



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



METAL-BAĞLAYAN AMİNO ASİTLERCE ZENGİN PEPTİDLER İLE FONKSİYONLANMIŞ NANOPARÇACIKLARIN HAZIRLANMASI VE TERANOSTİK UYGULAMALARI

Doktora Tezi

Hichem MOULAHOU

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**METAL-BAĞLAYAN AMİNO ASİTLERCE ZENGİN
PEPTİDLER İLE FONKSİYONLANMIŞ
NANOPARÇACIKLARIN HAZIRLANMASI VE
TERANOSTİK UYGULAMALARI**

Hichem MOULAHOU

Danışman : Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU
İkinci Danışman: Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya Doktora Programı

İzmir
2021

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum sunulan **“Metal-bağlayan amino asitlerce zengin peptidler ile fonksiyonlanmış nanoparçacıkların hazırlanması ve teranostik uygulamaları”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / / 2021

İmza

Hichem MOULAHOU



ÖZET**METAL-BAĞLAYAN AMİNO ASİTLERCE ZENGİN PEPTİDLER İLE FONKSİYONLANMIŞ NANOPARÇACIKLARIN HAZIRLANMASI VE TERANOSTİK UYGULAMALARI**

MOULAHOU, Hichem

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

İkinci Danışman: Prof. Dr. Suna TİMUR

December 2021, 130 Sayfa

Protein modifikasyonu ve değişikliği, diyabet, alzheimer ve kanser gibi çok faktörlü ve yaşa bağlı birçok hastalıkta önemli rol oynamaktadır. İleri glikasyon son ürünlerinin (AGE) ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşumu gibi değişiklikler protein agregasyon ve amiloid fibril oluşumuna katkıda bulunmaları nedeni ile organizmaya zarar verebilirler. Bu nedenle bu protein modifikasyonlarını önleyebilecek ve verimli bir şekilde düzeltebilecek tedavi seçeneklerinin bulunması büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, bir tedavinin hedefine ulaşması için, vücutta, dokularda ve hücrelerde bulunan çeşitli kimyasal ve fiziksel mekanizmalar ve bariyerlerle karşı karşıya kalması söz konusudur. Örneğin, kan-beyin bariyeri gibi. Bu nedenle, istenmeyen etkileşimler ve degradasyonun aşılması için yeni nano mühendislik formülasyonları üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu bağlamda, bu çalışmada olası bariyerlerin aşılması, protein modifikasyonlarının önlenmesi ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi amacı ile nano-taşıyıcılar ve spesifik peptidler kullanarak teranostik bir yaklaşımın geliştirilmesi hedeflendi.

Bu amaçla farklı çalışmalar yapılmış olup ilk olarak, karnosin gibi bazı peptitlerin, iki değerlikli bir metal olan çinko varlığında hazırlanan niozomların etkinliği araştırıldı. Sonrasında ise, her yapının içeriğinin performansı üzerindeki avantajlarını görmek için niozomlar ve polimerzomlar dâhil olmak üzere farklı enkapsülasyon türleri üzerinde karşılaştırmalı bir çalışma yapıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kematerapötik bir kanser ilacı olan doksorubisini kapsayan bir teranostik (terapötik ve tanı) polimerzom tasarımı gerçekleştirildi. Bu bağlamda

polimerzom yüzeyine nanotaşıyıcının penetrasyon kapasitesini arttırmak için Histatin 5 peptidi bağlanarak uygulanan ilaç miktarının düşürülmesi sağlandı.

Elde edilen veriler, ilaca direnç mekanizmalarının potansiyel olarak tersine çevrilmesiyle ilacın kanser hücreleri üzerinde etkisinin önemli bir şekilde arttığını gösterdi. Diğer yandan hazırlanan polimerzomların floresansının izlenmesi ile gerek nano-taşıyıcı tabanlı tedavinin etkinliğinin ve seyrinin takip edilmesi gerekse tedavinin ayarlanmasına da olanak sağlayabileceği gözlemlendi.

Sonuç olarak bu tez kapsamında çok ilginç olumlu sonuçlar gösteren orijinal bir teranostik yapı tanımlandı. Ancak ileride yapılacak hem *in vitro* hem de *in vivo* sinyal yolları da dâhil olmak üzere mekanistik çalışmaların yapılması gerekliliği açıktır.

Keywords: Nanotaşıyıcılar, peptidler, yaşlanma ile ilgili hastalıklar, kanser, teranostikler.

ABSTRACT
**METAL-BINDING AMINO ACID-RICH PEPTIDES IN BIO-
FUNCTIONALIZED NANO-CARRIERS CONCEPTION AND
THERANOSTICS**

MOULAHOU, Hichem

PhD in Biochemistry

Supervisor: Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU

Co-Supervisor: Prof. Dr. Suna TİMUR

December 2021, 130 pages

Protein modification and alteration are important factors in many age-related diseases such as diabetes, Alzheimer's disease, and cancer. Modifications like the formation of advanced glycation end-products (AGE) and advanced oxidation protein products (AOPP) can cause harm to the organism and may contribute to protein aggregation and amyloid fibrils formation. Other protein can also aggregate under certain conditions such as cancer. Consequently, finding treatment options that can efficiently correct and prevent these protein modifications is of substantial importance. However, for a treatment to reach its target, it faces various chemical and physical mechanisms and barriers present in the body, tissues, and cells. For example, some organs like the brain are difficult to reach due to the blood-brain barrier. As such, new Nano engineered formulations were sought to bypass unwanted interactions and degradation. Thus, the current thesis aimed for the development of a theranostic approach using nanocarriers and specific peptides to overcome the barriers and act on the prevention and treatment of protein modifications.

This work first explored the efficiency of some peptides such as carnosine in the presence of a divalent metal zinc and when encapsulated inside niozomes. The aim was to understand if the combination could enhance the activity of the peptide for the upcoming steps. After that, a comparative study on different types of encapsulations was performed including niozomes and polymersomes to see the advantages of each structure on the performance of the content. The last steps made use of the previous results to design a theranostic polymersome encapsulating the anti-cancer drug doxorubicin (acts both as a therapeutic agent and has fluorescence for diagnostic). The polymersome surface was decorated using a cell-penetrating peptide called Histatin 5 to enhance the penetration capacity of the nanocarrier while lowering the drug amount administered.

The obtained data showed an important enhancement of the drug over cancer cells with a potential reversal of drug-resistance mechanisms. The fluorescence observation allows the continuous tracking of the administered nanocarrier-based treatment which has a great potential in clinical applications by following the treatment course, effect, and adjusting the therapy directly.

While the current thesis has described an original theranostic structure that has yet to be seen in the literature and showing very interesting positive results, it is necessary to further analyze the mechanistic effects including signaling pathways both *in vitro* and especially *in vivo*.

Keywords: Nanocarriers, peptides, aging-related diseases, cancer, theranostics.

ÖNSÖZ

Yaşlanma süreci, diyabet ve kanser gibi çeşitli hastalık ve bozuklukların ortaya çıkmasında ve gelişmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Beyin gibi bazı organ ve dokular yoğun bir şekilde korunuyor olması tedavi ve ilaç dağılım proseslerinin performansını etkiler. Diğer yandan her tedavi tüm hastalarda aynı etkiyi göstermez. Bu bağlamda tanı, tedavi ve tedavi takibinin aynı anda yapılabilirdiği teranostik yaklaşımlar ile tedavi süreçleri standart yaklaşımlara kıyasla daha etkilidir.

Son yıllarda nanoteknoloji, kanser, enfeksiyonlar, metabolik ve genetik bozukluklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için güçlü ilaç dağıtım platformlarının hazırlanmasına izin veren gelişmeler kaydedildi. Özellikle nanotaşıyıcılar, klinisyenlerin yüksek miktarda ilacı enkapsülasyon ve farmakokinetiği kontrol etme ve kapsüllenmiş ilacın salınımını kontrol etme kapasitesi nedeniyle tedavileri modüle etmesine olanak sağlamıştır. Bu avantaj, düşük biyolojik dağılım ve biyoyararlanım gibi geleneksel terapilerde görülen birçok sınırlamanın yanı sıra uygulanan günlük dozların düşürülmesini sağlamıştır. Sonuç olarak, spesifik hedefleme ve gelişmiş biyoyararlanım sayesinde, nanotaşıyıcılar patolojik olmayan ve sağlıklı dokular üzerinde istenmeyen yan etkileri en aza indirir.

Bu tezin temel amacı, farklı uygulamalarda kullanılabilecek orijinal bir teranostik yaklaşım önererek nano-taşıyıcıların gelişimine katkıda bulunmaktır.

İZMİR

.../.../2021

Hichem MOULAHOU

İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	(ii)
KABUL ONAY SAYFASI	(iii)
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	(v)
ÖZET	(vii)
ABSTRACT	(ix)
ÖNSÖZ	(xi)
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	(xiii)
ŞEKİLLER DİZİNİ	(xix)
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	(xxiii)
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	(xxiv)
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Yaşa Bağlı Patolojilerde Protein Farklanmaları	1
1.2 Terapi ve İlaç Dağılımındaki Bariyerler	3
1.2.1 Gastrointestinal bariyer.....	4

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.2.2 Kan-beyin bariyeri	4
1.2.3 Mikroçevresel, hücrel ve hücre içi bariyerler	5
1.3 İlaç Salınım Sistemleri	7
1.3.1 Lipid bazlı veziküller (miseller, lipozomlar ve niozomlar)	8
1.3.2 Polimerzomlar	9
1.3.3 İnorganik nanopartiküller	9
1.4 İlaç Taşınımı/Dağıtımının İyileştirilmesi	10
1.4.1 Hedeflenmiş ilaç taşınımı	11
1.4.2 Birden çok ilacın birlikte taşınımı	12
1.5 Teranostikler	14
1.6 Tedavide Peptidler	15
1.6.1 Hücreye girebilen peptidler ("Cell-penetrating" CPP's)	15
1.6.2 Metal iyon bağlayıcı peptidler	17
1.7 Nanotaşıyıcılar ile İlaç Taşınımındaki Sınırlamalar	20
1.8 Protein Glikoksidasyonu ve Hastalık İlişkisi	20

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.9 Deglikasyon ve AGE İnhibitörleri.....	23
1.10 Tez Çalışmasının Amacı.....	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
2.1 1. Bölüm: Metal İyonu Peptid Etkileşiminin Proteinlerin Glikoksidasyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	25
2.1.1 <i>In-vitro</i> protein glikasyon/deglikasyon modeli.....	25
2.1.2 AGE ve ditirozin tayini.....	27
2.1.3 Çapraz β yapı ve yüksek molekül kütleli agregatların belirlenmesi.....	27
2.1.4 Protein oksidasyonu ve İleri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP)Belirlenmesi	27
2.1.5 İstatiksel Analiz	28
2.2 2. Bölüm: Karnosin Enkapsüle Edilmiş Niozomların Sığır Serum Albumin Modifikasyonları Üzerine Etkisi.....	29
2.2.1 Niozomların hazırlanması.....	29
2.2.2 Niozomların karakterizasyonu.....	29
2.2.3 Niozomlardan karnosin salınımının incelenmesi.....	30
2.2.4 Niozomların fiziksel kararlılığının belirlenmesi.....	30

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.5 <i>In vitro</i> Glikoksidasyon ve Agregasyonun Belirlenmesi	30
2.2.6 Karnosin-BSA etkileşiminin <i>In silico</i> değerlendirilmesi	30
2.2.7 İstatiksel Analiz.....	31
2.3 3. Bölüm: Glutasyon (GSH) Yüklü Niozomlar ve Kaprolakton/Laktid Polimerzomları ile Protein Glikoksidasyonunun Önlenmesi.....	32
2.3.1 GSH yüklü Niozomların hazırlanması (GSH-NIO).....	32
2.3.2 GSH yüklü polimerzomların hazırlanması (GSH-LAC ve-CAPRO).....	32
2.3.3 Karakterizasyon ve Enkapsülasyon Etkinliği	34
2.3.4 GSH Salınım profilinin incelenmesi	35
2.3.5 Niozomların ve polimerzomların fiziksel kararlılıkları	35
2.3.6 Kritik Misel Konsantrasyonunun (CMC) belirlenmesi.....	35
2.3.7 <i>In vitro</i> hücre toksisitesi (MTT Testi).....	36
2.3.8 <i>In vitro</i> Glikoksidasyon ve Agregasyonun Belirlenmesi	36
2.3.9 İstatiksel Analiz.....	37
2.4 4. Bölüm: Teranostik polimerzom; Hedeflenmiş-Akıllı İlaç taşınımı için Histatin 5 ve Doksorubisin İçeren Metoksi PEG-b-poli Kaprolakton Polimerinin Hazırlanması... ..	38

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.1 Teranostik polimerzom hazırlanması	38
2.4.2 Teranostik polimerzomun karakterizasyonu.....	40
2.4.3 Enkapsülasyon Etkinliğinin belirlenmesi	40
2.4.4 pH-Duyarlılığı ve salınım profilinin incelenmesi.....	41
2.4.5 Hücre kültürü <i>In vitro</i> hücre toksisitesi (MTT Testi)	41
2.4.6 İstatiksel Analiz	41
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	42
3.1 1. Bölüm: Metal İyonu Peptid Etkileşiminin Proteinlerin Glikoksidasyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	42
3.2 2. Bölüm: Karnosin enkapsüle edilmiş niozomların sığır serum albumin modifikasyonları üzerine etkisi	51
3.3 3. Bölüm: Glutasyon(GSH) Yüklü Niozomlar ve Kaprolakton/Laktid Polimerzomları ile Protein Glikoksidasyonunun Önlenmesi	60
3.4 4. Bölüm: Teranostik polimerzom; Hedeflenmiş-Akıllı İlaç taşınımı için Histatin 5 ve doksorubisin içeren metoksi PEG-b-poli kaprolakton polimerinin hazırlanması.....	72
4. GENEL DEĞERLENDİRME	80

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
KAYNAKLAR DİZİNİ	81
TEŞEKKÜR.....	120
ÖZGEÇMİŞ	121



