır.

Nanopartiküllerin SEM görüntülerinden küresel yapıda ve oldukça monodispers oldukları anlaşılmaktadır. Partiküllerin monodispers yapıda olması yani boyutlarının aynı büyüklükte olmaları biyolojik aktiviteleri açısından oldukça önem taşımaktadır.

Sentezlenen nanopartiküllerin *in vitro* salım çalışmaları fizyolojik şartları sağlamak adına pH 7.4 ve 0.01 M PBS tamponunda gerçekleştirilmiştir. 0.5 mg/ml konsantrasyonunda kuru partiküller PBS tamponunda hazırlanarak 37 C'de 120 rpm'de çalkalamalı inkübatörde salım çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, CAPE yüklü nanopartiküllerin 3 aşamalı salım yaptığı görülmüştür. İlk dört saatte partikül yüzeyine yakın bölgede duran CAPE molekülleri burst salım yaparak %36'lık bir değere ulaşmışlardır. Bunu takip eden dört gün boyunca polimerin nhidrofilik kısımlarının büyük bir kısmı su ile hidrolize uğramaları sonucunda lineer bir salımla %51'lik bir değere ulaşılmıştır. Daha sonra polimerin bozunmasıyla salım sabit bir hızda devam ederek 23. gün sonunda %54'lük bir salım elde edilmiştir. *Angiopep-2* peptidiyle hedeflendirilmiş nanopartiküllerin salım profili ise 2 aşamadan oluşmaktadır. İlk dört saat sonunda partikül yüzeyine yakın polimerlerin salımı sonunda %27'lik bir değere ulaşılmıştır. Daha sonraki zamanlarda ise salım sabit hızda devam ederek 15. gün sonunda %29'luk bir salıma ulaşılmıştır. Hedeflendirilmiş nanopartiküllerin salım profilinin iki aşamadan oluşması ve daha az bir konsantrasyonda salım yapması yüzeyindeki bağlanmış peptidlerin içerdiği hidrofobik aminoasitlerden dolayı olduğu düşünülmektedir.

Sentezlenen nanopartiküllerin biyouyumluluk ve sitotoksisite çalışmaları MTT yöntemiyle L929 fibroblast ve C6 glioma hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. Bunun için nanopartiküllerin etken madde yükleme kapasiteleri (DL) ve 24, 48 ve 72. saatlerde yaptıkları salımlardaki CAPE konsantrasyonu dikkate alınarak bir doz aralığı belirlenmiştir. Bu doz aralığının biyouyumluluğunu test etmek amacıyla da L929 fibroblast hücre hatları kullanılmıştır. Biyouyumluluk testlerinden sonra onaylanan doz aralığı 5 – 150 μM olarak belirlenmiştir. MTT testinin 24. saati sonunda serbest CAPE molekülü, CAPE yüklü nanopartiküller ve hedeflendirilmiş

nanopartiküller için IC_{50} değerleri sırasıyla 60 µM, 50 µM ve 40 µM olarak bulunmuştur. CAPE etken maddesi için elde edilen IC_{50} değeri literatürde yapılan çalışmalarla da uyumludur. Beklenildiği gibi her bir formülasyon için artan dozla birlikte hücre canlılık oranları azalmıştır. Partiküler sistemlerin IC_{50} değerlerinin etken maddeye kıyasla daha iyi olmasının sebebi yaptıkları salım profilinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İlk 24 saat içerisinde burst salıma devam eden CAPE yüklü nanopartiküller ilaç salımını bozunmaya uğradıkça zamana bağlı bir şekilde yapması etken maddenin çözünürlüğünün artmasında böylelikle daha iyi etki edebilmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda hedeflendirilmiş nanopartikülün de ilk 24 saat içerisinde burst salım yapması ve yüzeyinde bulunan peptidler sayesinde hücre membranına tutunmuş veya hücre içerisine girmiş halde hücre ile etkileşimde bulunarak salım yapması IC_{50} değerinin diğerlerinden daha iyi olmasını açıkladığı düşünülmektedir.

MTT testinin 48. saati sonunda elde edilen IC_{50} değerleri ise CAPE etken maddesi, CAPE yüklü nanopartiküller ve hedeflendirilmiş nanopartiküller için sırasıyla 50 µM, 45 µM ve 21 µM olarak hesaplanmıştır. Partiküler sistemlerin IC_{50} değerlerinin etken maddeye ve ilk 24 saate kıyasla daha iyi olmasının sebebi hala burst salım yaparak ortamdaki ilaç konsantrasyonunun artmasıdır. CAPE yüklü nanopartiküllerinin 24. saatte yaptığı salım 48. saatte %38.2'den %43.8'e yükselmiştir. İlacın konsantrasyonunun artması ve polimer bozundukça salınması etken maddenin çözünürlüğünü arttırması 48 saatin sonundaki IC_{50} değerinin daha iyi olmasını açıkladığı düşünülmektedir. *Angiopep-2* ile hedeflendirilmiş nanopartiküllerin 48 saatin sonunda etken maddeye ve diğer partiküler sisteme nazaran büyük fark göstermesi ortamdaki artan CAPE konsantrasyonu ve ilaç çözünürlüğü olarak düşünülmektedir. Aynı zamanda partiküllerin yüzeyinde bulunan peptidler sayesinde glioma hücrelerinin yüzeyinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha fazla bulunan LRP-1 reseptörlerine bağlanarak transitoz yoluyla hücre içerisine alınarak salım yapmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde serbest CAPE molekülüyle yapılan çalışmalarda etken maddenin cyclin D1, EGFR gibi kanser yolaklarının ekspresyonunu azalttığı, kanser hücre hatlarında redoks sistemini (GSH seviyelerini) kontrol ederek apoptozu tetiklediği ve DNA fragmentasyonuna sebep olduğu ve NF-jB yolağını susturarak sitotoksik etkisi

gösterdiği bilinmektedir. 48. saat sonunda elde edilen bu sonuçların 24. saate göre daha iyi olması, etken madde ve diğer partiküler sisteme göre daha büyük bir etki göstermesi hücre içerisine reseptör aracılı transitoz yoluyla alınan partiküllerin miktarının artması ve burada salım yaparak hücre içerisindeki yolaklara ulaşmasının ve etki etmesinin kolay olmasıyla açıklanabilir. Hücre dışında salım yapan partiküler sistem ve CAPE etken maddesinin hücre içerisine girerek etki etmesinde en büyük engellerden birisi düşük ilaç çözünürlüğüdür. CAPE doğal olarak hidrofobik bir moleküldür.

Tablo 5.3 Yapılan tez çalışmasının literatürle karşılaştırması.

Hedefleme Ajanı	**İlaç**	**NP**	**IC_{50} Değeri (µg/ml)**			**Ref.**
			Serbest İlaç	**NP**	**Hedefli NP**	
Angiopep-2	DOX	PLGA	1.37*	6.18*	3.26*	[190]
Angiopep-2	Ginsenoside	PEG-PCL	540	434	348	[191]
RVG29	DTX	PEG-PLGA	23.8	10.1	6.6	[192]
Epha-3	Temodal	PLGA	-	71.42	30	[193]
Laktoferrin	Shikonin	PEG-PLGA	5.46	4.53	3.82	[194]
Angiopep-2	CAPE	PLGA	14.21 (50 µM)	12.8 (45 µM)	5.97 (21 µM)	-
Tez Çalışması						

**Bu çalışmada IC_{50} değerleri µM olarak verilmiştir.*

Partiküler sistemle taşınarak polimer bozundukça ortama salınması ve PLGA kopolimerinde bulunan hidrofilik PGA blokları ve glikolik asit monomerleri CAPE etken maddesinin ortamdaki çözünürlüğünü arttırdığı düşünülmektedir. Bu

nedenle partiküler sistemlerin IC_{50} değerlerinin 24 ve 48. saatler için etken maddeye nazaran daha iyi olması bunlarla açıklanabilir. *Angiopep-2* peptidiyle hedeflendirilmiş nanopartiküllerin glioma hücre reseptörleriyle etkileşime girerek hücre membranına yakın konumda olmaları ve reseptör aracılı transitoz yoluyla hücre içerisine alınmaları en iyi IC_{50} değerine sahip olamasını açıklayabilir. Hedeflendirilmiş sistemlerin hücre ile etkileşimlerinin artması sitotoksik etkiyi gösterebilmeleri için en büyük avantajlardan birisidir [139].

72. saatin sonucunda serbest CAPE molekülü, CAPE yüklü nanopartiküller ve *angiopep-2* ile hedeflendirilmiş nanopartiküller için IC_{50} değerleri sırasıyla 75 µM, 50 µM ve 43 µM olarak bulunmuştur. 72. saatte meydana gelen IC_{50} değerlerindeki bu artış C6 glioma hattı hücrelerinin agresif bir karakterde olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 3. günün sonunda partiküler sistemlerin etken maddeye kıyasla hücre canlılığı üzerinde daha fazla etkilerinin olması partiküler sistemlerin sağladığı avantajları gözler önüne sermektedir. Etken molekülün kontrollü salımıyla hücrelerin etken maddeye daha uzun süre maruz kalması IC_{50} değerlerinin arkasındaki en büyük sebeplerden birisidir.

Tez çalışması sonucu üretilen hedefli ilaç taşıma sistemi literatürde C6 glioma hattı üzerinde *angiopep-2* ile hedeflendirilmiş plga ve diğer polimerik nanopartiküller ve plga nanopartikülünün farklı hedefleme ajanlarıyla kullanılmasıyla yapılan çalışmalarla karşılaştırılmıştır (Tablo 5.3). Bunun için 48. saat IC_{50} değerleri kullanılmıştır.

Tablo 5.3'de görülebileceği üzere tez çalışması sonucu üretilen hedefli nanopartiküller, C6 glioma hücreleri üzerinde daha etkili sitotoksik aktiviteye sahiptir. Ayrıca literatürde yapılan bu çalışmalar doksorubisin (DOX), dosetaksel (DTX), temodal ve shikonin gibi sağlıklı hücrelere karşı da toksik etkisi bilinen birçok kemoterapik ilaçla gerçekleştirilmiştir [195]. Wang ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada doksorubisin yüklü *angiopep-2* ile hedeflendirilmiş PLGA nanopartiküllerinin IC_{50} değerinin serbest ilaca kıyasla daha fazla olduğu gösterilmiştir [190]. Bu da yapılan çalışmada istenilenin aksine serbest ilacın sitotoksik etkisinin daha fazla olduğunu ifade etmektedir. *Angiopep-2* ile hedefli başka bir polimerik nanopartikülün kullanıldığı çalışmada da yine IC_{50} değerlerinin

sunulan tez çalışmasına paralel şekilde, hedefli sistemin serbest ve nanopartiküler sisteme kıyasla en düşük IC_{50} değerine sahip olduğu görülmektedir. PLGA nanopartikülü kullanılarak hedefleme yapılan çalışmalarda kullanılan birçok ilacın oldukça toksik olduğu bilinmektedir. Sunulan tez çalışmasında hedefli nanopartiküllerin serbest CAPE, CAPE yüklü nanopartiküller ve literatürde benzer sistemlerle yapılan çalışmalara kıyasla C6 glioma hücre hatları üzerinde daha etkili sitotoksik aktivite gösterdiği bulunmuştur. C6 glioma hücre hatlarına karşı sitotoksik olan (IC_{50}:21 μM) dozu da içerecek şekilde uygulanan doz aralığında (5 – 150 μM) L929 fibroblast hücre hatlarında her üç sistemin de herhangi bir toksik etkisi gözlenmemiştir.

Elde edilen sonuçlar bu tez çalışmasında üretilen *angiopep-2* ile hedeflendirilmiş CAPE yüklü nanopartiküllerin C6 glioma hücre hatları üzerinde sitotoksik etki sağlarken sağlıklı hücreler için biyouyumlu olduğunu göstermiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında CAPE moleküllerinin nanopartiküllere yüklenerek *angiopep-2* ile hedeflenmesi sonucunda C6 glioma hücreleri üzerinde artan bu sitotoksik etkinin;

- CAPE etken maddesinin partiküler taşıma sistemleri bozunmaya uğradıkça kontrollü bir şekilde salınması ve böylelikle hücrelerin etken maddeye daha uzun bir süre maruz kalması,
- Kontrollü salım ile etken maddenin ortamdaki çözünürlüğünün artması,
- PLGA'da bulunan hidrofilik PGA blokları ve glikolik asit monomerlerinin etken maddenin çözünürlüğünü arttırması,
- Artan çözünürlükten dolayı etken maddenin hücre içerisine girmesinin kolaylaşması,
- Nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan *angiopep-2* peptidinin glioma hücre yüzeyinde bulunan LRP-1 reseptörleriyle etkileşiminin nanopartiküllerin hücre yüzeyine tutunmasını ve transitoz yoluyla hücre içerisine girmesini sağlaması,
- Yüzeydeki peptidler sayesinde hücre membranında ve hücre içerisinde salımın yapılması, böylelikle CAPE molekülünün kanser yolakları üzerindeki etkinliğinin ve kontrolünün artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda etken maddenin biyouyumlu PLGA nanopartikülleriyle taşınmasının etken maddenin çözünürlüğünü arttırması, toksisitelerini azaltması ve sitotoksik özelliklerinin artması hedeflenmiştir. Yüzeyleri hedefleyici peptidlerle fonksiyonelleştirilen nanopartiküllerin glioma hücreleri ile etkileşimlerinin artması ve sitotoksik özelliklerinin artması beklenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, fonksiyonel PLGA nanopartikül sistemlerinin glioma kanser hedeflenmesinde kullanılabileceği görülmüştür. Geliştirilen ilaç taşıma sisteminin genotoksisite, hücre göçü, antioksidant aktivitelerinin *in vitro* çalışmalarla test edilmesiyle hücre içerisindeki mekanizmasının aydınlatılması önerilmektedir. Böylelikle bu çalışmada geliştirilen ilaç taşıma sistemlerinin daha da iyileştirilerek *in vivo* ve klinik çalışmalara önayak olması önerilmektedir. Bu tez doğrultusunda elde edilen *in vitro* bulgular *in vivo* çalışmalar için bir ön deneme niteliğindedir.

Kaynakça

[1] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, *et al.*, "Drug delivery systems: An updated review," *International journal of pharmaceutical investigation,* vol. 2, p. 2, 2012.

[2] K. Tahara, Y. Miyazaki, Y. Kawashima, J. Kreuter, and H. Yamamoto, "Brain targeting with surface-modified poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles delivered via carotid artery administration," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* vol. 77, pp. 84-88, 2011.

[3] Y.-C. Chen, W.-Y. Hsieh, W.-F. Lee, and D.-T. Zeng, "Effects of surface modification of PLGA-PEG-PLGA nanoparticles on loperamide delivery efficiency across the blood–brain barrier," *Journal of biomaterials applications,* vol. 27, pp. 909-922, 2013.

[4] T. Ren, N. Xu, C. Cao, W. Yuan, X. Yu, J. Chen, *et al.*, "Preparation and therapeutic efficacy of polysorbate-80-coated amphotericin B/PLA-b-PEG nanoparticles," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,* vol. 20, pp. 1369-1380, 2009.

[5] A. Russo, R. Longo, and A. Vanella, "Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin," *Fitoterapia,* vol. 73, pp. S21-S29, 2002.