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Hücre zarı bariyerini geçmek için moleküller tarafından üstlenilen alım yolları: endositoz ve pinositoz	6
1.2 Farklı malzemelerden hazırlanan nanotaşıyıcı tabanlı ilaç taşıma sistemleri.....	7
1.3 Yaygın olarak kullanılan ilaç taşıma/dağıtım sistemleri ve özellikleri	8
1.4 Tümörlerde EPR etkisinin gösterimi	10
1.5 İki molekülün (ilaç ve kemosenstizer) birlikte kapsüllenmesinin MDR kanser hücrelerine karşı nasıl etki edebileceğinin gösterimi	13
1.6 (A)Farklı HST5 yapısal konformasyonlarının NMR karakterizasyonu, (B) HST1 ve 5'in amino asit dizisinin, farklı biyoaktif ve metal bağlama alanları	19
2.1 Karnosinin <i>in vitro</i> olarak deglikasyon ve protein oksidasyonuna etkileri üzerine çinko eklenmesinin incelenmesi için protokol tasarımı.....	26
2.2 Farklı nanotaşıyıcılar (nizomlar, polikaprolakton polimerler, polilaktid polimerler) için sentez reaksiyonu.....	33
2.3 Kaprolakton bazlı (solda) ve laktit bazlı (sağda) polimerzomların HNMR analizi.....	34
2.4 pH duyarlı histatin 5 (Hst5) ile fonksiyonlanmış DOX ile yüklü teranostik polimerin sentezinin gösterimi (A) iki bloklu kopolimer sentez adımları (B) enkapsülasyon ve fonksiyonlama	38
3.1 Protein glikoksidasyon modellerinin incelenmesinde zaman etkisi (A) AGE oluşumu, (B) AOPP oluşumu	43

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 3.2 Karnosin ve çinko ile muamele edilmiş bir BSA protein modifikasyon modelinde AGE'lerin (A) ve AOPP'lerin (B) belirlenmesi ile protein modifikasyonunun değerlendirilmesi. $**p<0.01$ ve $***p<0.001$ - C-, $##p<0.01$ ve $###p<0.001$ - C+, $\$p<0.05$, $\$\$p<0.01$ ve $\$$$p<0.001$ karnosine karşı 5 mM..... 45-46
- 3.3 Çinko / karnosin ile muamele edilmiş BSA protein modifikasyon modelinde (A) ThT analizi, (B) ditirozin oluşumu. $*p<0.05$ ve $***p<0.001$ - C-, $###p<0.001$ - C+, $\$p<0.05$ ve $\$\$p<0.01$ - karnosin 5 mM..... 48-49
- 3.4 Serbest karnosin ve CarNIO'nun ilaç salım profili. 51
- 3.5 Karnosin ve karnosin/niozomlarının (CarNIO) antiglikatif etkisi. (A), $\lambda_{ex}=370/\lambda_{em}=440$ nm'de floresan yoğunluğu, (B) gözlemlenen inhibisyon, $*p<0.05$, $**p<0.01$ ve $***p<0.001$ ve C- grubu. $\#p<0.05$, $##p<0.01$ ve $###p<0.001$ ve C+ grubu karşılaştırması. $\$p<0.05$, $\$\$p<0.01$ ve $\$$$p<0.001$ ve AG 5mM grubu. 52
- 3.6 Karnosin ve karnosin enkapsülenmiş niozomların (CarNIO) anti-fibril oluşum etkisinin belirlenmesi (A), $\lambda_{ex}=435/\lambda_{em}=485$ nm'de floresan yoğunluğu(B) gözlemlenen inhibisyon yüzdesi. $*p<0.05$, $**p<0.01$ ve $***p<0.001$ ve C- grubu. $##p<0.01$ ve $###p<0.001$ ve C+ grubu. $\$p<0.05$ ve $\$\$p<0.01$ ve AG 5mM grubu. 53
- 3.7 BSA'nın ThT floresan kinetiği. (A) Karnosin, (B) CarNIO 54
- 3.8 Karnosin ve enkapsüle karnosin niozomlarının (CarNIO) protein oksidasyonunu önleyici etkisi. (A) AOPP seviyeleri (B) gözlemlenen inhibisyon yüzdesi. $*p<0.05$, $**p<0.01$ ve $***p<0.001$ ve C- grubu. $\#p<0.05$, $##p<0.01$ ve $###p<0.001$ ve C+ grubu karşılaştırması. $\$p<0.05$, $\$\$p<0.01$ ve $\$$$p<0.001$ ve AG 5mM grubu. 56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
3.9 (A) BSA ile karnosin ve aminoguanidin etkileşiminin in silico incelenmesi. (B) Genişletilmiş bölge.....	57
3.10 GSH yüklü nano taşıyıcıların karakterizasyonu. (A) DLS'den elde edilen boyut dağılımı sonuçları. (B) Farklı nanotaşıyıcıların pH7.2 ve pH5.5 salım profili	60
3.11 Sentezlenen farklı nanotaşıyıcıların taramalı elektronik mikroskopi (SEM) görüntüleri. Sol taraf boş formülasyonları gösterirken sağ taraf GSH yüklü nanoformülasyonları göstermektedir	63
3.12 CMC tayini için nanotaşıyıcıların eksitasyon spektrumları	64
3.13 Kaprolakton ve laktit bazlı polimerzomların kritik misel konsantrasyonu (CMC).....	64
3.14 İki farklı hücre hattında (HeLa ve U87 hücre hatları) farklı nanotaşıyıcılar için hücre sitotoksosite testi (MTT testi). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ Kontrol grubuna karşı	66
3.15 in vitro BSA modelinde protein modifikasyon parametreleri. (A) Serbest GSH'nin ve GSH ile yüklü farklı nanotaşıyıcıların (GSH-NIO, GSH-CAPRO ve GSH-LAC) anti-glikasyon etkisi. (B) anti-fibril oluşumu etkisinin (anti-agregasyon) ThT ölçümü. (C) Protein oksidasyonu önleyici etkisi (AOPP). Üst grafikler floresan/optik yoğunlukları temsil ederken alt grafikler inhibisyon yüzdesini göstermektedir. ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ ve C+ grubu. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ ile AG 5mM grubu karşılaştırması. \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ ve \$\$\$ $p < 0.001$ ile serbest GSH 2.5mM grubu karşılaştırması. £ $p < 0,05$, ££ $p < 0,01$ ve £££ $p < 0,001$ ile ücretsiz GSH 5mM grubu karşılaştırması. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ ve +++ $p < 0.001$ ve serbest GSH 10mM grubu	67

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 3.16 Sentezlenen polimerzom çift blokunun FTIR sonuçları ve aktivasyonu 72
- 3.17 Polimerzom bileşenlerinin ¹H-NMR analizi 73
- 3.18 Polimerzomların SEM görüntüleri (100000X büyütme). (A) polimerzom (B) Polimerzom/Hst5, (C) Polimerzom/DOX, (D) Polimerzom/DOX/Hst5 74
- 3.19 Farklı pH larda kümülatif ilaç salınımı. (A) Fizyolojik koşullar (pH 7.4) ve asidik koşullar (pH 5.5) altında 24 saat boyunca zamana bağlı ilaç salınımı. (B) 24 saatte ilaç salımının karşılaştırmalı analizi. (C) Tümör çevresi etrafındaki fizyolojik ve asidikgradienti taklit eden koşullar altında ilaç salımı gözlemi (4 saat inkübasyon). (D) Farklı pH koşulları altında Hst5'in davranışının şematik açıklaması Gruplar arası istatistiksel anlamlılık **p<0.01 ve ***p<0.001'dir. #p<0.05, pH 5.5'te elde edilen değerlere kıyasla 75
- 3.20 Hst5 ile fonksiyonlanmış DOX yüklü polimerzomların antikanser etkisinin analizi. (A) Boş polimerzomun sitotoksitesi. (B) Hst5 işlevselleştirmesinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. (C) 5.0-25 µg/mL dozlarda serbest DOX, polimerzom/DOX ve polimerzom/DOX/Hst5'in antikanser etkisi (D) 50 ve 500 µg/mL arasındaki üç formülasyonun analizi. *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001 ile kontrol (0). *#<0.05, ##p<0.01 ve ###p<0.001 ile serbest DOX karşılaştırması 76
- 3.21 İlaç penetrasyonunun ve ilaç taşınımının belirlenmesi. (A) Floresan mikroskobu altında gözlenen hücreler (B) Gözlenen floresan ölçümü. **p<0.01 ve ücretsiz DOX..... 77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

1.1 Kemoterapötikler ve kemosenstizörler içeren kombinatoryal nanopartikül formülasyonlara örnekler	14
1.2 Türetilmiş ve tasarlanmış CPP'lere örnekler	16
1.3 Tükürükte bulunan bazı biyoaktif peptidlere örnekler	18-19
3.1 Autodock Vina programı kullanılarak moleküler yerleştirmeden sonra karnosin ve aminoguanidin'in (AG) BSA bağlanma afintesi	57
3.2 Farklı nanoyapıların karakterizasyonu (boyut, zeta potansiyeli ve PDI) ve enkapsülasyonverimii (%EE)	61
3.3 GSH ve GSH Yüklü nano taşıyıcıların BSA glikoksidasyonu üzerindeki etkileri	68
3.4 Doksorubisin enkapsülasyonkapsülleme etkinliği (EE%), mPEG-b-PCL polimerzomunun karakterizasyonu.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AGEs	İleri Glikasyon Son Ürünleri
AOPPs	İleri Oksidasyon Protein Ürünleri
AD	Alzheimer hastalığı
AG	Aminoguanidin
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
ANOVA	Varyans analizi
AMPs	Antimikrobiyal peptitler
BBB	Kan-beyin bariyeri
BSA	Sığır serum albümini
CL	Kaprolakton
CPPs	Hücreye nüfuz eden peptitler
CT	Kloramin T
CT	Bilgisayarlı tomografi
DMSO	Dimetil sülfoksit
ZnO	Çinko Oksit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DMF	Dimetilformamid
DLS	Dinamik ışık saçılması
EPR	Geliştirilmiş geçirgenlik ve tutma
EE	Tuzak verimliliği
ECM	Hücre dışı matriks
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
GI	Gastrointestinal sistem
Glc	Glukoz
Hst5	Histatin 5
HSTs	Histatinler
hIAPP	İnsan adacık amiloid polipeptidi
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
mPEG	(Etilen glikol) poli-Metoksi
MW	Molekül kütlesi
T2D	Tip 2 diyabet

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MDR	Çoklu ilaç direnci
NPs	Nanopartiküller
NIR	Yakın Kızılötesi
PTX	Paklitaksel
P-gp	P-glikoprotein
PPT	Podofilotoksin
PDMS	poli- (Dimetilsiloksan)
PEG	Poli- (etilen glikol)
PLGA	Poli- (laktik-co-glikolik asit)
KI	Potasyum iyodür
PDB	Protein veri bankası
ROS	Reaktif oksijen türleri
RAGE	İleri glikasyon son ürünleri reseptörü
RES	Retiküloendotelyal sistem
RT	Oda sıcaklığı
SOD-1	Süperoksit dismutaz 1
ThT	Tiyoflavin T
TCA	Trikloroasetik asit

1.GİRİŞ

1.1 Yaşa Bağlı Patolojilerde Protein Farklanmaları

Yaşlanma süreci, yaşam boyunca hem fizyolojik hem de biyokimyasal fonksiyonlarda bir düşüş olarak bilinir. (Harman 1981). Hücrede istenmeyen bazı yan ürünlerin birikmesinin yaşlanmanın nedenlerinden biri olabileceği düşünülmektedir (Gladyshev 2012; Gladyshev 2013). Glikoksidasyon, Amadori ürünlerinin oluşumu yoluyla proteinleri, lipidleri ve DNA'yı etkileyen doğal olarak gelişen bir olgudur. Amadori ürünleri, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) oluşumuyla sonuçlanan bir dizi modifikasyona uğrar (Maillard 1912). Glikasyon, daha yüksek şeker seviyeleri ve gelişmiş oksidasyon protein ürünleri (AOPP'ler) üreten oksidatif stres varlığında daha da artar. (Ahmed and Thornalley 2003).

Glikasyon, protein fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Ayrıca, oksidatif stres mekanizmalarının, AOPP'lerin üretiminde, AGE'lerin oluşumu / birikiminde ekili olduğu ve tip 2 diyabet (T2D) ve Alzheimer hastalığı gibi çok faktörlü yaşlanma ile ilgili bazı hastalıkların gelişiminde önemli olduğu gösterilmiştir. (Baynes 1991; Brownlee 1995; Suji and Sivakami 2004; Yan et al. 1995). İnsan vücudu bu “glikotoksinleri” ortadan kaldıracak bir enzimatik sistemden yoksun olduğundan, yaşlanma sürecinin hücrelerde metabolik atıkların birikmesiyle ilgili olduğu teorisini desteklemektedir. Oksidatif stresten kaynaklanan protein hasarı, yaşlanmayla ilgili protein modifikasyonlarında kilit bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres, çeşitli biyolojik moleküller ve fizyopatoloji ile ilişkili olabilecek hücresel mekanizmalarla ilişkilidir. Esas olarak, glukozun otooksidasyonundan reaktif oksijen türlerinin (ROS) orantısız üretimi, glukozun kovalent ve enzimatik olmayan kombinasyonu ile kan dolaşımında bulunan ve AGE oluşumuna dönüşen diğer proteinler tarafından yönlendirilir (Giacco and Brownlee 2010).

Protein agregatlarının birikmesi, yapısal olarak düzensiz veya yanlış katlanmış çeşitli proteinlerde bulunan bir özelliktir ve bunların görünümü genellikle yaşa bağlı hastalık başlangıcı (diyabet, Alzheimer, Huntington, amiyotrofik lateral

skleroz (ALS) vb.) ile ilişkilidir. Örneğin, bu hastalıklarda bulunan bazı protein kümeleri, α -sinüklein ve amiloid-beta peptitlerini içerir. Amiloid olmayan protein yanlış katlanması ve kümelenmesine, ALS'de süperoksit dismutaz 1 (SOD-1) kümelenmesi, karaciğer hastalıklarında α 1-antitripsin kümeleri gibi çeşitli protein ve enzim türlerini etkileyebilir. Çeşitli hayvan modellerinde protein agregasyonunun yaşlanma ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Kanser proteomik bir patoloji olarak da sınıflandırılabilir. Kanser araştırmalarında önemli bir alan, proteostasisin ve kanser hücrelerinin zararlı hücresel mikro-ortamlarından kaynaklanan streslerin üstesinden gelmek için moleküler şaperon mekanizmalarını nasıl kullandıklarının incelenmesidir. Kanser gelişiminin korunmasında çok önemli bir oyuncu, hücre döngüsü durması ve apoptozu indüklemekteki önemli rolü nedeniyle insan kanserlerinin %50'sinden fazlasında mutasyona uğramış olan p53 tümör baskılayıcı proteindir. Kanser hücreleri, mutant p53 ekspresyonunu sürdürmek için hücresel proteostaz mekanizmasının parçalarını kullanır.(de Oliveira et al. 2015; Naus 2019). Glioblastomanın (U87 hücre hatları), daha önce tanımlanan ve aynı mekanizmada reaksiyona giren amiloid kümeleri gibi protein kümelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Kucheryavykh et al. 2019; Pedrote et al. 2020). Rahim ağzı kanseri hücreleri (HeLa hücre hattı), protein agregatlarının etkilerini göstermek için birçok çalışmada kullanılmıştır (Forget et al. 2013; Pereira et al. 2018).

Yaşa bağlı hastalıkların önlenmesi için çok fonksiyonlu özelliklerde doğal ve sentetik terapötiklerin geliştirilmesine artan bir ilgi vardır. AGE'lere ve diğer protein bazlı değişikliklere karşı etkili inhibitörlere duyulan ihtiyaç nedeni ile özellikle nanopartiküllerin kullanımındaki önemli gelişmeler nedeniyle daha gerekli hale gelmektedir. (Jha and Ali 2019). Ancak uygun ve etkili tedavi yaklaşımları önermek, uygulanan moleküllerin geçtiği hedeflerin ve yolların anlaşılması, özellikle canlı sistemlerde karşılaşılan çeşitli engeller açısından büyük önem taşımaktadır.

1.2 Terapi ve İlaç Dağılımındaki Bariyerler

Tedavide kullanılan ilaçlar formülasyonlarının biyolojik dağılımları ve biyoyararlanımları, protein adsorpsiyonu ve hızlı klirens gibi çeşitli biyolojik ve fiziksel bariyerlerden etkilenir. Bunun sonucunda, hedeflenen bölgeye ulaşan ilaç miktarı sınırlanabilir. Biyolojik engeller patolojik koşullar altında daha da değişir ve bu da geleneksel genelleştirilmiş yaklaşımların uygulanmasını daha da zorlaştırır (Nag and Delehanty 2019). Ek olarak, biyolojik engellerdeki farklılıklar sadece patolojiler arasında değil, kişiden kişiye de farklılık gösterir. Değişiklikler sistemik, mikro-çevresel ve hücresele seviyelerde görülebilir, bu nedenle en uygun tedavileri üretmek ve tasarlamak için biyolojik engelleri anlamının önemi büyüktür. Tedavi sırasında karşılaşılan biyolojik engeller, kullanılan uygulama yolunun yanı sıra patoloji tipine ve ilerlemesine de bağlıdır (Blanco et al. 2015). Lokal tedavi uygulaması, sistematik tedavide görülen birçok engelden uzak olduğundan, tedavi için en uygun yaklaşımdır. Bununla birlikte, genellikle invaziv stratejilerdir ve dezavantajlarını daha da artıran diğer karmaşık tekniklere ihtiyaç duyarlar. Ek olarak, lokal tedaviler yalnızca hedef pozisyon biliniyorsa ve katı tümörler gibi erişimi kolaysa uygulanabilir. Bu nedenlerle sistematik terapiler halen terapide en çok kullanılan yaklaşımlardır (Mitchell et al. 2021).

Moleküller kan dolaşımına ulaştığında, atılım, kan akışı ve fagositik hücreler gibi terapötik etkiyi büyük ölçüde etkileyebilecek çeşitli faktörlerle karşı karşıya kalabilirler. Bu faktörler, ilaç moleküllerinin fizikokimyasal özellikleri ve organlarda, hücrelerde vb. spesifik olarak bulunan özelliklerle yakından ilişkilidir. Terapötik moleküllerin karşılaştığı ve biyolojik dağılımını etkileyen bazı fiziksel engeller, vücuttaki kan-beyin bariyerinde bulunan sıkı bağlantıları içerir. (intravenöz uygulama durumunda veya oral uygulama durumunda gastrointestinal (GI) yolun endotelial ve epitelyal hücreleri).

1.2.1 Gastrointestinal bariyer

Terapötiğin oral yoldan verilmesinin en yaygın kullanılan ilaç verme şekli olduğu göz önüne alındığında, GI yolu, optimal tedavileri engelleyebilecek çeşitli bariyerlere sahiptir (Ensign et al. 2012). Genel olarak moleküller, bağırsaklara ulaşmak için bazı P-glikoproteinler ve konsantrasyon gradientleri ile kontrol edilen pasif difüzyon yoluyla endotelden geçer. GI yolunu geçmek için endo ve ekzositoz hareketine dayanan moleküller için molekülün boyutu önemli bir faktördür. Optimal geçiş için 20-500 nm arasında değişen büyüklükte moleküller önerilmektedir. Bununla birlikte, bağırsak epiteline geçişte ekzositoz gerekli değildir. Sadece küçük bir kısmı ekzositoz yapabilir (Zhuang et al. 2018). GI yolunu geçmek için başka bir seçenek de aktif hedeflemeyi yararlanmaktır. Transferrin yolu, özellikle kolon kanseri veya kolit tedavilerinde düşünülmesi gereken ilginç bir yoldur. Bu hastalıklarda, mukozada bir transferrin reseptörünün aşırı ekspresyonu vardır (Yong et al. 2019). GI yolu, endotel yüzeyini kaplayan bir mukus tabakası içerir. Bu katman, moleküllerin bağırsak duvarı ile etkileşimini büyük ölçüde sınırlayabilir (Durán-Lobato et al. 2020; Ensign et al. 2012). Bu bariyerler pH seviyeleri, mikrobiyom ve mukus miktarını değiştiren diyet içeriği ve patolojilerin varlığı nedeniyle oldukça heterojendir (Durán-Lobato et al. 2020; Ensign et al. 2012). Sonuç olarak GI yolunun, oral uygulama temelli tedavi için oldukça zorlu bir bariyer olduğu anlaşılmaktadır.

1.2.2 Kan –beyin bariyeri

Kan-beyin bariyeri (KBB), diğer hücreler (astrositler ve perisitler) tarafından desteklenen ve çeşitli özelliklere sahip bariyerler oluşturarak beyni koruyan bir endotelyal hücre tabakasıdır. (Pardridge 1999). Fiziksel bir bariyer olmanın yanı sıra moleküllerin giriş ve çıkışını kolaylaştırmak için çeşitli protein taşıyıcıları ve transsitoz mekanizmalarını kullanan çok seçici bir taşıma bariyeridir. Ayrıca bazı metabolizma enzimlerinin (sitokrom P450, peptidazlar ve monoamin oksidazlar) ekspresyonuna dayanan bir metabolik bariyere sahiptir (van Rooy et al. 2011). Bu üç bariyerin doruk noktası, beyin ve kan dolaşımı arasındaki geçişi kontrol eden

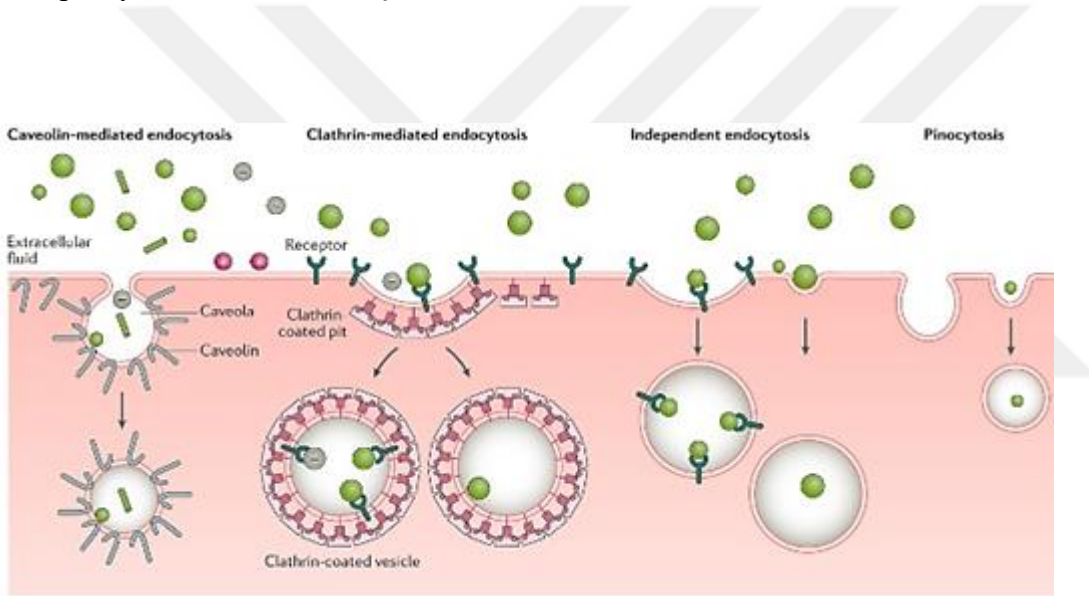
oldukça seçici bir sistem üretir. Beyni hedef alan terapötik yaklaşımlar, kan beyin bariyerinin varlığında sınırlıdır. Teorik olarak tüm büyük moleküller bloke olurken, küçük moleküllerin %98'i bariyeri geçip beyin dokusuna ulaşamaz. Bu nedenle, tedavi genellikle BBB'yi geçebilmek için reseptör aracılı endositozdan yararlanır (Saraiva et al. 2016). Glukoz taşıyıcıları, ilaç dağıtımını kolaylaştırmak için kan beyin bariyerinde yüksek oranda sentezlenir. Transferrin reseptörü beyin beyine ilaç dağıtımında da kullanılabilir ancak bu yaklaşımın kullanılmasının kan dolaşımında bulunan ilacın bir kısmının geçmesine izin verdiği gösterildiğinden, bu yaklaşım henüz klinik uygulamalarda yer almamaktadır (Johnsen et al. 2019). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında sistematik ilaç uygulamasının kan beyin bariyeri tarafından büyük ölçüde engellendiği ve bu da araştırmacıların bu bariyeri aşabilecek intranazal uygulama gibi diğer yolların kullanıma yönelik preparatların hazırlanmasını desteklemektedir. Bununla birlikte, bu yaklaşımda uygulanacak hacim, kişiler arası mukus farklılıkları vb. gibi bazı sınırlamalarında göz önüne alınması gerekliliği açıktır (Sousa et al. 2019).

1.2.3 Mikroçevresel, hücresel ve hücre içi bariyerler

Lokal mikro çevrenin kimyasal veya fiziksel özellikleri ilaçları büyük ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, terapötik moleküllerin, hedeflenen mikro ortamın iyi anlaşılmasından sonra tasarlanması gerekir (Mitchell et al. 2021).

Bu çalışmada, solid tümörlerin mikro-çevresine ve hücresel mekanizmalarına odaklanıldı. İlaçların solid tümörlere penetrasyonu oldukça zordur. Tümör mikroçevresini çevreleyen damar sistemi, ekstraselüler matriks (ECM) ve interstisyel sıvılar, herhangi bir terapötik molekülün karşılaştığı bariyerin temel bileşenleridir (Nagel et al. 2020; Zan et al. 2019). Terapötik moleküllerin tümör mikroçevresindeki kaderi ve tümör hücrelerinin içinde birikme yeteneğinin, artırılmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır (Scheetz et al. 2019; Zan et al. 2019). Tümör ekstraselüler matriksi negatif yüklü olduğundan, bu engelin katyonik ilaçlarla aşılması oldukça zordur (Ding et al. 2019).

Hücre membranları, heterojen olarak dağılmış transmembran proteinleri ve lipidler dâhil olmak üzere sayısız bileşen içerir (Behzadi et al. 2017). Protein ve lipid bileşimindeki farklılıklar hücre membran akışkanlığını ve ilaç geçirgenliğini etkiler ve bu nedenle biyomoleküllerin kullanılan hücresel transport mekanizmaları etkileşimin türüne bağlı olarak farklıdır. Hücresel transport pasif ve aktif olarak gerçekleşebilir (Mitchell et al. 2021). Pasif transport genellikle hücrelerin seçiciliği nedeniyle sınırlıdır ve transport konsantrasyon gradiyenti yönündedir (Foroozandeh and Aziz 2018). Bu nedenle, ilaçların çoğunun hücre zarından geçişi aktif transport ile gerçekleşir. İlaçların hücre zarını geçmek için kullandığı yaygın transport yollarından bazıları Şekil 1.1 de verildi.

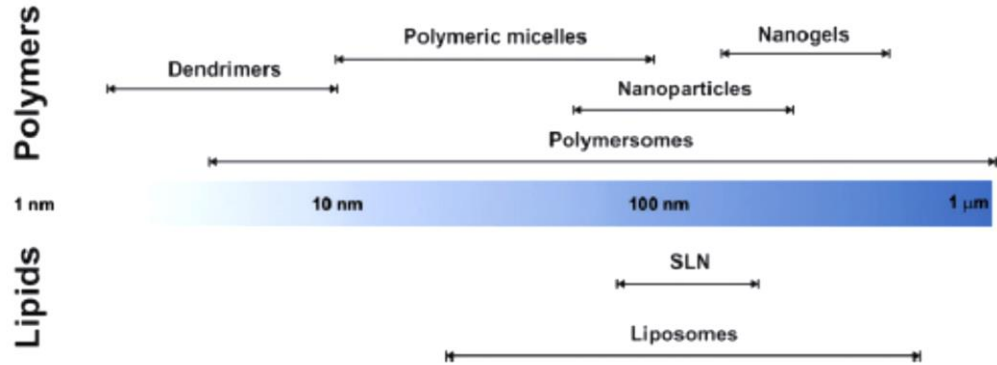


Şekil 1.1. Hücre zarı bariyerini geçmek için moleküller tarafından üstlenilen alım yolları: endositoz ve pinositoz.

Bahsedilen çeşitli bariyerlerin aşılmasında en umut verici yaklaşımlardan biri, nanoparçacıkların (NP'ler) kullanılmasıdır. Son yıllarda, nanoteknolojideki ilerlemeler, nano ölçekli, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen ilaç salınım sistemlerinin sentezini mümkün kılmıştır.