[6] D. Grunberger, R. Banerjee, K. Eisinger, E. Oltz, L. Efros, M. Caldwell, *et al.*, "Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis," *Experientia,* vol. 44, pp. 230-232, 1988.

[7] W.-M. Wu, L. Lu, Y. Long, T. Wang, L. Liu, Q. Chen, *et al.*, "Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: a structure–activity insight," *Food Chemistry,* vol. 105, pp. 107-115, 2007.

[8] M. F. Tolba, S. S. Azab, A. E. Khalifa, S. Z. Abdel-Rahman, and A. B. Abdel-Naim, "Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects," *IUBMB life,* vol. 65, pp. 699-709, 2013.

[9] H. S. Lee, S. Y. Lee, S. H. Park, J. H. Lee, S. K. Ahn, Y. M. Choi, *et al.*, "Antimicrobial medical sutures with caffeic acid phenethyl ester and their in vitro/in vivo biological assessment," *MedChemComm,* vol. 4, pp. 777-782, 2013.

[10] T.-W. Chung, S.-K. Moon, Y.-C. Chang, J.-H. Ko, Y.-C. Lee, G. Cho, *et al.*, "Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism," *The FASEB Journal,* vol. 18, pp. 1670-1681, 2004.

[11] W.-L. Lin, W.-H. Liang, Y.-J. Lee, S.-K. Chuang, and T.-H. Tseng, "Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75NTR in C6 glioma cells," *Chemico-Biological Interactions,* vol. 188, pp. 607-615, 2010/12/05/ 2010.

[12] Z. G. G. Ozturk, S. Akyol, G. Erden, A. Gurel, O. Akyol, "The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers," *European Review for Medical and Pharmacological Sciences,* vol. 16, pp. 2064-2068, 2012.

[13] I. T. Gavrilovic and J. B. Posner, "Brain metastases: epidemiology and pathophysiology," *Journal of neuro-oncology,* vol. 75, pp. 5-14, 2005.

[14] J. Ferlay, D. Parkin, and E. Steliarova-Foucher, "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008," *European journal of cancer,* vol. 46, pp. 765-781, 2010.

[15] A. S. Zhang, Q. T. Ostrom, C. Kruchko, L. Rogers, D. M. Peereboom, and J. S. Barnholtz-Sloan, "Complete prevalence of malignant primary brain tumors registry data in the United States compared with other common cancers, 2010," *Neuro-oncology,* vol. 19, pp. 726-735, 2016.

[16] C. Rouse, H. Gittleman, Q. T. Ostrom, C. Kruchko, and J. S. Barnholtz-Sloan, "Years of potential life lost for brain and CNS tumors relative to other cancers in adults in the United States, 2010," *Neuro-oncology,* vol. 18, pp. 70-77, 2015.

[17] M. L. Bondy, M. E. Scheurer, B. Malmer, J. S. Barnholtz-Sloan, F. G. Davis, D. Il'Yasova, *et al.*, "Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium," *Cancer,* vol. 113, pp. 1953-1968, 2008.

[18] V. S. Benson, K. Pirie, J. Green, D. Casabonne, and V. Beral, "Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort," *British journal of cancer,* vol. 99, p. 185, 2008.

[19] E. Linos, T. Raine, A. Alonso, and D. Michaud, "Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis," *Journal of the National Cancer Institute,* vol. 99, pp. 1544-1550, 2007.

[20] H. Ohgaki, Y.-H. Kim, and J. P. Steinbach, "Nervous system tumors associated with familial tumor syndromes," *Current opinion in neurology,* vol. 23, pp. 583-591, 2010.

[21] M. N. Bainbridge, G. N. Armstrong, M. M. Gramatges, A. A. Bertuch, S. N. Jhangiani, H. Doddapaneni, *et al.*, "Germline mutations in shelterin complex genes are associated with familial glioma," *JNCI: Journal of the National Cancer Institute,* vol. 107, 2015.

[22] S. Shete, F. J. Hosking, L. B. Robertson, S. E. Dobbins, M. Sanson, B. Malmer, *et al.*, "Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma," *Nature genetics,* vol. 41, p. 899, 2009.

[23] M. Wrensch, R. B. Jenkins, J. S. Chang, R.-F. Yeh, Y. Xiao, P. A. Decker, *et al.*, "Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility," *Nature genetics,* vol. 41, p. 905, 2009.

[24] R. B. Jenkins, Y. Xiao, H. Sicotte, P. A. Decker, T. M. Kollmeyer, H. M. Hansen, *et al.*, "A low-frequency variant at 8q24. 21 is strongly associated with risk of oligodendroglial tumors and astrocytomas with IDH1 or IDH2 mutation," *Nature genetics,* vol. 44, p. 1122, 2012.

[25] T. Rice, S. Zheng, P. A. Decker, K. M. Walsh, P. Bracci, Y. Xiao, *et al.*, "Inherited variant on chromosome 11q23 increases susceptibility to IDH-mutated but not IDH-normal gliomas regardless of grade or histology," *Neuro-oncology*, vol. 15, pp. 535-541, 2013.

[26] S. N. Stacey, P. Sulem, A. Jonasdottir, G. Masson, J. Gudmundsson, D. F. Gudbjartsson, *et al.*, "A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility," *Nature genetics*, vol. 43, p. 1098, 2011.

[27] K. M. Walsh, V. Codd, I. V. Smirnov, T. Rice, P. A. Decker, H. M. Hansen, *et al.*, "Variants near TERT and TERC influencing telomere length are associated with high-grade glioma risk," *Nature genetics*, vol. 46, p. 731, 2014.

[28] P. Rajaraman, B. S. Melin, Z. Wang, R. McKean-Cowdin, D. S. Michaud, S. S. Wang, *et al.*, "Genome-wide association study of glioma and meta-analysis," *Human genetics*, vol. 131, pp. 1877-1888, 2012.

[29] S. Yunoue, H. Tokuo, K. Fukunaga, L. Feng, T. Ozawa, T. Nishi, *et al.*, "Neurofibromatosis type I tumor suppressor neurofibromin regulates neuronal differentiation via its GTPase-activating protein function toward Ras," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, pp. 26958-26969, 2003.

[30] S. Pfister, W. G. Janzarik, M. Remke, A. Ernst, W. Werft, N. Becker, *et al.*, "BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas," *The Journal of clinical investigation*, vol. 118, pp. 1739-1749, 2008.

[31] D. T. Jones, S. Kocialkowski, L. Liu, D. M. Pearson, L. M. Bäcklund, K. Ichimura, *et al.*, "Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas," *Cancer research*, vol. 68, pp. 8673-8677, 2008.

[32] R. Weber, A. Hoischen, M. Ehrler, P. Zipper, K. Kaulich, B. Blaschke, *et al.*, "Frequent loss of chromosome 9, homozygous CDKN2A/p14 ARF/CDKN2B deletion and low TSC1 mRNA expression in pleomorphic xanthoastrocytomas," *Oncogene*, vol. 26, p. 1088, 2007.

[33] C. Koelsche, F. Sahm, A. Wöhrer, A. Jeibmann, J. Schittenhelm, P. Kohlhof, *et al.*, "BRAF-Mutated Pleomorphic Xanthoastrocytoma is Associated with Temporal Location, Reticulin Fiber Deposition and CD 34 Expression," *Brain pathology*, vol. 24, pp. 221-229, 2014.

[34] E. Huillard, R. Hashizume, J. J. Phillips, A. Griveau, R. A. Ihrie, Y. Aoki, *et al.*, "Cooperative interactions of BRAF^{V600E} kinase and CDKN2A locus deficiency in pediatric malignant astrocytoma as a basis for rational therapy," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, pp. 8710-8715, 2012.