1.3 İlaç Salınım Sistemleri

Nanoteknoloji birçok alandaki kullanımlarının yanı sıra malzeme bilimi ve biyomedikal uygulamalardaki gelişmelere çok önemli katkılar sağlamış olup özellikle medikal alanda nano ölçekte (1-1000 nm) çeşitli ilaçları enkapsülleyebilen nano taşıyıcıların geliştirilmesiyle ‘nanotıp’ adı verilen alt disiplin doğmuştur (Brambilla et al. 2011; Brigger et al. 2002; Farokhzad and Langer 2009; Riehemann et al. 2009; Sanhai et al. 2008). Bu nano-taşıyıcılar, lipidler, polimerler, proteinler, inorganik malzemeler vb. gibi çeşitli malzemelerden farklı boyut ve şekillerde hazırlanabilir. Kullanılan malzemelerin fizikokimyasal özelliklerindeki çeşitlilik, çok değişik ilaç dağılım uygulamalarına olanak sağlar (Şekil 1.2). İlaç dağılımı için nano-taşıyıcı tasarımı genel olarak aşağıdakileri hedefler: (i) ilaçların bozulmasına karşı koruyucu bir sistem oluşturmak (sindirim sistemi, kan dolaşımı, vb.); (ii) ilacın epitelden emilimini ve geçişini kolaylaştırmak; (iii) tedavilerin dağılım profilini ve farmakokinetiğini modüle etmek ve (iv) belirli bölgelere dağılımı ve hücre penetrasyonunu geliştirmek olarak özetlenebilir.



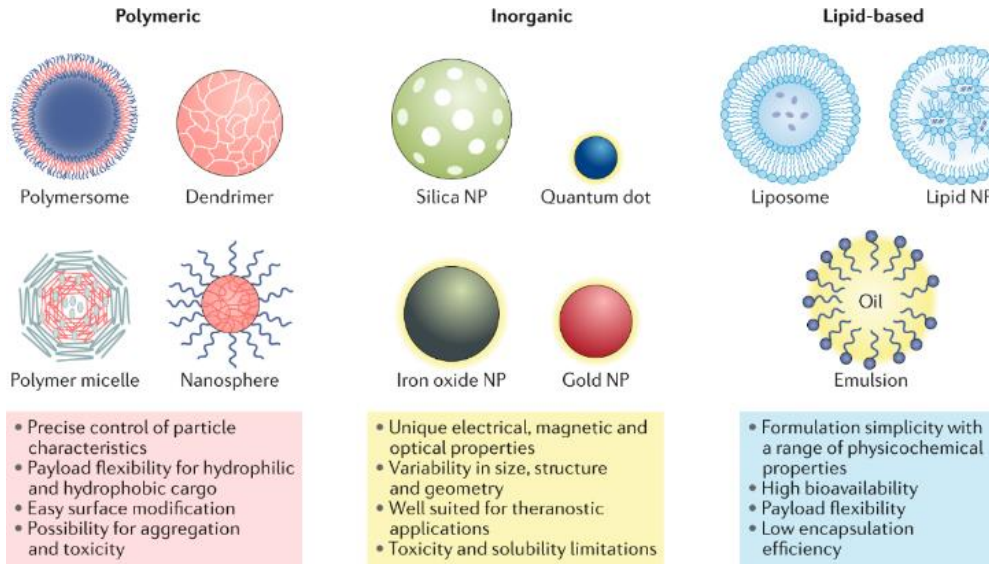
Şekil 1.2. Farklı malzemelerden hazırlanan nanotaşıyıcı tabanlı ilaç taşıma sistemleri (Couvreur and Vauthier 2006).

Nanotaşıyıcıların hazırlanmasında kullanılan biyomalzemeler yüzeyi ihtiyaç duyulan uygulamaya göre modifiye etme ve ayarlama açısından avantajlıdır. Bu tür modifikasyonlar ile kan dolaşımındaki nanotaşıyıcıların kararlılığının ve yarı ömrünün artırılması ve içeriklerinin aktif hedefleme yoluyla veya hedef hücrelerde

bulunan spesifik belirteçler ile hedef bölgeye ulaştırılması mümkün olabilmektedir. Bir diğer önemli avantajı ise canlı sistemde enzimatik veya kimyasal reaksiyonlarla elimine edilebilen biyolojik olarak parçalanabilen materyallerin kullanılabilmesidir. Nanotaşıyıcılardan lipozomlar ve polimerzomlar, fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra hücresel membranlara morfolojik benzerlikleri nedeniyle dikkat çekicidir. Yaygın olarak bilinen ilaç taşıma sistemlerinden bazıları Şekil 1.3 de verilmiştir.

1.3.1 Lipid bazlı veziküller (miseller, lipozomlar ve niozomlar)

Amfifilik lipidler sulu ortamda farklı küresel formlarda kendiliğinden birleşme eğilimindedirler. Bu platformlar, yalnızca bir katman veya sulu bir bölmeyi içine alan iki katmanlı miseller halinde de oluşturulabilir. Lipozomlar ve niozomlar en yaygın olarak kullanılan sistemlerdendir. Kolay ve basit sentez süreci, biyoyumluluk, biyoyararlanım ve (çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip) çeşitli molekül türlerinin önemli miktarlarını kapsülleme yeteneği gibi bazı avantajlar sağlarlar. Lipid bazlı veziküller, FDA tarafından en çok onaylanmış formülasyonlardır (Mitchell ve diğerleri 2021).



Şekil 1.3. Yaygın olarak kullanılan ilaç taşıma/dağıtım sistemleri ve özellikleri (Mitchell et al. 2021).

1.3.2 Polimerzomlar

Bu nanotaşıyıcılar geleneksel lipid bazlı vezikülleri taklit eden sentetik veziküllerdir. Bunlar aynı zamanda ‘‘core-shell’’ ilaç nanotaşıyıcıları olarak da bilinirler ve veziküler sistemlerde kendiliğinden birleşen ve ilacı çekirdeklerinde hapseden blok kopolimerlerin hidrasyonu yoluyla oluşturulurlar. Polimerzomlar, lipozomlara kıyasla gelişmiş stabilite ve kapsülleme kapasiteleri ile de bilinirler (Rideau et al. 2018). Polimerzomların sentezinde kullanılan polimerlerden bazıları poli- (etilen glikol) (PEG) ve poli- (dimetilsiloksan) (PDMS) dır. Polimerzomun ana avantajı, amaçlanan uygulamaya göre farklı polimerler kullanarak yapının çeşitli özelliklerini değiştirme ve ayarlama yeteneğidir (Discher and Ahmed 2006). Polimerlere ilaç konjugasyonu, bir pro- ilacı bir hidrofilik polimer ile kovalent olarak bağlamak için biyolojik olarak bozunabilir bir bağlayıcının kullanılması ile gerçekleştirilir. Polimer, nano yapı bir yapı veya misel benzeri bir form oluşturarak ilacı koruyabilen bir taşıyıcı görevi görür (Hu and Jing 2009).

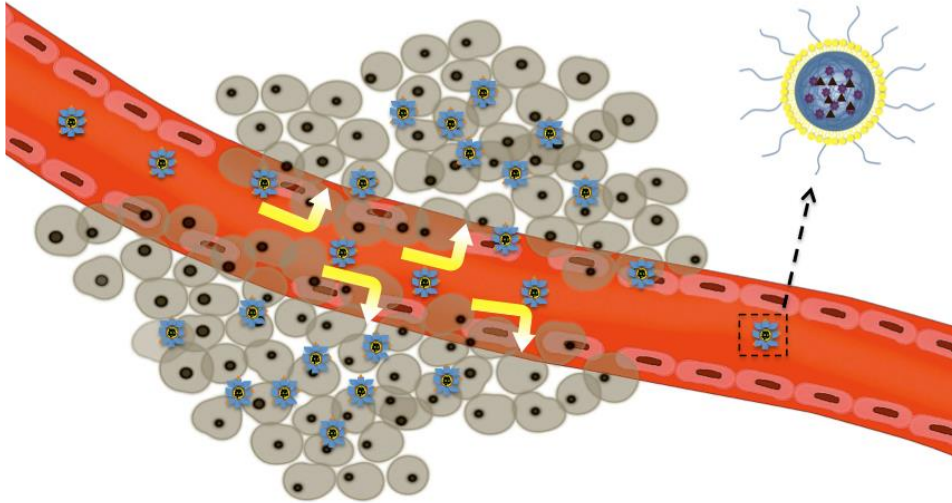
1.3.3 İnorganik nanopartiküller

Metaller (altın, demir vb.), silika ve kuantum noktaları (Quantum dots, QDs), nano ölçekli görüntüleme ve ilaç dağıtım sistemlerinin oluşturulması için kullanılan inorganik malzemelerden bazılarıdır. Polimer tabanlı platformlara benzer inorganik nanopartiküller, belirli boyut, şekil ve yapılarda sentezlenebilir. Altın nanopartiküller en çok araştırılan moleküllerdir (Yang et al. 2019). Ayrıca, temel malzemelerin doğası göz önüne alındığında, bu inorganik nanopartiküller, diğerleri arasında renk, floresan, termal ve manyetizma gibi benzersiz özelliklere sahip olabilir. Metal bazlı nanopartiküller kolayca değiştirilebilir ve fonksiyonlanabilir, bu da ilaç dağıtım sistemleri olarak uygulamalarını genişleten ek özellikler kazandırır (Wang et al. 2020; Yang et al. 2019). Manyetik nanoparçacıklar, FDA tarafından onaylanan başlıca inorganik nanoparçacıklardır (Bobo et al. 2016). İnorganik nanopartiküller, organik malzeme bazlı nanopartiküllerde eksik olan bazı özelliklere sahiptir. Ancak, düşük çözünürlükleri ve toksisiteleri ile ilgili birçok

endişe nedeniyle klinik kullanımları büyük ölçüde sınırlıdır (Arias et al. 2018; Manshian et al. 2017).

1.4 İlaç Taşınımı/Dağıtımının İyileştirilmesi

Nano boyutlu partiküller, ilaç taşınmasında dolaşım sürelerinin uzatılması yoluyla ilaç dağıtımını sırasında hücrelerin fizyolojik bariyerlerini aşabilirler (Maeda 2001; Matsumura and Maeda 1986; Tanaka et al. 2004). 50-150 nm arasındaki boyutlardaki terapötik nanopartiküller, damar sisteminden sızarak tümörlerin hücre dışı matrislerinde toplanabilirler. Diğer yandan tam fonksiyonlu lenfatik drenaj sisteminin olmaması nedeniyle daha iyi bir tutma olasılığına sahiptir (Şekil 1.4). Geleneksel antikanser ilaçları, dolaşımdaki kısa ömürleri nedeniyle EPR etkisinden daha az yararlanır. Spesifik olmayan hücresel alım, opsonizasyon, plazmada bozunma ve hepatik klirens gibi çeşitli işlemler yoluyla dolaşımdan hızla elimine edilirler. Küçük antikanser ilaçları genellikle uygulamadan birkaç saat sonra dolaşımdan temizlenir. Bu nedenle, nanopartiküllerin bu amaçla kullanımlarında antikanser ilaçların farmakokinetik özelliklerinin geliştirilmesine odaklanılmıştır.



Şekil 1.4. Tümörlerde EPR etkisinin gösterimi.

Lipozomların dolaşım ömrünü uzatmaya yönelik ilk çalışmalardan yeterli sonuçlar alınamamıştır (Torchilin 2005). Lipozomlarda ilaçların enkapsülasyonunun ilgili ilacın plazmada degradasyonundan ve renal filtrasyonundan koruyabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, lipozomların, retiküloendotelyal sistem (RES) (monositler ve makrofajlar) tarafından alınımı nedeni ile lipozomların kan dolaşımından hızlı bir şekilde elimine edilmesine yol açtığı rapor edilmiştir. Daha sonra NP teknolojilerindeki gelişmeler ile NP dolaşım süresinin uzamasında ve spesifik olmayan RES alımına karşı korumada etkin fomlar temel olarak polietilen glikol (PEG) kaplama tabakasının eklenmesiyle elde edilmiştir (Ballou et al. 2004; Carpenter et al. 1971; Uchida et al. 2005).

PEG'in uzunluğunun ve yoğunluğunun bu parametreleri büyük ölçüde etkileyebileceği gösterilmiştir. 2-5 kDa'lık bir moleküler ağırlığa (MW) sahip PEG kullanımı, optimal dolaşım özellikleri ürettiği rapor edilmiştir. Diğer yandan kaplanmış NP'lerin son boyutunun, *in vivo* etkili ilaç taşıma/salınım performansı için en önemli kriter olduğunu gösterilmiştir. Kabul edilebilir ilaç alıkonmasına ve tümör ekstrasvazasyonuna ulaşmak için 50 ile 150 nm arasında değişen boyutların en iyi olduğu bildirilmiştir (Jiang et al. 2008; Perrault et al. 2009).

NP'leri kaplayarak artan dolaşım süresinin önemini daha da doğrulamak için, hayvanlar ve insanlar üzerinde test edilen serbest doksorubisin (DOX) ve DOX'un enkapsüle edildiği PEG kaplı lipozomlar arasındaki karşılaştırmalı bir çalışmada, enkapsülasyondan sonra farmakokinetik özelliklerin geliştirildiğini göstermiştir. (Gabizon et al. 2003). (Li et al. 2001; Peracchia et al. 1999).

1.4.1 Hedeflenmiş ilaç taşınımı

Genellikle damarlanmanın zayıf olduğu tümörlerde pasif hedefleme ile ilaç taşınımının kullanımı sınırlıdır. Diğer yandan daha önce de belirtildiği gibi, damar geçirgenliği tümörden tümöre değişebilir, bu da ilacın düzensiz lokalizasyonuna neden olur ve etkinliğini azaltır. Bu nedenle, tümöre üniform ilaç taşınmasını sağlamak için ligand reseptör etkileşimini kullanan aktif hedefleme sistemleri geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. İlgili hedefe spesifik yönlenme

sağlayabilecek antikorlar, peptitler, aptamerler vb. gibi bazı ligandlar, kovalent bağlar yoluyla NP'lerin yüzeyine eklenebilir. Antikorların antijenleriyle spesifik etkileşimi, hedeflenmiş NP'lerin oluşturulmasındaki en yaygın yaklaşımlardan bir tanesidir. Bazı kanser türleri, doğal olarak belirli antijenleri aşırı eksprese eder ve antikorla modifiye edilmiş NP'lerin kullanılması ile spesifik etkileşim ile hedefe yönelme sağlanmış olur. Örneğin, anti-HER2 ile konjuge edilmiş lipozomlar, HER2 aşırı ekspresyonu olan göğüs tümörlerinde konjuge olmayan lipozomlarla karşılaştırıldığında 700 kat daha fazla ilaç alımı gerçekleştirmektedir (Park et al. 2001). Büyük boyutta antikorlar (150 kDa) NP'lere bağlanmalarında tanıma bölgelerinde sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar alternatif olarak Fab fragmanları, RNA tabanlı aptamerler, spesifik büyüme faktörleri ve peptidler gibi farklı ligantların kullanımına yönelik çalışmalara ağırlık vermişlerdir (Farokhzad et al. 2006; Karmali et al. 2009; Maruyama et al. 1999; Zhou et al. 2007).