[35] J. A. Chan, H. Zhang, P. S. Roberts, S. Jozwiak, G. Wieslawa, J. Lewin-Kowalik, *et al.*, "Pathogenesis of Tuberous Sclerosis Subependymal Giant Cell Astrocytomas: Biallelic Inactivation of TSC1 or TSC2 Leads to mTOR Activation," *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, vol. 63, pp. 1236-1242, 2004.

[36] D. A. Krueger, M. M. Care, K. Holland, K. Agricola, C. Tudor, P. Mangeshkar, *et al.*, "Everolimus for Subependymal Giant-Cell Astrocytomas in Tuberous Sclerosis," *New England Journal of Medicine,* vol. 363, pp. 1801-1811, 2010.

[37] F. Sahm, D. Reuss, C. Koelsche, D. Capper, J. Schittenhelm, S. Heim, *et al.*, "Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma," *Acta Neuropathologica,* vol. 128, pp. 551-559, October 01 2014.

[38] H. Yan, D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, *et al.*, "IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas," *New England Journal of Medicine,* vol. 360, pp. 765-773, 2009.

[39] J. Balss, J. Meyer, W. Mueller, A. Korshunov, C. Hartmann, and A. von Deimling, "Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors," *Acta Neuropathologica,* vol. 116, pp. 597-602, December 01 2008.

[40] T. Watanabe, A. Vital, S. Nobusawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, "Selective acquisition of IDH1 R132C mutations in astrocytomas associated with Li-Fraumeni syndrome," *Acta Neuropathologica,* vol. 117, pp. 653-656, June 01 2009.

[41] M. Sasaki, C. B. Knobbe, M. Itsumi, A. J. Elia, I. S. Harris, I. I. C. Chio, *et al.*, "D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function," *Genes & Development,* vol. 26, pp. 2038-2049, September 15, 2012 2012.

[42] H. Ohgaki, P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.-L. Di Patre, *et al.*, "Genetic Pathways to Glioblastoma," *A Population-Based Study,* vol. 64, pp. 6892-6899, 2004.

[43] D. Rohle, J. Popovici-Muller, N. Palaskas, S. Turcan, C. Grommes, C. Campos, *et al.*, "An Inhibitor of Mutant IDH1 Delays Growth and Promotes Differentiation of Glioma Cells," *Science,* vol. 340, pp. 626-630, 2013.

[44] C. L. Appin and D. J. Brat, "Molecular Pathways in Gliomagenesis and Their Relevance to Neuropathologic Diagnosis," *Advances in Anatomic Pathology,* vol. 22, pp. 50-58, 2015.

[45] A. Talacchi, B. Santini, S. Savazzi, and M. Gerosa, "Cognitive effects of tumour and surgical treatment in glioma patients," *Journal of Neuro-Oncology,* vol. 103, pp. 541-549, July 01 2011.

[46] M. Clinic. (2019). *Diagnosis and Treatment of Glioma*. Available: https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/glioma/diagnosis-treatment/drc-20350255

[47] M. J. B. Taphoorn, A. K. Schiphorst, F. J. Snoek, J. Lindeboom, J. G. Wolbers, A. B. M. F. Karim, *et al.*, "Cognitive functions and quality of life in patients with low-grade gliomas: The impact of radiotherapy," *Annals of Neurology,* vol. 36, pp. 48-54, 1994.

[48] P. D. Brown, K. V. Ballman, T. A. Rummans, M. J. Maurer, J. A. Sloan, B. F. Boeve, *et al.*, "Prospective Study of Quality of Life in Adults with Newly

Diagnosed High-grade Gliomas," *Journal of Neuro-Oncology,* vol. 76, pp. 283-291, February 01 2006.

[49] M. Klein, "Neurocognitive functioning in adult WHO grade II gliomas: impact of old and new treatment modalities," *Neuro-Oncology,* vol. 14, pp. iv17-iv24, 2012.

[50] J. T.-P. Gemma Vilar, Fernando Albericio, "Polymers and Drug Delivery Systems," *Current Drug Delivery,* vol. 9, 2012.

[51] A. Misra, S. Ganesh, A. Shahiwala, and S. P. Shah, "Drug delivery to the central nervous system: a review," *J Pharm Pharm Sci,* vol. 6, pp. 252-273, 2003.

[52] R. H. Müller, K. Mäder, and S. Gohla, "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery–a review of the state of the art," *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics,* vol. 50, pp. 161-177, 2000.

[53] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. Stevens, and G. M. Eccleston, "Wound healing dressings and drug delivery systems: a review," *Journal of pharmaceutical sciences,* vol. 97, pp. 2892-2923, 2008.

[54] A. Samad, Y. Sultana, and M. Aqil, "Liposomal drug delivery systems: an update review," *Current drug delivery,* vol. 4, pp. 297-305, 2007.

[55] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. M. Dave, S. G. Kumbar, and W. Rudzinski, "Stimulus-responsive "smart" hydrogels as novel drug delivery systems," *Drug development and industrial pharmacy,* vol. 28, pp. 957-974, 2002.

[56] W. M. Pardridge, "Blood–brain barrier delivery," *Drug discovery today,* vol. 12, pp. 54-61, 2007.

[57] P. A. Stewart, "Endothelial vesicles in the blood–brain barrier: are they related to permeability?," *Cellular and molecular neurobiology,* vol. 20, pp. 149-163, 2000.

[58] R. Daneman and M. Rescigno, "The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different?," *Immunity,* vol. 31, pp. 722-735, 2009.

[59] W. M. Pardridge, "Molecular biology of the blood-brain barrier," *Molecular biotechnology,* vol. 30, pp. 57-69, 2005.

[60] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson, "Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier," *Nature reviews neuroscience,* vol. 7, p. 41, 2006.

[61] M. M. Patel, B. R. Goyal, S. V. Bhadada, J. S. Bhatt, and A. F. Amin, "Getting into the Brain," *CNS Drugs,* vol. 23, pp. 35-58, January 01 2009.

[62] G. Kamalinia, F. Khodagholi, F. Shaerzadeh, F. Tavssolian, F. Chaharband, F. Atyabi, *et al.*, "Cationic Albumin-Conjugated Chelating Agent as a Novel Brain Drug Delivery System in Neurodegeneration," *Chemical Biology & Drug Design,* vol. 86, pp. 1203-1214, 2015.

[63] L. Liu, S. S. Venkatraman, Y.-Y. Yang, K. Guo, J. Lu, B. He, *et al.*, "Polymeric micelles anchored with TAT for delivery of antibiotics across the blood–brain barrier," *Peptide Science,* vol. 90, pp. 617-623, 2008.

[64] M. M. Patel and B. M. Patel, "Crossing the Blood–Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain," *CNS Drugs,* vol. 31, pp. 109-133, February 01 2017.

[65] X. Wei, C. Zhan, Q. Shen, W. Fu, C. Xie, J. Gao, *et al.*, "A D-peptide ligand of nicotine acetylcholine receptors for brain-targeted drug delivery," *Angewandte Chemie International Edition,* vol. 54, pp. 3023-3027, 2015.

[66] B. Zhang, X. Sun, H. Mei, Y. Wang, Z. Liao, J. Chen, *et al.*, "LDLR-mediated peptide-22-conjugated nanoparticles for dual-targeting therapy of brain glioma," *Biomaterials,* vol. 34, pp. 9171-9182, 2013.

[67] A. S. Haqqani, C. E. Delaney, E. Brunette, E. Baumann, G. K. Farrington, W. Sisk, *et al.*, "Endosomal trafficking regulates receptor-mediated transcytosis of antibodies across the blood brain barrier," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism,* vol. 38, pp. 727-740, 2018.

[68] A. R. Simard and S. Rivest, "Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia," *The FASEB Journal,* vol. 18, pp. 998-1000, 2004.

[69] I. Bechmann, J. Goldmann, A. D. Kovac, E. Kwidzinski, E. Simbürger, F. Naftolin, *et al.*, "Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia," *The FASEB Journal,* vol. 19, pp. 647-649, 2005.

[70] I. Mena and G. C. Cotzias, "Protein Intake and Treatment of Parkinson's Disease with Levodopa," *New England Journal of Medicine,* vol. 292, pp. 181-184, 1975.

[71] E. M. Cornford, S. Hyman, and B. E. Swartz, "The Human Brain GLUT1 Glucose Transporter: Ultrastructural Localization to the Blood—Brain Barrier Endothelia," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism,* vol. 14, pp. 106-112, 1994.

[72] S. k. L. Jae Hyung Parka, Jong-Ho Kim, Kyeongsoon Park, Kwangmeyung Kimb, Chan Kwon, "Polymeric nanomedicine for cancer therapy," *Progress in Polymer Science,* vol. 33, pp. 113-137, 2008.

[73] V. L. Sanjeeb K. Sahoo, "Nanotech approaches to drug delivery and imaging," *Drug discovery today,* vol. 8, pp. 1112-1120, 2003.

[74] S. K. Y. Avnesh Kumari, Subhash C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* vol. 75, pp. 1-18, 2010.

[75] E. C. P. D. Willie E. Bawarski Pharm D, Dhruba J. Bharali PhD, Shaker A. Mousa PhD, MBA, "Emerging nanopharmaceuticals," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,* vol. 4, pp. 273-282, 2008.

[76] L. Qiu, N. Jing, and Y. Jin, "Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method," *International Journal of Pharmaceutics,* vol. 361, pp. 56-63, 2008/09/01/ 2008.

[77] L. N. Eadie, T. P. Hughes, and D. L. White, "Interaction of the Efflux Transporters ABCB1 and ABCG2 With Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib," *Clinical Pharmacology & Therapeutics,* vol. 95, pp. 294-306, 2014.

[78] K.-i. Ogawara, K. Un, K.-i. Tanaka, K. Higaki, and T. Kimura, "In vivo anti-tumor effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOX-resistant tumor-bearing

mice: Involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells," *Journal of Controlled Release,* vol. 133, pp. 4-10, 2009/01/05/ 2009.

[79] C. Weber, C. Coester, J. Kreuter, and K. Langer, "Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutics,* vol. 194, pp. 91-102, 2000/01/20/ 2000.

[80] M. L. Yogeshkumar Malam, Alexander M. Seifalian, "Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer," *Trends in Pharmacological Sciences,* vol. 30, pp. 592-599, 2009.

[81] E. Leo, M. Angela Vandelli, R. Cameroni, and F. Forni, "Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: Involvement of the drug in the cross-linking process," *International Journal of Pharmaceutics,* vol. 155, pp. 75-82, 1997/09/12/ 1997.

[82] I. Ezpeleta, J. M. Irache, S. Stainmesse, C. Chabenat, J. Gueguen, Y. Popineau, *et al.*, "Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid," *International Journal of Pharmaceutics,* vol. 131, pp. 191-200, 1996/04/19/ 1996.

[83] N. M. Molino and S.-W. Wang, "Caged protein nanoparticles for drug delivery," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 28, pp. 75-82, 2014/08/01/ 2014.

[84] A. O. Elzoghby, M. M. Elgohary, and N. M. Kamel, "Chapter Six - Implications of Protein- and Peptide-Based Nanoparticles as Potential Vehicles for Anticancer Drugs," in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. vol. 98, R. Donev, Ed., ed: Academic Press, 2015, pp. 169-221.

[85] M. Tarhini, H. Greige-Gerges, and A. Elaissari, "Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules," *International Journal of Pharmaceutics,* vol. 522, pp. 172-197, 2017/04/30/ 2017.

[86] S. Stanley, "Biological nanoparticles and their influence on organisms," *Current Opinion in Biotechnology,* vol. 28, pp. 69-74, 2014/08/01/ 2014.

[87] G. Collet, C. Grillon, M. Nadim, and C. Kieda, "Trojan horse at cellular level for tumor gene therapies," *Gene,* vol. 525, pp. 208-216, 2013/08/10/ 2013.

[88] G. Müller, C. Jung, J. Straub, S. Wied, and W. Kramer, "Induced release of membrane vesicles from rat adipocytes containing glycosylphosphatidylinositol-anchored microdomain and lipid droplet signalling proteins," *Cellular Signalling,* vol. 21, pp. 324-338, 2009/02/01/ 2009.

[89] C. S. Von Bartheld and A. L. Altick, "Multivesicular bodies in neurons: Distribution, protein content, and trafficking functions," *Progress in Neurobiology,* vol. 93, pp. 313-340, 2011/03/01/ 2011.

[90] T. Hevonoja, M. O. Pentikäinen, M. T. Hyvönen, P. T. Kovanen, and M. Ala-Korpela, "Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids,* vol. 1488, pp. 189-210, 2000/11/15/ 2000.

[91] E. C. Theil, "Ferritin: The Protein Nanocage and Iron Biomineral in Health and in Disease," *Inorganic Chemistry,* vol. 52, pp. 12223-12233, 2013/11/04 2013.

[92] G. C. Papaefthymiou, "The Mössbauer and magnetic properties of ferritin cores," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects,* vol. 1800, pp. 886-897, 2010/08/01/ 2010.

[93] C. T. Lefèvre and D. A. Bazylinski, "Ecology, Diversity, and Evolution of Magnetotactic Bacteria," *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* vol. 77, pp. 497-526, 2013.

[94] H. N. Atsushi Arakaki , Michiko Nemoto , Tetsushi Mori and Tadashi Matsunaga, "Formation of magnetite by bacteria and its application," *Journal of The Royal Society Interface,* vol. 5, 2008.

[95] A. Zeltins, "Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review," *Molecular Biotechnology,* vol. 53, pp. 92-107, January 01 2013.

[96] J.-W. Yoo, D. J. Irvine, D. E. Discher, and S. Mitragotri, "Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers," *Nature Reviews Drug Discovery,* vol. 10, p. 521, 07/01/online 2011.

[97] R. Ladj, A. Bitar, M. Eissa, Y. Mugnier, R. Le Dantec, H. Fessi, *et al.*, "Individual inorganic nanoparticles: preparation, functionalization and in vitro biomedical diagnostic applications," *Journal of Materials Chemistry B,* vol. 1, pp. 1381-1396, 2013.

[98] A. S. Teja and P.-Y. Koh, "Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles," *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials,* vol. 55, pp. 22-45, 2009/03/01/ 2009.

[99] J. K. Oh and J. M. Park, "Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application," *Progress in Polymer Science,* vol. 36, pp. 168-189, 2011/01/01/ 2011.

[100] H. Zou, S. Wu, and J. Shen, "Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation, Characterization, Properties, and Applications," *Chemical Reviews,* vol. 108, pp. 3893-3957, 2008/09/10 2008.

[101] R. Lévy, U. Shaheen, Y. Cesbron, and V. Sée, "Gold nanoparticles delivery in mammalian live cells: a critical review," *Nano Reviews,* vol. 1, p. 4889, 2010/01/01 2010.

[102] R. de Lima, A. B. Seabra, and N. Durán, "Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles," *Journal of Applied Toxicology,* vol. 32, pp. 867-879, 2012.

[103] E. Petryayeva, W. R. Algar, and I. L. Medintz, "Quantum Dots in Bioanalysis: A Review of Applications Across Various Platforms for Fluorescence Spectroscopy and Imaging," *Applied Spectroscopy,* vol. 67, pp. 215-252, 2013/03/01 2013.