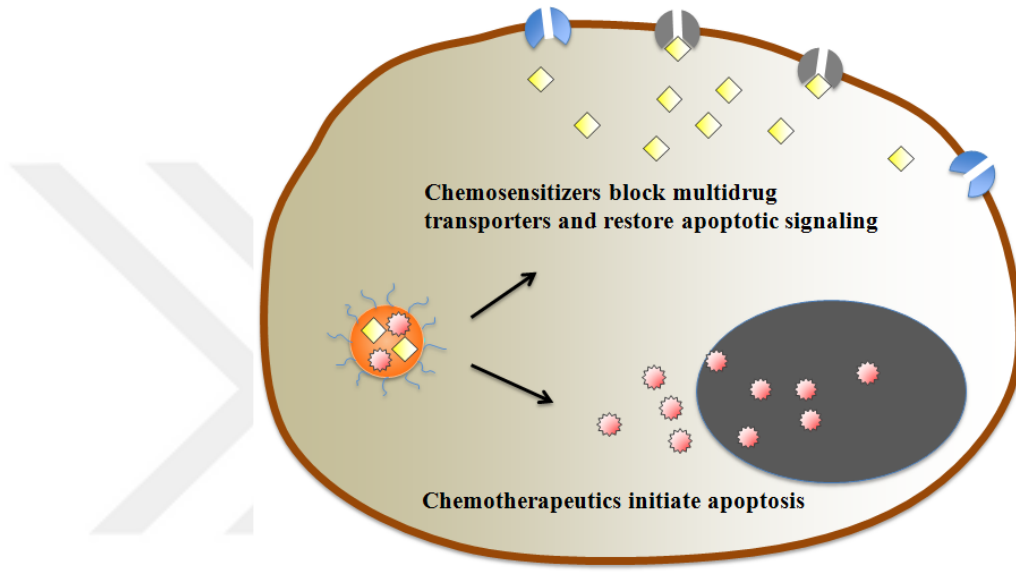
1.4.2 Birden çok ilacın birlikte taşınımı

Çoklu ilaç direnci (MDR), kanser hücrelerini terapötik moleküllerden koruyan iyi bilinen bir savunma mekanizmasıdır. Bu nedenle kanser hücrelerinin ilaca dirençlilik bariyerini aşmak için birden çok ilacın birlikte kullanımı gündeme gelmiştir. Bu bağlamda ilaçların doğru kombinasyonu, kanser hücrelerinde seçiciliği artırabilen ve ilaca direnç mekanizmalarını engelleyebilen terapötik yaklaşımın sinerjistik etkisini destekleyici olması gerekmektedir (DeVita et al. 1975).

Nanotaşıyıcılar, birkaç ilacın enkapsülasyonu ve patolojik dokulara dağıtımlarını senkronize etme yetenekleri nedeniyle terapide büyük bir potansiyele sahiptir. Nanotaşıyıcılara dayalı kombinasyonlar, geleneksel ilaç kokteyllerine kıyasla ilaç-ilac oranın korunması açısından da önemlidirler. Belirli molar oranlarda birden fazla ilacın enkapsülasyonu ile hazırlanan lipozomlar ile yapılan klinik çalışmalarda, lipozomal formülasyonun geleneksel kombinasyon tedavisine göre

avantajı gösterilmiştir (Batist et al. 2009; Bayne et al. 2009; Feldman et al. 2011; Lim et al. 2010).

Kemosensitize edici moleküller ile birlikte enkapsüllenen ilaçların kanser hücrelerinde çoklu ilaç direncinden korunmadaki potansiyeli Şekil 1.5 de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. İki molekülün (ilaç ve kemosenstizer) birlikte kapsüllemesinin MDR kanser hücrelerine karşı nasıl etki edebileceğinin gösterimi.

Doksorubisin ve P-glikoprotein (P-gp) inhibitörü sikloporin A ile birleştirilerek hazırlanan polialkilsiyanoakrilat NP'lerin tek başına Dox tedavisine kıyasla Dox'a dirençli P388 hücreleri üzerinde gelişmiş bir inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca Ko-enkapsülasyon yaklaşımının, Dox yüklü NP'lerin serbest siklosporin A ile bir kombinasyonunda görülmeyen bir sinerjik etki ürettiği de gösterilmiştir (Emilienne Soma et al. 2000). Başka emoterapötik nano-emülsiyonlar oluşturulmasında çeşitli kombinatoryal NP'ler hazırlanmış, çoklu ilaç dirençliliğinden korunma açısından değerlendirilmiştir (Ganta and Amiji 2009). Çoklu ilaç direnci ile ilgili lipozomal formülasyonlar ve farklı NP'ler ile yapılan çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Kemoterapötikler ve kemosensitizörler içeren kombinatoryal nanopartikül formülasyonlara örnekler (Hu and Zhang 2012).

Nanocarrier	Platform	Chemo-Therapeutic	Chemosensitizing	Agent Indication Status	Refs
Liposome	Topotecan	amlodipine	Leukemia	<i>in vivo</i>	(Li et al. 2006)
Liposome	Vincristine	quinacrine	Leukemia	<i>in vivo</i>	(Liang et al. 2008)
Liposome	Paclitaxel	tariquidar	Ovarian cancer	<i>in vitro</i>	(Patel et al. 2011)
Liposome (transferrinconjugated)	Doxorubicin	verapamil	Leukemia	<i>in vitro</i>	(Wu et al. 2007)
Liposome (cationic)	Doxorubicin	MRP-1 and BCL2 siRNA	Lung Cancer	<i>in vitro</i>	(Saad et al. 2008)
Cationic coreshell nanoparticle	Paclitaxel	siRNA BCL2-siRNA	Breast cancer	<i>in vitro</i>	(Wang et al. 2006)
PLGA-PEG nanoparticle	Vincristine	verapamil	Breast Cancer	<i>in vitro</i>	(Song et al. 2009)
PLGA-PEGbiotin nanoparticle	Paclitaxel	tariquidar	Various types cancer	<i>in vivo</i>	(Patil et al. 2009)
PLA-PEGbiotin nanoparticle	Paclitaxel	P-gp siRNA	Various types cancer	<i>in vivo</i>	(Patil et al. 2010)
Polyalkylcyan oacrylate nanoparticle	Doxorubicin	Cyclosporine A	Various types cancer	<i>in vitro</i>	(Emilienne Soma et al. 2000)
Oil nanoemulsion	Paclitaxel	curcumin	Ovarian Cancer	<i>in vitro</i>	(Ganta and Amiji 2009)
Mesoporous nanoparticle	silica Doxorubicin	BCL2-siRNA	Ovarian Cancer	<i>in vitro</i>	(Chen et al. 2009)

1.5 Teranostikler

Hastalıkların erken tanısı, patolojinin doğru yönetilmesine yardımcı olan etkili tedavi yaklaşımlarının oluşturulmasında önemli bir adımdır. Kanser ve yaşlanmaya bağlı diğer hastalıklarda semptomların erken tespiti, hastanın yaşam tarzını etkilemeden terapötik etkinin artmasında büyük fark yaratabilir. Şu anda kullanılan tanı araçlarının çoğu, optik görüntüleme, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (CT) vb. gibi radyoaktif, floresan veya kontrast maddeler gibi toksik maddelerden yararlanan çeşitli teknikleri içermektedir. Bu moleküller genellikle kanseri tedavi etmek ve izlemek için kemoterapi ile birlikte kullanılır. Toksisite sorunu, araştırmaları yüksek toksisite riski olmadan her iki eylemi de gerçekleştirebilecek yeni yaklaşımlar tanımlamaya yöneltmiştir. Bu bağlamda teranostik nanotaşıyıcılar, hem ilaç moleküllerinin hem de kontrast ajanının birlikte kullanılmasından dolayı önemli bir alternatif olarak görülmektedir. Bu platformlar lipidik (lipozomlar), polimerik (polimerler, polimerzomlar) inorganik

nanopartiküller (metalik NP'ler), miseller veya dendrimerler olabilmektedir. Tercihen, teranostik nanotaşıyıcılar, hem terapötik hem de tanısal moleküllerin yüksek konsantrasyonunu kapsülleyebilmelidir. Normal dokulara düşük düzeyde toksisite ile içeriklerini hedef tarafa verimli bir şekilde iletebilmeleri gerekir (Jani et al. 2020).

NP'lerin optik özelliklerini kullanmak, teranostik platformlar geliştirmenin en basit yoludur. Bu nedenle, metalik NP'ler, NIR yakınında ışığı absorbe etme yetenekleri nedeniyle kanser kemoterapisinde umut verici bir seçenektir (Loo et al. 2005). Ayrıca NP'ler doksorubisin gibi hem tedavi edici hem de görüntüleme özelliklerine sahip moleküller ile birleştirilebilir (Sorace et al. 2012). Literatürde Teranostik uygulamalar için önerilen katı lipid NP'ler, nanoyapılı lipidler, nanokapsüller, miseller, inorganik NP'ler, protein bazlı NP'ler, viral NP'ler gibi birçok nanotaşıyıcı formülasyonu vardır (Madamsetty et al. 2019).

1.6 Tedavide Peptidler

Doğal peptitlerin biyomedikal alanda ve gıda endüstrisinde kullanımı büyük ilgi görmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi ve inflamasyon bağlantılı kanser, diyabet vb. hastalıkların patalojilerinde önemli olmaları nedeni ile birçok biyolojik proseste değerlendirilmektedirler. Bu nedenle peptidlerin yapı ve etki mekanizmalarının araştırılarak tedavi amaçlı kullanımlarına ilişkin çalışmalar son yıllarda yaygınlaşmıştır (Melino et al. 2014).

1.6.1 Hücreye girebilen peptidler ("Cell-penetrating" CPP's)

Hücreye nüfuz eden peptitler (CPP'ler), hücre girişlerini kolaylaştırmak için büyük makromoleküller ve/veya mikroskobik partiküller ile konjuge veya kompleks oluşturulabilen kısa katyonik ve/veya amfipatik peptidlerdir. Bu peptitler genellikle 30 amino asitten daha kısadır. Hücre içine geçiş ilgili peptide ve hücre tipine bağlı olarak farklanmalar gösterse de hemen hemen tüm hücrelerde gözlenir. Hücre plazma zarını geçebilen bir polikasyonik peptid ilk olarak 1965'te rapor edilmiştir

(Ryser and Hancock 1965). Sonrasında ise çeşitli çalışmalar ile bu görüşler desteklenmiştir (Derossi et al. 1994; Vives et al. 1997). Günümüzde ise çok sayıda karakterize edilmiş CPP vardır ve bunlardan bazıları Çizelge 1.2 de verildi.

Çizelge 1.2. Türetilmiş ve tasarlanmış CPP'lere örnekler.

Name	Sequence	Ref.
Protein derived:		
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	(Derossi et al. 1994)
Tat (48-60)	GRKKRRQRRPPQ	(Vives et al. 1997)
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	(Elmqvist et al. 2001)
Designed:		
Polyarginine	(R) _n	(Wender et al. 2000)
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	(Pooga et al. 1998)
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	(Soomets et al. 2000)
Tüm peptitlerin amidasyonlu bir C-terminali vardır.		

Kanser, global bir sorundur ve kemoterapi hala tercih edilen tedavi olarak kabul edilir ancak seçicilik eksikliği, ağır yan etkiler ve hatta ilaca direnç nedeniyle düşük başarı şansı vb. bu tür tedavilerin temel kısıtlamalarıdır. Bu nedenle yeni kemoterapötik ilaç geliştirilmesinde peptitler tedavi için iyi bir aday olarak görülmektedir ve CPP'ler özellikleri nedeniyle antikanser ilaç taşınımındaki kullanım potansiyelleri ile ilgi çekmektedir (Dinca et al. 2016; Fonseca et al. 2009; Helmfors et al. 2015; Huang et al. 2013; Kato et al. 2016; Vives et al. 2008). Ayrıca CPP'lerin çoklu ilaca direnç bariyerini aşabileceği öne sürülmüştür (Davoudi et al. 2014; Dubikovskaya et al. 2008; Lindgren et al. 2006; Vargas et al. 2014). Her ne kadar olumlu bir beklenti gösterebilir de peptidlerin katyonik karakterlerinden dolayı peptidlerin kullanımlarının spesifik olmayan, toksisite ve hızlı eliminasyon vb. sınırlamaları söz konusudur. Bu nedenle, bu sınırlamaları kaldırabilmek için örn. kanser hücrelerini hedefleyen pH ile aktive olabilen CPP'lerin kullanılması gibi farklı yaklaşımlar denenmiştir (Fei et al. 2014; Jiang et al. 2012; Lee et al. 2008; Shi et al. 2015). Aşırı laktik asit üretimi nedeniyle kanser hücresi ortamının normal doku ortamından biraz daha asidik olduğu bilinmektedir ve pH ile aktive olan CPP'ler ile asidik ortam nedeniyle kanser hücrelerine karşı daha seçici hale getirilmiştir (Cardone et al. 2005; Jahde et al. 1982; Liang et al. 2014; Tannock and Rotin 1989). Negatif yüklü membranlar ve katyonik peptitler arasında üretilen CPP'lerin elektroporasyon mekanizması, antikanser moleküllerin hücre alımını

etkileyen ana faktördür (Futaki et al. 2007; Guo et al. 2016; Ziegler 2008). Bu nedenle, elektrostatik yüklere odaklanmak, aktiviteyi modüle etmeye ve özgüllüğü artırmaya yardımcı olabileceği düşünülmüştür. (Yao et al. 2017; Zaro et al. 2012; Zhang et al. 2011).

1.6.2 Metal iyon bağlayıcı peptitler

Proteinlere/peptidlere metal iyonlarının eklenmesinin agregatlaşma hızlarını büyük ölçüde değiştirebileceği bilinmesine rağmen, bu ilişki görüldüğü kadar basit değildir. Metal iyonları, fizyolojik koşullar altında bile proteinlerin agregasyonlarını indükleyebilir. Bu mekanizma hala tam olarak anlaşılamamıştır çünkü metal iyonlarının varlığında agregasyon sürecini indüklemek/azaltmak sıcaklık, pH, protein ve metal konsantrasyonları gibi diğer faktörlere bağlıdır. Bazı metal iyonları protein agregasyonunu hem hızlandırabilir hem de engelleyebilir (örneğin: Cu^{2+} , Zn^{2+}). Bu nedenle, protein agregasyonu ve metal iyonları arasındaki bağlantıları belirlemenin, peptid tabanlı tedavilere katkıda bulunulacağı düşünülmektedir (Poulson et al. 2020). Zn^{2+} ve Ca^{2+} gibi bazı iki değerlikli metal iyonlarının varlığı bazı katyonik AMP'lerin aktivitesini veya etki şeklini etkileyebilir (Łoboda et al. 2018).