[104] Y. Piao, A. Burns, J. Kim, U. Wiesner, and T. Hyeon, "Designed Fabrication of Silica-Based Nanostructured Particle Systems for Nanomedicine Applications," *Advanced Functional Materials,* vol. 18, pp. 3745-3758, 2008.

[105] J. Kim, J. E. Lee, S. H. Lee, J. H. Yu, J. H. Lee, T. G. Park, *et al.*, "Designed Fabrication of a Multifunctional Polymer Nanomedical Platform for Simultaneous Cancer- Targeted Imaging and Magnetically Guided Drug Delivery," *Advanced Materials,* vol. 20, pp. 478-483, 2008.

[106] Y. I. Park, J. H. Kim, K. T. Lee, K.-S. Jeon, H. B. Na, J. H. Yu, *et al.*, "Nonblinking and Nonbleaching Upconverting Nanoparticles as an Optical Imaging Nanoprobe and T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent," *Advanced Materials,* vol. 21, pp. 4467-4471, 2009.

[107] M. J. S. Toth, Yoshitaka J.; Mulder, Willem J.M.; Fayad, Zahi A.; Farokhzad, Omid C.; Kim, YongTae; Lee Chung, Bomy; Kamaly, Nazila; Becraft, Jacob R; Langer, Robert S, "Nanomedicines for endothelial disorders," *Nano Today,* vol. 10, pp. 759-776, 2016.

[108] C. He and W. Lin, "Hybrid Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy," in *Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer*, C. A. Mirkin, T. J. Meade, S. H. Petrosko, and A. H. Stegh, Eds., ed Cham: Springer International Publishing, 2015, pp. 173-192.

[109] S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, and A. V. Kabanov, "Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells," *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 54, pp. 135-147, 2002/01/17/ 2002.

[110] "Polymeric Nanoparticles," in *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*, ed.

[111] N. Nasongkla, E. Bey, J. Ren, H. Ai, C. Khemtong, J. S. Guthi, *et al.*, "Multifunctional Polymeric Micelles as Cancer-Targeted, MRI-Ultrasensitive Drug Delivery Systems," *Nano Letters,* vol. 6, pp. 2427-2430, 2006/11/01 2006.

[112] H. S. Yoo, E. A. Lee, and T. G. Park, "Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages," *Journal of Controlled Release,* vol. 82, pp. 17-27, 2002/07/18/ 2002.

[113] M. J. Kettel, F. Dierkes, K. Schaefer, M. Moeller, and A. Pich, "Aqueous nanogels modified with cyclodextrin," *Polymer,* vol. 52, pp. 1917-1924, 2011/04/19/ 2011.

[114] S. Shidhaye, V. Lotlikar, S. Malke, and V. Kadam, "Nanogel Engineered Polymeric Micelles for Drug Delivery," *Current Drug Therapy,* vol. 3, pp. 209-217, // 2008.

[115] N. Morimoto, T. Endo, M. Ohtomi, Y. Iwasaki, and K. Akiyoshi, "Hybrid Nanogels with Physical and Chemical Cross-Linking Structures as Nanocarriers," *Macromolecular Bioscience,* vol. 5, pp. 710-716, 2005.

[116] W. Shen, Y. Chang, H. Wang, G. Liu, A. Cao, and Z. An, "Thermosensitive, biocompatible and antifouling nanogels prepared via aqueous raft dispersion polymerization for targeted drug delivery," *Journal of Controlled Release,* vol. 152, pp. e75-e76, 2011/11/30/ 2011.

[117] G. Spataro, F. Malecaze, C.-O. Turrin, V. Soler, C. Duhayon, P.-P. Elena, *et al.*, "Designing dendrimers for ocular drug delivery," *European Journal of Medicinal Chemistry,* vol. 45, pp. 326-334, 2010/01/01/ 2010.

[118] S. Sadekar and H. Ghandehari, "Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: Implications for oral drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 64, pp. 571-588, 2012/05/01/ 2012.

[119] L. Zhang and A. Eisenberg, "Multiple Morphologies and Characteristics of "Crew-Cut" Micelle-like Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Diblock

Copolymers in Aqueous Solutions," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, pp. 3168-3181, 1996/01/01 1996.

[120] M. Beck-Broichsitter, O. M. Merkel, and T. Kissel, "Controlled pulmonary drug and gene delivery using polymeric nano-carriers," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, pp. 214-224, 2012/07/20/ 2012.

[121] M. Rawat, D. Singh, S. Saraf, and S. Saraf, "Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 29, pp. 1790-1798, 2006.

[122] S. K. Lai, Y.-Y. Wang, and J. Hanes, "Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, pp. 158-171, 2009/02/27/ 2009.

[123] S. Wohlfart, S. Gelperina, and J. Kreuter, "Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, pp. 264-273, 2012/07/20/ 2012.

[124] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Préat, "PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, pp. 505-522, 2012/07/20/ 2012.

[125] R. A. Jain, "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2475-2490, 2000/12/01/ 2000.

[126] J. Li and C. Sabliov, "PLA/PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier," in *Nanotechnology Reviews* vol. 2, ed, 2013, p. 241.

[127] K. Hu, Y. Shi, W. Jiang, J. Han, S. Huang, and X. Jiang, "Lactoferrin conjugated PEG-PLGA nanoparticles for brain delivery: Preparation, characterization and efficacy in Parkinson's disease," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 415, pp. 273-283, 2011/08/30/ 2011.

[128] Y.-C. Kuo and H.-W. Yu, "Transport of saquinavir across human brain-microvascular endothelial cells by poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with surface poly-(γ-glutamic acid)," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 416, pp. 365-375, 2011/09/15/ 2011.

[129] J. Guo, X. Gao, L. Su, H. Xia, G. Gu, Z. Pang, *et al.*, "Aptamer-functionalized PEG–PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 8010-8020, 2011/11/01/ 2011.

[130] Z. H. Wang, Z. Y. Wang, C. S. Sun, C. Y. Wang, T. Y. Jiang, and S. L. Wang, "Trimethylated chitosan-conjugated PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 908-915, 2010/02/01/ 2010.

[131] J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, "The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, pp. 136-151, 2011/03/18/ 2011.

[132] V. Torchilin, "Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 63, pp. 131-135, 2011.

[133] R. Li, K. Zheng, C. Yuan, Z. Chen, and M. Huang, "Be active or not: the relative contribution of active and passive tumor targeting of nanomaterials," *Nanotheranostics*, vol. 1, p. 346, 2017.

[134] J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz, and P. Couvreur, "Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery," *Chemical Society Reviews*, vol. 42, pp. 1147-1235, 2013.

[135] S. C. Alley, N. M. Okeley, and P. D. Senter, "Antibody–drug conjugates: targeted drug delivery for cancer," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 14, pp. 529-537, 2010/08/01/ 2010.

[136] X. Yang, X. Liu, Z. Liu, F. Pu, J. Ren, and X. Qu, "Near-Infrared Light-Triggered, Targeted Drug Delivery to Cancer Cells by Aptamer Gated Nanovehicles," *Advanced Materials*, vol. 24, pp. 2890-2895, 2012.

[137] H. Zhang, Y. Ma, and X.-L. Sun, "Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug/gene delivery," *Medicinal Research Reviews*, vol. 30, pp. 270-289, 2010.

[138] S. Chen, X. Zhao, J. Chen, J. Chen, L. Kuznetsova, S. S. Wong, *et al.*, "Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 21, pp. 979-987, 2010/05/19 2010.

[139] R. Singh and J. W. Lillard, "Nanoparticle-based targeted drug delivery," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 86, pp. 215-223, 2009/06/01/ 2009.

[140] L. Wecker, S. James, N. Copeland, and M. A. Pacheco, "Transdermal selegiline: targeted effects on monoamine oxidases in the brain," *Biological Psychiatry*, vol. 54, pp. 1099-1104, 2003/11/15/ 2003.

[141] V. Bhaskar, D. A. Law, E. Ibsen, D. Breinberg, K. M. Cass, R. B. DuBridge, *et al.*, "E-Selectin Up-Regulation Allows for Targeted Drug Delivery in Prostate Cancer," *Cancer Research*, vol. 63, pp. 6387-6394, 2003.

[142] E. Vivès, J. Schmidt, and A. Pèlegrin, "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1786, pp. 126-138, 2008/12/01/ 2008.

[143] Y. Sun, C. Kang, F. Liu, Y. Zhou, L. Luo, and H. Qiao, "RGD Peptide-Based Target Drug Delivery of Doxorubicin Nanomedicine," *Drug development research*, vol. 78, pp. 283-291, 2017.

[144] C. Chen, Z. Duan, Y. Yuan, R. Li, L. Pang, J. Liang, *et al.*, "Peptide-22 and cyclic RGD functionalized liposomes for glioma targeting drug delivery overcoming BBB and BBTB," *ACS applied materials & interfaces*, vol. 9, pp. 5864-5873, 2017.

[145] X. Chen, C. Plasencia, Y. Hou, and N. Neamati, "Synthesis and Biological Evaluation of Dimeric RGD Peptide−Paclitaxel Conjugate as a Model for Integrin-Targeted Drug Delivery," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 48, pp. 1098-1106, 2005/02/01 2005.

[146] M. Lindgren, M. Hällbrink, A. Prochiantz, and Ü. Langel, "Cell-penetrating peptides," *Trends in Pharmacological Sciences,* vol. 21, pp. 99-103, 2000/03/01/ 2000.

[147] L. R. H. Krumpe and T. Mori, "The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs," *International Journal of Peptide Research and Therapeutics,* vol. 12, pp. 79-91, March 01 2006.

[148] M. Demeule, A. Regina, C. Che, J. Poirier, T. Nguyen, R. Gabathuler, *et al.*, "Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* vol. 324, pp. 1064-1072, 2008.

[149] M. Demeule, J. C. Currie, Y. Bertrand, C. Ché, T. Nguyen, A. Régina, *et al.*, "Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector Angiopep-2," *Journal of neurochemistry,* vol. 106, pp. 1534-1544, 2008.

[150] C. Ché, G. Yang, C. Thiot, M.-C. Lacoste, J.-C. Currie, M. Demeule, *et al.*, "New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration," *Journal of medicinal chemistry,* vol. 53, pp. 2814-2824, 2010.

[151] A. Regina, M. Demeule, C. Che, I. Lavallee, J. Poirier, R. Gabathuler, *et al.*, "Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2," *British journal of pharmacology,* vol. 155, pp. 185-197, 2008.

[152] R. Kurzrock, N. Gabrail, C. Chandhasin, S. Moulder, C. Smith, A. Brenner, *et al.*, "Safety, pharmacokinetics, and activity of GRN1005, a novel conjugate of angiopep-2, a peptide facilitating brain penetration, and paclitaxel, in patients with advanced solid tumors," *Molecular cancer therapeutics,* vol. 11, pp. 308-316, 2012.

[153] J. Drappatz, A. Brenner, E. T. Wong, A. Eichler, D. Schiff, M. D. Groves, *et al.*, "Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma," *Clinical Cancer Research,* vol. 19, pp. 1567-1576, 2013.

[154] B. Oller-Salvia, M. Sánchez-Navarro, E. Giralt, and M. Teixido, "Blood–brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery," *Chemical Society Reviews,* vol. 45, pp. 4690-4707, 2016.

[155] J. Ren, S. Shen, D. Wang, Z. Xi, L. Guo, Z. Pang, *et al.*, "The targeted delivery of anticancer drugs to brain glioma by PEGylated oxidized multi-walled carbon nanotubes modified with angiopep-2," *Biomaterials,* vol. 33, pp. 3324-3333, 2012.

[156] H. Yan, L. Wang, J. Wang, X. Weng, H. Lei, X. Wang, *et al.*, "Two-order targeted brain tumor imaging by using an optical/paramagnetic nanoprobe across the blood brain barrier," *ACS nano,* vol. 6, pp. 410-420, 2011.

[157] Z.-Z. Yang, J.-Q. Li, Z.-Z. Wang, D.-W. Dong, and X.-R. Qi, "Tumor-targeting dual peptides-modified cationic liposomes for delivery of siRNA and docetaxel to gliomas," *Biomaterials,* vol. 35, pp. 5226-5239, 2014.

[158] R. Huang, H. Ma, Y. Guo, S. Liu, Y. Kuang, K. Shao, *et al.*, "Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease," *Pharmaceutical research,* vol. 30, pp. 2549-2559, 2013.

[159] X. Gao, J. Qian, S. Zheng, Y. Xiong, J. Man, B. Cao, *et al.*, "Up-regulating blood brain barrier permeability of nanoparticles via multivalent effect," *Pharmaceutical research,* vol. 30, pp. 2538-2548, 2013.

[160] H. Xin, X. Jiang, J. Gu, X. Sha, L. Chen, K. Law, *et al.*, "Angiopep-conjugated poly (ethylene glycol)-co-poly (ε-caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma," *Biomaterials,* vol. 32, pp. 4293-4305, 2011.

[161] A. Regina, M. Demeule, S. Tripathy, S. Lord-Dufour, J.-C. Currie, M. Iddir, *et al.*, "ANG4043, a novel brain-penetrant peptide–mAb conjugate, is efficacious against HER2-positive intracranial tumors in mice," *Molecular cancer therapeutics,* vol. 14, pp. 129-140, 2015.

[162] C. Omene, M. Kalac, J. Wu, E. Marchi, K. Frenkel, and O. A. O'Connor, "Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action," *Journal of cancer science & therapy,* vol. 5, pp. 334-342, 2013.

[163] J. Wu, C. Omene, J. Karkoszka, M. Bosland, J. Eckard, C. B. Klein, *et al.*, "Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer," *Cancer Letters,* vol. 308, pp. 43-53, 2011/09/01/ 2011.

[164] H.-F. Liao, Y.-Y. Chen, J.-J. Liu, M.-L. Hsu, H.-J. Shieh, H.-J. Liao, *et al.*, "Inhibitory Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Angiogenesis, Tumor Invasion, and Metastasis," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 51, pp. 7907-7912, 2003/12/01 2003.

[165] M. Nomura, A. Kaji, W.-y. Ma, K.-i. Miyamoto, and Z. Dong, "Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester," *Molecular Carcinogenesis,* vol. 31, pp. 83-89, 2001.

[166] S. H. E. Ketabforoosh, M. Amini, M. Vosooghi, A. Shafiee, E. Azizi, and F. Kobarfard, "Synthesis, evaluation of anticancer activity and QSAR study of heterocyclic esters of caffeic acid," *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR,* vol. 12, p. 705, 2013.

[167] Y.-J. Lee, P.-H. Liao, W.-K. Chen, and C.-C. Yang, "Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells," *Cancer letters,* vol. 153, pp. 51-56, 2000.

[168] B. Etzenhouser, C. Hansch, S. Kapur, and C. D. Selassie, "Mechanism of toxicity of esters of caffeic and dihydrocaffeic acids," *Bioorganic & medicinal chemistry,* vol. 9, pp. 199-209, 2001.

[169] N.-H. Nam, Y.-J. You, Y. Kim, D.-H. Hong, H.-M. Kim, and B. Z. Ahn, "Syntheses of certain 3-aryl-2-propenoates and evaluation of their cytotoxicity," *Bioorganic & medicinal chemistry letters,* vol. 11, pp. 1173-1176, 2001.