Bu çalışmada, katyonik antimikrobiyal etkisi olan bazı peptidler kullanılmıştır. AMP'lerin metallerle etkileşimi kısmen His, Arg ve Lys gibi katyonik amino asitlerin varlığı ile ilişkilidir. Metaller, protein aktivitesinin düzenlenmesinde oynadıkları merkezi rol nedeniyle proteinlerde çok önemli kofaktörler olarak kabul edilir. Protein dizisi boyunca amino asitlerin fonksiyonel gruplarının uygun şekilde düzenlenmesi, çok çeşitli metal iyonlarının bağlanmasına yardımcı olur. Proteinler metal iyonlarını, doğalarına ve konumlarına bağlı olarak, sekonder ve tersiyer konformasyonlarına göre seçimli olarak bağlarlar. Bu nedenle, farklı uygulamalar için kullanılacak peptid dizilerinin belirlenmesi metal iyonları etkileşimi açısından önemli olduğu rapor edilmiştir (Xing and DeRose 2001). Yaygın stratejilerden bir tanesi, metal iyonlarını bağlayabilen peptid dizilerini kullanmaktır. Öte yandan bilim adamları, bu peptitlerin sürekli büyüyen kütüphanesini (veri tabanı) oluşturmak için doğal metal iyon bağlayıcı peptitlere dayalı yeni dizilerin

öngörüsünü ve sentezini de kullanmaktadırlar (Licini and Scrimin 2003; Turk and Cantley 2003).

Histidine zengin peptitler; katyonik ve amfipatik peptidlerdir. Katyonik amfipatik helikal yapılar sergilerler ve mikroorganizmaların membranları ile temas halindeyken mikroorganizmalara karşı yıkıcı etkinlikleri indüklenir. Histidin açısından zengin AMP'lere, Clavinin, daptomisin ve histatin vb. çok sayıda örnek verilebilir (Conde et al. 2012).

Histatinler

Tükürük, birçok enfeksiyon türüne karşı korunma ve sindirim gibi birçok fonksiyonda etkin olan biyoaktif peptitler, enzimler, metabolitler, metal iyonları, düzenleyici hormonlar vb. bileşenleri içerir. Bu sınıfın kompleksliği aynı zamanda iyi bir tanı ortamı olarak da önemlidir. Ayrıca tükürük, proteolitik proteinler ve peptitler açısından son derece zengindir (Çizelge 1.3) (Conklin et al. 2017; Imamura et al. 2009; Sun et al. 2009; Troxler et al. 1990).

Çizelge 1.3. Tükürükte bulunan bazı biyoaktif peptidlere örnekler (Melino ve diğerleri 1999) (© 2014 American Chemical Society).

Structural groups	Additional classification	Representative peptides families
Histidine-rich	Peptides	Histatins
Cysteine-rich	Cationic peptides	Defensins
	Phosphoproteins	Cystatins
Proline-rich	Acidic, basic, glycosylated	Proline-rich proteins (PRPs)
Proline- and tyrosine-rich	Phosphopeptides	Statherins
Name	Sequence	
Histatin 1	DS ^p HEKRHHGYRRKFHEKHHSREFPFYGDYGSNYLYDN	
Histatin 3	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGYRSNYLYDN	
Histatin 5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGY	
Proteolytic fragment		
Histatin 2	RKFHEKHHSREFPFYGDYGSNYLYDN	
Histatin 4	KFHEKHHSRGYRSNYLYDN	
Histatin 6	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSRGYR	
Histatin 7	RKFHEKHHSRGY	
Histatin 8	KFHEKHHSRGY	
Histatin 9	RKFHEKHHSRGYR	

1.7 Nanotaşıyıcılar İle İlaç Taşınımındaki Sınırlamalar

Nanotıp ve teknolojideki gelişmeler ile NP'lerin kullanımının daha güvenli hale gelmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Nano partiküllerin uzun süreli dolaşım, hedefleme, hücre penetrasyonu ve alımı, birden fazla molekülün enkapsülasyon ve taşıma yeteneği gibi çeşitli avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları vardır. Bunlar genel olarak aşağıda özetlenmiştir:

- Dolaşım sürelerini artırmak için PEGilasyon ile NP'lerin kaplanması sırasında toksik kimyasalların kullanımı (Alexis et al. 2008; Knop et al. 2010; Koide et al. 2009; Salvador Morales et al. 2009).
- Kombinatorial tedavide (çoklu ilaç enkapsülasyonu) kullanılacak nanopartiküllerde lipid kompozisyonunun ayarlanması, enkapsüle edilmiş bileşenlerin konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin iyi optimize edilmesi gerekliliği.
- Hedeflenmiş nanopartikül uygulamalarında biyokonjugasyon yöntemlerinin optimizasyonu ve standartlaştırılması (Casey et al. 2000; Hayashi et al. 1995; Moulahoum et al. 2021; Schneider 2000; Siemers et al. 1997).

1.8 Protein Glikosidasyonu ve Hastalık İlişkisi

Protein glikasyonu, şekerin karbonil grubu ile proteinin serbest amino grubunun Schiff bazı oluşturmasıyla başlamaktadır. Schiff bazı oluşumu saatler içerisinde gerçekleşmekte ve sonrasında günler içerisinde Amadori ürünlerine dönüşmektedir. Amadori ürünleri ise daha sonra dikarbonil bileşiklerine ve sonrasında da haftalar içerisinde ileri glikasyon son ürünlerine (AGE'lere) dönüşmektedir. Amadori ürünlerinin oluşumuna kadar olan bölüm geri dönüşümlü iken, daha sonraki evreler ise geri dönüşümsüzdür. Glikasyon, özellikle erken dönemlerde daha fazla olmak üzere konsantrasyona bağlıdır, bu sebeple hiperglisemik koşullarda oluşumları artar.

Monosakkaritler arasındaki reaktivite şekerin açık (karbonil) ve kapalı (hemiasetal) konfigürasyonları arasındaki dengeye bağlı olarak 300 kata kadar çıkabilir. Aldoz şekerler ketoz şekerler ile karşılaştırıldığında, yapılarındaki aldehit karbonil grubunun daha elektrofilik olmasından dolayı daha hızlı reaksiyon verirler. Glukoz aldoz şekerler arasında en az reaktif olanlardan biridir. Bunun nedeni ise asiklik formda bulunma oranının % 0,001 olmasıdır. Kantitatif olarak insanlarda bulunan ana monosakkarittir ve glike proteinlerin çoğu glukoz eklenmesiyle oluşur. Amadori ürünlerinin bir seri dehidrasyon ve yeniden düzenlenmeler ile spontane olarak parçalanması ile reaktif ketoaldehit dikarbonil bileşikleri meydana gelir. Oluşan bu deoksiglukozonlar proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek ileri glikasyon son ürünleri (AGE) olarak bilinen protein içi çapraz bağlantıları oluştururlar. Amadori ürünlerinin oluşumuna kadar olan bölüm geri dönüşümlü iken daha sonraki evreler ise geri dönüşümsüzdür ve yaşam süresi boyunca birikir. AGE'lerin çoğu floresan özelliktedir ve klinik veri oluşturulmasında protein bağlı floresan ölçümünden yararlanılır.

AGE oluşumu haftalar süren bir süreç olduğu için genellikle uzun ömürlü proteinleri etkiler. Proteinlerdeki lizin, histidin, arginin aminoasitleri glikasyona daha hassastır. Son dönem böbrek yetmezliği gibi yüksek düzeyde AGE oluşumunun olduğu durumlarda nükleik asit ve lipid bileşenler de AGE oluşumuna katılırlar. Glikasyon miktarı hiperglisemi derecesine bağlı olduğundan hem hücre içinde hem de hücre dışında oluşabilir. Proteinlerin glikasyonu ile oluşan ketoamin yapıdaki ilk ürünler kararlı değildir; oksidatif ve oksidatif olmayan mekanizmalarla bozularak çok sayıda glikasyon son ürünlerine (AGE) çevrilir. İleri glikasyon son ürünleri olarak adlandırılan bu ürünlerin birikmesi ile doku proteinlerinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler oluşmaktadır.

Sonuç olarak Alzheimer gibi yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıklar, diyabetik komplikasyonlar, romatoid artrit, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, katarakt vb. birçok önemli hastalığın patagonezinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Christen, 2000; Dukic-Stefanovic et al., 2001; Nawale et al., 2006).

AGE oluşumunda etkili faktörler; proteinlerin yapım yıkım hızı, hiperglisemi derecesi oksidatif stresin varlığıdır. AGE'ler, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına yol açtığı gibi, kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler. Diğer yandan AGE'lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri, nükleer faktör kappa B (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genlerin (prokoagülant doku faktörü endotelin-1, adhezyon molekülü, VCAM-1 gibi) ekspresyonlarının artışında da etkin oldukları bilinmektedir. *In vivo* şartlarda, bu reaksiyonun yaşlanma sürecinde moleküllerin yavaş olarak parçalanmasının yönlendirilmesinde önemli bir rolü olduğu görülmüştür. Glikasyon bağımlı hasarın temel mekanizması proteinlerin aralarındaki çapraz bağlanmalar sonucu modifiye olmaları veya fonksiyonel özelliklerini kaybetmelerinden kaynaklanmaktadır. Glikasyonla ilgili çalışmaların çoğu ökaryotlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni ise diyabet ve Alzheimer gibi yaşlanmaya bağlı hastalıklarla ilişkisinin olmasından ileri gelir.

Geçiş metal iyonlarının Maillard reaksiyonunda önemli rol oynadığı pek çok kanıt ile desteklenmiştir. Metal iyonlarından özellikle bakır(II) ile demir(III) iyonlarının oksijen katalizi ile birlikte glukoz ve Amadori ürünlerini ROS ve dikarbonillere dönüştürerek, modifiye AGE moleküllerinin oluşumuna ve doku hasarına neden olduğu belirlenmiştir (Brewer 2010; Price et al. 2001; Ramonaitytė et al. 2009; Van Campenhout et al. 2004). Bu nedenle AGE'lerin oluşumunu minimuma indirmek veya engellemek için birçok antioksidan ve deglikasyon ajanı geliştirilmektedir. AGE'ler temelde diyabet komplikasyonlarında iki şekilde rol almaktadır. Bunlardan birincisi; özellikle ekstrasellüler matriksin yapısındaki proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak matriks yapısını ve fonksiyonlarını bozmak, ikincisi ise; AGE'lerin birtakım hücrelerde bulunan reseptörlerine bağlanması sonucunda çeşitli sinyal yollarını aktive ederek çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ve sitokinlerin sentezine ve salınımına yol açılmasıyla pek çok metabolik değişikliklere neden olmasıdır. Bu değişimler, tromboz faktörlerinin artışı, trombomodülin sentezinin azalışıdır.

1.9 Deglikasyon ve AGE İnhibitörleri

Proteinlerin deglikasyonu protein hasarının(glikoksidasyon) giderilmesinde yeni bir yaklaşım olup aşağıda verilen mekanizmalara göre etki göstermektedirler;

- İleri glikasyon ürünlerinin oluşumunun engellenmesi.
- Oluşan glikasyon ürünlerinin yıkımının sağlanması.
- AGE reseptörlerinin aktivasyonunun önlenmesi.

Daha geniş anlamda glikasyon reaksiyonunun inhibisyonu AGE oluşumunun ve AGE aracılı hasarın farklı adımlarına müdahalede bulunarak gerçekleştirilebilir (Hipkiss and Brownson, 2000; Rahbar and Figarola, 2003; Vasan et al., 2003).

- Reaktif dikarbonil gruplarını tuzaklamak
- Geçiş metal iyonlarının antioksidan aktivitelerinden yararlanmak
- Serbest radikalleri tutan diğer antioksidanlar
- AGE çapraz bağ kırıcıları
- AGE reseptör bloklayıcıları
- AGE reseptör sinyali bloklayıcıları
- Antidiyabetik tedavi ile glisemi indirgenmesi
- Aldehit redüktaz inhibisyonu
- Transketolaz aktivitesi ile trioz fosfatların pentoz fosfat yolağına geçişini sağlamaktır.

Günümüze değin yapılan çalışmalarda endojen ve ekzojen kaynaklı birçok farklı bileşik etki mekanizmalarına göre değerlendirilmiştir. Özellikle bir dipeptid olan karnosin (β -Alanil-histidin) ve anserin gibi analogları, piridoksamin, aminoguanidin, piridoksal-5-fosfat, n-asetil sistein gibi bileşikler hem antioksidan hem de deglikasyon etkinliği açısından değerlendirilmiştir (Ardestani and Yazdanparast 2007; Bellia et al. 2009). Ayrıca antioksidan etki yanında metal şelatlama etkisinin de değerlendirildiği karma çalışmalar mevcuttur.

1.10 Tez Çalışmasının Amacı

Son yıllarda nanoteknolojinin gelişimi ile farklı tanı ve tedavi stratejileri üzerine yoğunlaşmış olmakla birlikte bu tür uygulamalarda kullanılan malzemelerin birikimi ve toksik etkileri tartışma konusudur. Bu nedenle hedefe yönelik hastalık tanı ve tedavisinde biyo-uyumlu nanopartiküllerin tasarlanması önem kazanmaktadır. Metal bağlayan amino asit açısından zengin peptidler genel olarak membran penetrasyonu ve seçicilikleri, biyolojik uyumlulukları ve kolay bozunmaları nedeniyle antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra kanser terapisinde etkin oldukları bilinmektedir.

Bu bağlamda, bu çalışmada kanser, diyabet ve nörodejeneratif vb. multifaktoryel hastalıkların tedavisine katkı sağlayabilecek teranostik nanoyapıların hazırlanması temel olarak amaçlandı. Özellikle metal iyonlarını bağlama etkinliğine sahip peptidler ile kombinasyon halinde lipidik ve polimerik malzemelerden farklı tipte nanotaşıyıcıların hazırlanması proje kapsamında tutuldu.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar 4 Bölüm de gerçekleştirilmiş olup her bölüme ilişkin kullanılan materyaller ve yöntemler ilgili bölüm başlığı altında verilmiştir.

2.1 1. Bölüm: Metal İyonu Peptid Etkileşiminin Proteinlerin Glikoksidasyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Bu bölümde albumin gliksidasyon modeli kullanılarak çinkonun karnosin'in protein glikoksidasyonunun inhibisyonu üzerine etkisinin araştırılması hedeflendi. Çalışmalar, hazırlanacak olan nanoyapılarda peptid ve metal iyonunun birlikte kullanımının glikoksidasyon sonucu gelişen protein farklanmalarının önlenmesinde kullanım potansiyellerinin belirlenmesinde temel oluşturmak amacı ile gerçekleştirildi.

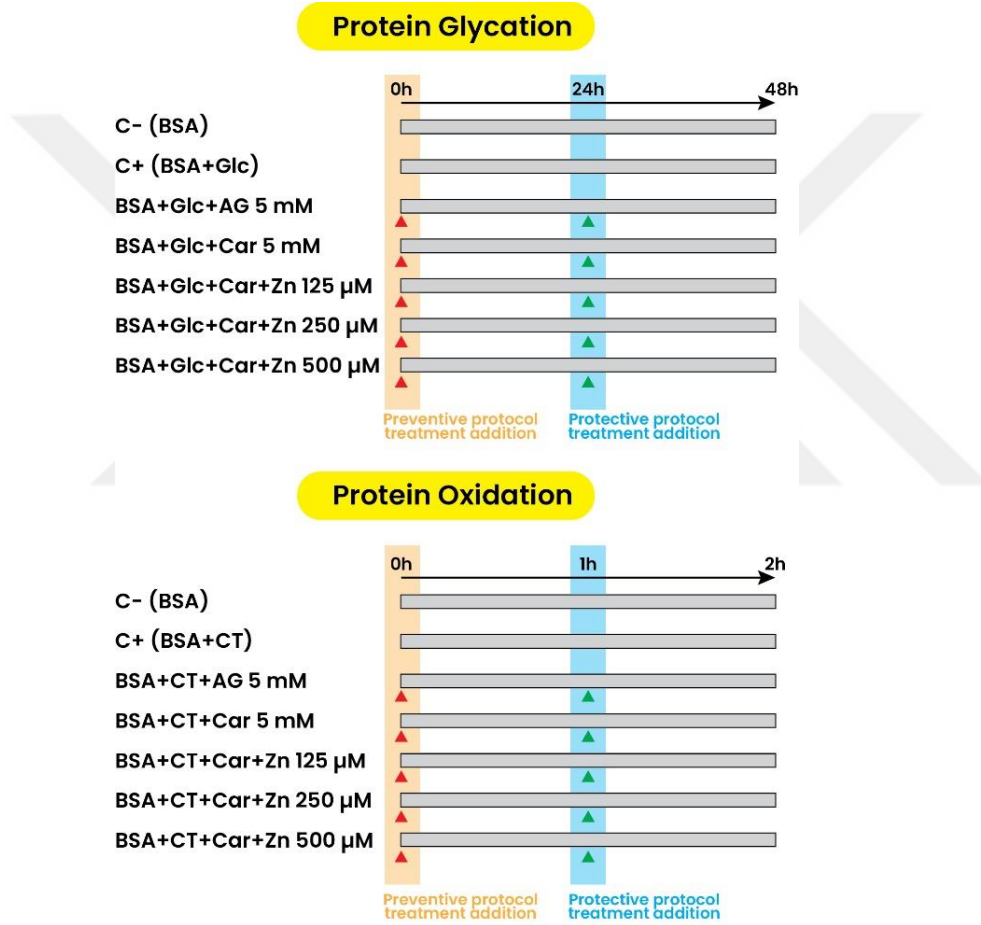
2.1.1 *In-vitro* Protein Glikasyon/Deglikasyon Modeli

Glikasyon/Deglikasyon etkisinin incelenmesi amacı ile tarafımızdan optimize edilen Matsuura ve ark. (2002) tanımladığı glikasyon modeli kullanıldı. Buna göre, 3 mL fosfat tamponu (0.1 M, pH7.4, %0.02 sodyum azit) içinde sığır serum albümini (BSA, 10 mg/mL) ve 0.5 M glukoz (Glc) ile 60°C'de 48 saat inkübe edildi. Başlangıçta, en uygun süreyi belirlemek amacıyla BSA veya BSA-Glc içeren iki set zamana bağlı bir glikasyon değerlendirilmesi için test edildi (1, 2, 3, 4, 5, 6, 18, 24, ve 48 saat). Oluşturulan model Glukoz-BSA *in vitro* glikasyon sisteminde deglikasyon etkisinin incelenmesi amacı ile hazırlanan peptid, metal ve peptid/metal farklı zaman aralıklarında ilave edilmesi ile test edildi Şekil 2.1. Test grupları;

- Karnosin (5 mM) ve farklı çinko konsantrasyonları (125, 250 ve 500 uM) içeren BSA-Glc,

- Her deney seti için negatif kontrol (BSA) ve pozitif kontrol (BSA-Glc),
- Bir referans anti-glikasyon molekülü aminoguanidin ile (BSA-Glc + AG).

Protokolün sonunda, bağlanmamış glukozyu elimine etmek için numuneler 24 saat boyunca fosfat tamponuna karşı diyalizlendi ve daha sonra, glikasyon ve agregasyon (AGE'ler, ditirozin ve β amiloid) belirteçlerinin belirlenmesi için porsiyonlanarak 4 °C de depolandı. Tüm deney setleri üç tekrarlı olarak çalışıldı.



Şekil 2.1. Karnosinin *in vitro* olarak deglikasyon ve protein oksidasyonuna etkileri üzerine çinko eklenmesinin incelenmesi için protokol tasarımı.

2.1.2 AGE ve ditirozin tayini

İleri glikasyon son ürünlerinin belirlenmesinde glikasyon sonrası AGE oluşumu florometrik ölçüm ($\lambda_{ex}=370$ nm'de uyarım ve $\lambda_{em}=440$ nm'de emisyon ölçümleri alınarak (Perkin Elmer Ltd., İngiltere) incelendi (Tupe ve Agte 2010). Ek olarak, ditirozin ($\lambda_{ex}=330$ nm/ $\lambda_{em}=415$ nm) AGE'lerle aynı koşullarda ölçüldü. % inhibisyon değerleri aşağıdaki formülasyona göre hesaplandı.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - [(\text{Numune floresan}/\text{C+ floresan}) \times 100].$$

Tüm örnekler üç tekrarlı olarak çalışıldı.

2.1.3 Çapraz β yapı ve yüksek molekül kütleli agregatların belirlenmesi

Glikasyonlu albümin örneklerindeki çapraz beta agregasyonu, Tiyo flavin T (ThT) florometrik yöntemi kullanılarak belirlendi (Tupe and Agte 2010). Örnekler (300 uL), 3 mL fosfat tamponu (0.1M, pH7.4) içinde ThT (64 uM) ile karıştırıldı ve 1 saat (oda sıcaklığında, karanlıkta) inkübe edildi. Örnekler florometrik olarak ($\lambda_{ex}=435$ nm ve $\lambda_{em}=485$ nm) değerlendirildi ve inhibisyon etkinlikleri AGE inhibisyon hesabı için kullanılan formüle göre belirlendi. Tüm örnekler üç tekrarlı olarak çalışıldı.

2.1.4 Protein oksidasyonu ve İleri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) Belirlenmesi

Protein oksidasyon analizi Grzebyk ve ark. tarafından gerçekleştirilen metotta bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi (Grzebyk and Piwowar 2016b). Kısaca, BSA (10 mg/mL) ve fosfat tamponunda (0.1M, %0.02 sodyum azit, pH 7.4) hazırlanan 20 mM kloramin T (CT) 37°C'de 2 saat çalkalamalı şekilde inkübe edildi. Protein glikasyonu protokolüne benzer şekilde, 5 mM karnosin ve farklı dozlarda çinko

sülfat (125, 250, 500 μ M) eklendi. Pozitif kontrol için BSA+CT, negatif kontrol için yalnızca BSA kullanıldı. AG (5 mM) referans molekül olarak kullanıldı. Örnekler, protein oksidasyonunu önleyici etkiyi test etmek için (preventive protocol) reaksiyon başlangıcında (sıfıncı an), tedavi edici etkiyi görmek için (curative protocol) reaksiyondan 1 saat sonra eklendi. Örnekler, inkübasyon sonrası fosfat tamponuna karşı 24 saat boyunca diyaliz edildi ve sonraki analizler için saklandı.

İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP, Advanced oxidation protein product) (Witko-Sarsat et al. 1996) tarafından gerçekleştirilen metoda göre analizlendi (Witko-Sarsat et al., 1996). Bunun için, mikropalakalara örneklerden 70 μ L eklendikten sonra sırasıyla 100 μ L fosfat tamponu, 20 μ L glasiyel asetik asit, 10 μ L, 1.16 M KI ve tekrar 20 μ L glasiyel asetik asit eklenerek 340 nm’de absorbans ölçüldü. Kloramin T ile oluşturulan standart grafik (0-10 μ M aralığında) yardımıyla hesaplamalar gerçekleştirildi. Tüm denemeler üç tekrarlı olarak çalışıldı.

2.1.5 İstatiksel Analiz

Çalışmadaki sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde verildi. İstatiksel çalışma Student’s t-test (GraphPad Prism 5.0, California) kullanılarak gerçekleştirildi. P değeri 0,05’in altında ($p<0.05$) bir değer ise karşılaştırma sonucu istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

2.2 2. Bölüm: Karnosin Enkapsüle Edilmiş Niozomların Sığır Serum Albümin Modifikasyonları Üzerine Etkisi

2.2.1 Niozomların hazırlanması

Niozomlar, ince film yöntemi kullanılarak hazırlandı (Barlas ve ark. 2016). Kısaca, Span 60 ve kolesterol (20 mM), 1:1 molar oranda hazırlanarak kloroform/metanol (2:1 v/v) karışımı içinde çözüldü. Daha sonra çözücü, ince bir lipid filmi oluşturmak üzere döner bir buharlaştırıcı (Buchi R-3, İsviçre) kullanılarak uzaklaştırıldı. Karnosin yüklü niozomlar (CarNIO) elde etmek için elde edilen ince film 50 mM karnosin içeren pH 7.4, 60°C'de 10 mL PBS ile hidrasyona tabi tutuldu. Lipid tabakası daha sonra sulu çözelti ile dağıtıldı ve ultrasonik bir banyoda (Sonics & Materials Inc. ABD) sonike edildi. Enkapsüle edilmiş karnosini elde etmek için hazırlanan preperat PBS ile üç yıkamanın ardından 7000g'de 30 dakika santrifüjlendi. Elde edilen niozom pellet PBS ile süspanse edilerek +4°C'de muhaza edildi.

2.2.2 Niozomların Karakterizasyonu

Niozomların boyutları, dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi (DLS, Malvern Zetasizer, Nano ZS modeli, Malvern Instruments Ltd., UK) ile üç tekrarlı çalışarak belirlendi.

Niozomlardaki enkapsüle edilen karnosin miktarı, 205 nm dalga boyunda amid bağı (peptid bağı) ölçümüne dayalı karnosin standartı kalibrasyonları kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile belirlendi. Enkapsülasyon etkinliği, başlangıçta eklenen karnosin miktarından enkapsülasyon sonrası serbest karnosin miktarının çıkarılması ile hesaplandı;

EE% (Enkapsülasyon Etkinliği) = [(Başlangıç karnosin miktarı – serbest karnosin miktarı) /Başlangıç karnosin miktarı] *100.

2.2.3 Niozomlardan karnosin salınımının incelenmesi

Niozomlardan karnosinin *in vitro* salımı, diyaliz yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bilinen miktarlarda niozom formülasyonları, diyaliz torbalarına alınarak PBS'ye (pH7.4) karşı 100 rpm'de, 37°C'de 24 saat karıştırılarak diyalizlendi. Farklı zaman aralıklarında örnekler alınarak salınan karnosin miktarı hesaplandı.

2.2.4 Niozomların fiziksel kararlılığının belirlenmesi

Karnosin yüklü niozomların stabilitesi, 30 gün boyunca 4°C'de ve oda sıcaklığında (RT) saklanarak izlendi. Örneklerin karnosin içeriği her beş günde bir DLS analizi yoluyla test edildi.

2.2.5 *In vitro* glikoksidasyon ve agregasyonun belirlenmesi

Karnosin enkapsüle edilmiş niozomal preparatların deglikasyon, AGE oluşumunun inhibisyonu ve protein oksidasyonu vb. ile ilişkili tüm biyolojik etkinlikler 1. Bölümde detaylı olarak verildi. Bu kısımdaki tek fark deneylerin karnosin enkapsüle niozomlar ile gerçekleştirilmesidir.

2.2.6 Karnosin-BSA etkileşiminin *In silico* değerlendirilmesi

Agregasyona yatkın bölgelerin tahmini

Son yıllarda, bir proteinin primer yapısının agregasyon bölgelerini tahmin etmek için hesapsal tabanlı birçok yöntem geliştirilmiştir. Buradaki temel amaç farklı hesaplama formülleri ve logaritmalarını izleyerek agregasyona (sıcak noktalar) karşı oldukça hassas olan amino asit kalıntılarını bulmaktır. Bu hesaplamalar, *in vivo* verilere, sekonder yapılar, bazı amino asitlerin spesifik modellerine ve agregasyon eğilimlerine ve konformasyonel enerjiyle ilgili fizikokimyasal

özelliklere dayanmaktadır (Hamodrakas et al. 2007; Lopez de la Paz and Serrano 2004; Zhang et al. 2007). Çalışmanın bu kısmında mevcut birçok çevrimiçi araçtan Aggrescan 3D, (Conchillo-Sole et al. 2007), AmylPred (Frousios et al. 2009) ve Tango (Fernandez-Escamilla et al. 2004) BSA'daki olası agregasyon bölgelerinin gösterilmesi için seçildi. TANGO sistemi, sıcaklık, pH ve tampon konsantrasyonu gibi farklı deneysel koşulları dikkate alan özelleştirilebilir bir sistemdir. Böylece simülasyon, *in vitro* deneylerde kullanılan aynı parametrelerde (0.1M, pH7.4, 50°C) gerçekleştirildi. Diğer yandan AmylPred, agregasyona meyilli konsensüs dizisini tahmin etmek için Aggrescan ve Tango dahil olmak üzere çeşitli araçlar içermektedir.