[170] R. B. Merrifield, "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide," *Journal of the American Chemical Society,* vol. 85, pp. 2149-2154, 1963/07/01 1963.

[171] A. Lew, P. O. Krutzik, M. E. Hart, and A. R. Chamberlin, "Increasing Rates of Reaction: Microwave-Assisted Organic Synthesis for Combinatorial Chemistry," *Journal of Combinatorial Chemistry,* vol. 4, pp. 95-105, 2002/03/01 2002.

[172] C. O. Kappe and D. Dallinger, "Controlled microwave heating in modern organic synthesis: highlights from the 2004–2008 literature," *Molecular Diversity,* vol. 13, p. 71, April 21 2009.

[173] W. C. W. P. D. Chan, *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*: OUP Oxford, 1999.

[174] I. M. Scott, E. Puniani, H. Jensen, J. F. Livesey, L. Poveda, P. Sánchez-Vindas, *et al.*, "Analysis of Piperaceae Germplasm by HPLC and LCMS: A Method for Isolating and Identifying Unsaturated Amides from Piper spp Extracts," *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* vol. 53, pp. 1907-1913, 2005/03/01 2005.

[175] A. Ptak, A. El Tahchy, F. Dupire, M. Boisbrun, M. Henry, Y. Chapleur, *et al.*, "LCMS and GCMS for the Screening of Alkaloids in Natural and in Vitro Extracts of Leucojum aestivum," *Journal of Natural Products,* vol. 72, pp. 142-147, 2009/01/23 2009.

[176] H. Moriwaki, S. Kitajima, and K. Katahira, "Waste on the roadside, 'poi-sute' waste: Its distribution and elution potential of pollutants into environment," *Waste Management,* vol. 29, pp. 1192-1197, 2009/03/01/ 2009.

[177] W. A. Korfmacher, "Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery," *Drug Discovery Today,* vol. 10, pp. 1357-1367, 2005/10/15/ 2005.

[178] G. L. Joep van den Broeke, Andreas Weingartner, "On-line and in-situ UV/vis spectroscopy for multi-parameter measurements: a brief review," *Spectroscopy Europe,* vol. 18, 2006.

[179] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophysical Reviews,* vol. 8, pp. 409-427, 2016/12/01 2016.

[180] H.-Y. N. Holman, M. C. Martin, and W. R. McKinney, "Tracking Chemical Changes in a Live Cell: Biomedical Applications of SR-FTIR Spectromicroscopy," *Spectroscopy,* vol. 17, 2003.

[181] A. Dubes, H. Parrot-Lopez, W. Abdelwahed, G. Degobert, H. Fessi, P. Shahgaldian, *et al.*, "Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* vol. 55, pp. 279-282, 2003/05/01/ 2003.

[182] S. Derman, "Caffeic acid phenethyl ester loaded PLGA nanoparticles: effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size," *J. Nanomaterials,* vol. 16, pp. 318-318, 2016.

[183] T. Arasoglu, S. Derman, and B. Mansuroglu, "Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and PLGA nanoparticle formulation by different methods," *Nanotechnology,* vol. 27, p. 025103, Jan 15 2016.

[184] T.-H. Tseng, C.-H. Shen, W.-S. Huang, C.-N. Chen, W.-H. Liang, T.-H. Lin, *et al.*, "Activation of neutral-sphingomyelinase, MAPKs, and p75 NTR-mediating caffeic acid phenethyl ester–induced apoptosis in C6 glioma cells," *Journal of Biomedical Science,* vol. 21, p. 61, July 05 2014.

[185] Y.-J. Lee, H.-C. Kuo, C.-Y. Chu, C.-J. Wang, W.-C. Lin, and T.-H. Tseng, "Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells," *Biochemical Pharmacology,* vol. 66, pp. 2281-2289, 2003/12/15/ 2003.

[186] H.-C. Kuo, W.-H. Kuo, Y.-J. Lee, W.-L. Lin, F.-P. Chou, and T.-H. Tseng, "Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo," *Cancer Letters,* vol. 234, pp. 199-208, 2006/03/28/ 2006.

[187] B. Dehouck, L. Fenart, M.-P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier, and R. Cecchelli, "A New Function for the LDL Receptor: Transcytosis of LDL across the Blood–Brain Barrier," *The Journal of Cell Biology,* vol. 138, pp. 877-889, 1997.

[188] P. R. Lockman, R. J. Mumper, M. A. Khan, and D. D. Allen, "Nanoparticle Technology for Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier," *Drug Development and Industrial Pharmacy,* vol. 28, pp. 1-13, 2002/01/01 2002.

[189] K. Gao and X. Jiang, "Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutics,* vol. 310, pp. 213-219, 2006/03/09/ 2006.

[190] S. Wang, C. Zhao, P. Liu, Z. Wang, J. Ding, and W. Zhou, "Facile construction of dual-targeting delivery system by using lipid capped polymer nanoparticles for anti-glioma therapy," *RSC advances,* vol. 8, pp. 444-453, 2018.

[191] X. Su, D. Zhang, H. Zhang, K. Zhao, and W. Hou, "Preparation and Characterization of Angiopep-2 Functionalized Ginsenoside-Rg3 Loaded Nanoparticles and the Effect on C6 Glioma Cells," *Pharmaceutical development and technology,* pp. 1-37, 2018.

[192] H. Hua, X. Zhang, H. Mu, Q. Meng, Y. Jiang, Y. Wang, *et al.*, "RVG29-modified docetaxel-loaded nanoparticles for brain-targeted glioma therapy," *International journal of pharmaceutics,* vol. 543, pp. 179-189, 2018.

[193] L. Chu, A. Wang, L. Ni, X. Yan, Y. Song, M. Zhao, *et al.*, "Nose-to-brain delivery of temozolomide-loaded PLGA nanoparticles functionalized with anti-EPHA3 for glioblastoma targeting," *Drug delivery,* vol. 25, pp. 1634-1641, 2018.

[194] H. Li, Y. Tong, L. Bai, L. Ye, L. Zhong, X. Duan, *et al.*, "Lactoferrin functionalized PEG-PLGA nanoparticles of shikonin for brain targeting therapy of glioma," *International journal of biological macromolecules,* vol. 107, pp. 204-211, 2018.

[195] G. Curigliano, D. Cardinale, T. Suter, G. Plataniotis, E. De Azambuja, M. T. Sandri, *et al.*, "Cardiovascular toxicity induced by chemotherapy, targeted agents and radiotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines," *Annals of oncology,* vol. 23, pp. vii155-vii166, 2012.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi: bozyagmur1@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. Y.Bozkurt, T. Acar, F.Ş. Poyraz, B. Mansuroğlu, S. Derman. *"Angiopep-2* Peptidiyle Hedeflendirilmiş CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonu", IV. Yaşam Bilimleri Kongresi, KAYSERİ, TÜRKİYE, 22-23 Şubat 2019.
2. Y.Bozkurt, F.Ş. Poyraz, T. Acar, B. Mansuroğlu, S. Derman. "CAPE Loaded PLGA Nanoparticles Conjugated with *Angiopep-2* Peptide for Targeting Glioma", 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, ANKARA, TÜRKİYE, 28 – 29 Haziran 2019.

Projeler

1. Kanser Tedavisine Yönelik Fonksiyonel Polimerik Nanopartiküller, YÜLAP Yüksek Lisans, FYL-2019-3556.

Ödüller

1. **"***Angiopep-2* Peptidiyle Hedeflendirilmiş CAPE Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonu" konulu poster çalışması birincilik ödülü, IV. Yaşam Bilimleri Kongresi, KAYSERİ, TÜRKİYE, 22-23 Şubat 2019.