Karnosin / BSA ‘‘Molecular docking’’

Çalışmanın bu kısmında Autodock Vina programı kullanıldı (Trott and Olson 2010). Karnosin, AG ve BSA protein kristal yapıları sırasıyla PubChem ve Protein Veri Bankası'ndan (PDB) elde edildi ve pdbqt formatlanmış formatlar Discovery Studio 2019 ve Autodock için MGL araçları kullanılarak elde edildi. BSA monomeri (PDB: 3V03) (Majorek et al. 2012) ‘‘docking’’ hesaplamaları için kullanılarak ve tüm yapıyı kapsayacak şekilde model oluşturuldu. Autodock Vina hesaplamalarına göre en düşük bağlanma enerjisi ile BSA'ya en iyi bağlanan ilk 10 yapıyı elde etmek için yapılan çalışma sonunda elde edilen moleküler grafikler Discovery Studio 2019 programı kullanılarak oluşturuldu (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego).

2.2.7 İstatiksel Analiz

Çalışmadaki sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde verildi. İstatiksel çalışma Student's t-test (GraphPad Prism 5.0, California) kullanılarak gerçekleştirildi. P değeri 0,05'in altında ($p < 0.05$) bir değer ise karşılaştırma sonucu istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

2.3 3. Bölüm: Glutasyon (GSH) Yüklü Niozomlar ve Kaprolakton/Laktid Polimerzomları ile Protein Glikoksidasyonunun Önlenmesi

2.3.1 GSH yüklü Niozomların hazırlanması (GSH-NIO)

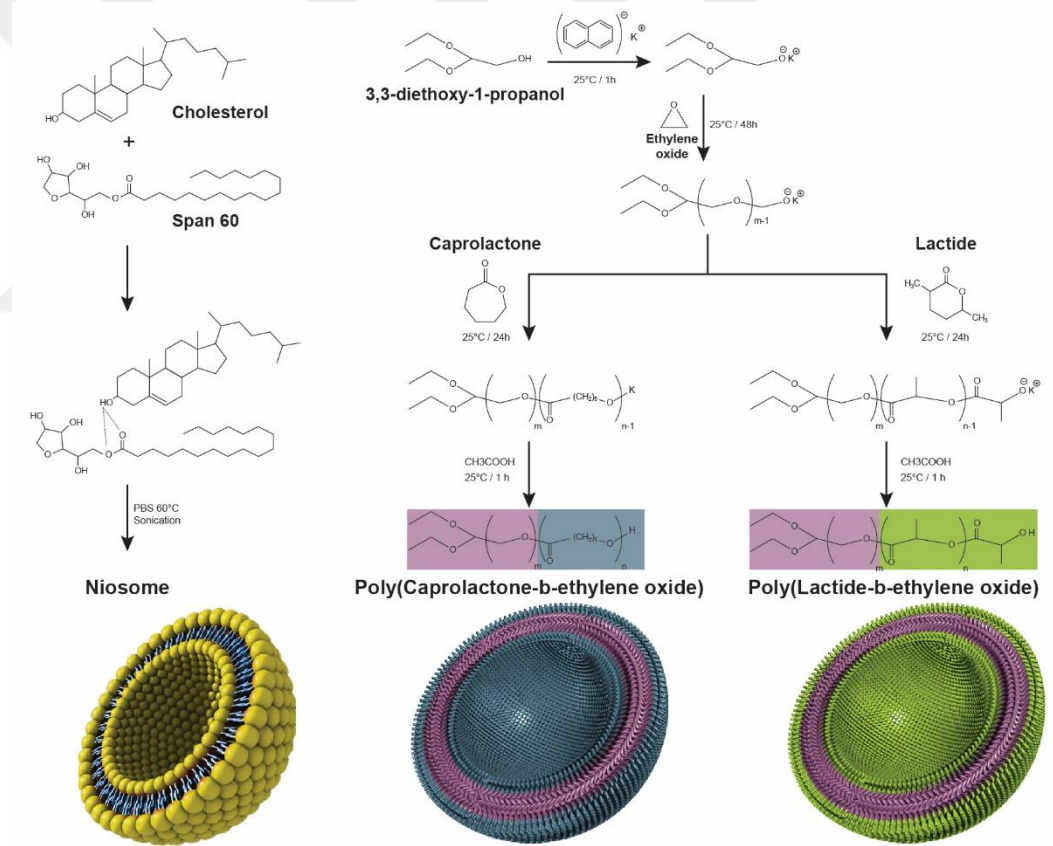
GSH'ın niozomlara enkapsülasyonu ince film tabaka yöntemi uygulanarak daha önceki protokolümüze göre gerçekleştirildi (Moulahoum et al. 2019). Bu kapsamda, ince lipid tabakaları oluşturmak için, eşit miktarda (20 mM) kolesterol ve Span 60 içeren sulu çözelti kloroform/metanol (2:1, v/v) ile karıştırıldı ve rotary evaporatörde (Buchi R-3, Switzerland) sıvı kısım uçuruldu. Oluşan filmlerin hidratasyonu PBS (0.1M, pH7.4, 60°C) ile sağlanarak boş niozomlar oluşturuldu. GSH yüklü niozomları (GSH-NIO) PBS yerine bir GSH çözeltisi (20 mg/mL, PBS 0.1M içinde, 60°C'de pH 7.4) ince film tabakasına aynı şekilde eklenerek niozomların oluşması sağlandı. Preparatlar güçlü bir şekilde 5 dakika vortekslendikten sonra 1 saat boyunca sonik banyoda tutularak nano ölçekte niozomların oluşması sağlandı. Solüsyon daha sonra 7000g'de 30 dakika santrifüjlendi. Elde edilen GSH yüklü niozomal pellet PBS ile süspanse edilerek +4°C'de muhaza edildi.

2.3.2 GSH yüklü polimerzomların hazırlanması(GSH-LAC ve CAPRO)

Block polimer sentezi

GSH yüklü polimerzom sentezinde başlıca 2 kimyasal kullanıldı. Bunlar; GSH yüklü laktid polimerzoma (GSH-LAC) elde edilen poli(laktid-b-etilen oksit); ve GSH-CAPRO'yu eldesinde kullanılan poli(kaprolakton-b-etilen oksit). Polimerzomlar, bir inisiyator olarak etilen oksit ve 3,3-dietoksi-1-propanol kullanıldığı sıralı anyonik halka açılma polimerizasyonu ile oluşturuldu (Scholz et

al. 1995). Kısaca, 3-dietoksipropanol (1 mmol), potasyum naftalin (1 mmol) ile 1:23 oranında (v/v) karıştırıldı ve çözelti, 20 mL THF'a ilave edildi. 10 dakika karıştırıldıktan sonra 10 mL etilen oksit (200 mmol) eklendi. Viskoz açık kahverengi bir çözelti verecek şekilde 48 saat için bekletildi. 1.5 mL potasyum naftalin, solüsyon yeşile dönene kadar karışıma ilave edildi. Yeşil çözeltiye THF (2.5M) içinde çözölmüş 20 mL laktit veya kaprolakton (50 mmol) ilave edildi ve 90 dakika boyunca polimerizasyon için bırakıldı. Daha sonra polimer, soğuk 2-propanol ile çöktürülerek 2 saat -20°C 'de bekleme sonrasında 4500g'de 25 dakika santrifüjlendi. Polimer benzen içinde liyofilize edildi. Kaprolakton ve laktit blok oluşumu için reaksiyon adımları Şekil 2.2 verildi.



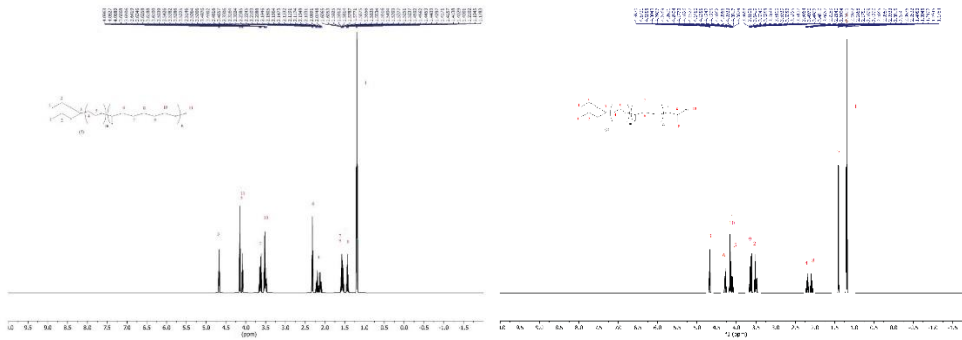
Şekil 2.2 Farklı nanotaşıyıcılar (nizomlar, polikaprolakton polimerler, polilaktid polimerler) için sentez reaksiyonu.

Misel oluşumu

Boş polimerzomlar elde etmek için 15 mg kaprolakton veya laktit blokları 1 mL DMA içinde çözüldü ve 24 saat 4 mL PBS ile karıştırıldı. GSH-CAPRO veya GSH-LAC, PBS yerine PBS içinde çözülmüş 65 mg/mL GSH kullanılarak boş polimerzomlar ile aynı şekilde hazırlandı. Son olarak karışımlar, 24 saat PBS'ye karşı diyaliz edildi.

2.3.3 Karakterizasyon ve Enkapsülasyon Etkinliği

Niozomlar ve polimerzomların boyutu, zeta potansiyeli ve PDI, dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi (Nano ZS Malvern Zetasizer, Malvern Instruments Ltd., UK) ile belirlendi. Ölçümler üç tekrarlı yapıldı. Yapılandırılan polimerzomların nükleer manyetik rezonansı (^1H -NMR) alınarak elde edilen veriler Şekil 2.3 de verildi. Ek olarak, farklı nanotaşıyıcıların morfolojisini doğrulamak için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı (Thermo Scientific Apreo S, Holland).



Şekil 2.3. Kaprolakton bazlı (solda) ve laktit bazlı (sağda) polimerzomların HNMR analizi.

GSH-NIO, GSH-CAPRO ve GSH-LAC'ın kapsülleme verimliliği, GSH miktar ölçümüne dayalı spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Niozom ve polimerzom formülasyonlarının santirifüj ve diyaliz sırasında alınan örneklerdeki glutatyon

miktarı başlangıca kıyasla modifiye Ellman yöntemi ile mikro plaka okuyucuda (Thermo Multiskan FC) GSH standart eğrisi kullanılarak belirlendi (Ellman 1959).

EE% (Enkapsülasyon Etkinliği) = $\frac{[(\text{Başlangıç GSH miktarı} - \text{serbest GSH miktarı}) / \text{Başlangıç GSH miktarı}] * 100}{}$.

2.3.4 GSH Salınım profilinin incelenmesi

GSH salınımının *in vitro* analizi, diyaliz yöntemi kullanılarak incelendi. Farklı formülasyondaki (nizom, polimerzom) GSH konsantrasyonları, aynı konsantrasyona (10 mg/mL) seyreltildi. Çözeltiler diyaliz torbalarına alınarak 20 mL PBS (pH7.4 veya pH5.5) içine daldırıldı. Diyaliz ortamı 100 rpm'de, 37°C'de 24 saat karıştırıldı. Farklı zaman aralıklarında 1 mL örnek alınarak aynı hacimde taze tampon (37°C) ile değiştirildi. Salınan GSH miktarı, yüklenen konsantrasyon (nizomlardaki ilk kapsüllenmiş miktar) dikkate alınarak belirlendi.

2.3.5 Nizomların ve polimerzomların fiziksel kararlılıkları

GSH yüklü nizomların ve polimerzomların stabilitesi, 30 gün boyunca 4°C'de ve oda sıcaklığında (RT) saklanarak izlendi. Örneklerin GSH içeriği her beş günde bir DLS analizi yoluyla test edildi.

2.3.6 Kritik Misel Konsantrasyonunun (CMC) belirlenmesi

Kritik misel konsantrasyonu (CMC) piren (pyren) kullanılarak florometrik olarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda piren (8×10^{-8} M'lik son konsantrasyon) kloroform içinde hazırlandı ve tüm tüpler tamamen kuruyana kadar buharlaşmaya bırakıldı. Her bir tüpe 4 mL örnekler ilave edildi ve dengeye ulaşılması için oda sıcaklığında karıştırıldı. 300-370 nm eksitasyon aralığı ve 395 nm emisyon dalga boyu (2.5 nm slit) ile her bir örnek için floresan yoğunlukları kaydedildi.

2.3.7 *In vitro* hücre toksisitesi (MTT Testi)

İnsan rahim ağzı adenokarsinom hücreleri (Human cervix adenocarcinoma cells; HeLa, ATCC® CCL-2™, ABD) ve glioblastoma hücreleri (U87, ATCC® HTB-14™, ABD), tüm nanotaşıyıcı yapıların toksisitesinin analizi için kullanıldı. (Puglisi et al. 2019). Farklı hücreler kültür ortamında [Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Merck, Almanya), %10 (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Cegrogen, Almanya), %1.0 (h/v) sodyum piruvat. (Biochrom, Almanya), 100 U/mL penisilin ve 100µg/mL streptomisin (Biochrom, Almanya)] %5 CO₂, 37°C'de, nemlendirilmiş bir inkübatörde kùltive edildi. Belirli bir çoğalma sonrası 96 oyuklu bir plakada (beş kopya) 104 hücre/oyuk olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat sonra ortam, EMEM ortamında (6.5-400 ug/mL) hazırlanan farklı konsantrasyonlarda niozomlar ve polimerzomlar ile değıştirildi.

Hücre toksisitesinin belirlenmesinde MTT testi kullanıldı (Mosmann 1983). nanotaşıyıcılarla muameleden 24 saat sonra ortam, %10 (v/v) 5 mg/mL MTT çözeltisi ile karıştırılmış FBS içermeyen EMEM ortamı ile değıştirildi. Hücre kùltürü koşullarında 4 saatlik inkübasyondan sonra, ortam uzaklaştırıldı ve her oyuk için 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO, Merck, Almanya) ilave edildikten sonra formazan kristalleri çözündürüldü. Plaka okuyucuda 570 nm'de absorbanslar okundu ve sonuçlar, işlenmemiş hücrelere kıyasla canlı hücrelerin yüzdeleri olarak ifade edildi.

2.3.8 *In vitro* glikoksidasyon ve agregasyonun belirlenmesi

Serbest GSH, GSH enkapsüle edilmiş niozomların (GSH-NIO), ve polimerzomların (GSH-CAPRO ve GSH-LAC) deglikasyon, AGE oluşumunun inhibisyonu ve protein oksidasyonu vb. ile ilişkili tüm biyolojik etkinlikler 1. bölümde detaylı olarak verildi. Bu kısımdaki tek fark deneylerin GSH enkapsüle niozomlar ve polimerzomlar ile gerçekleştirilmesidir.

2.3.9 İstatiksel analizler

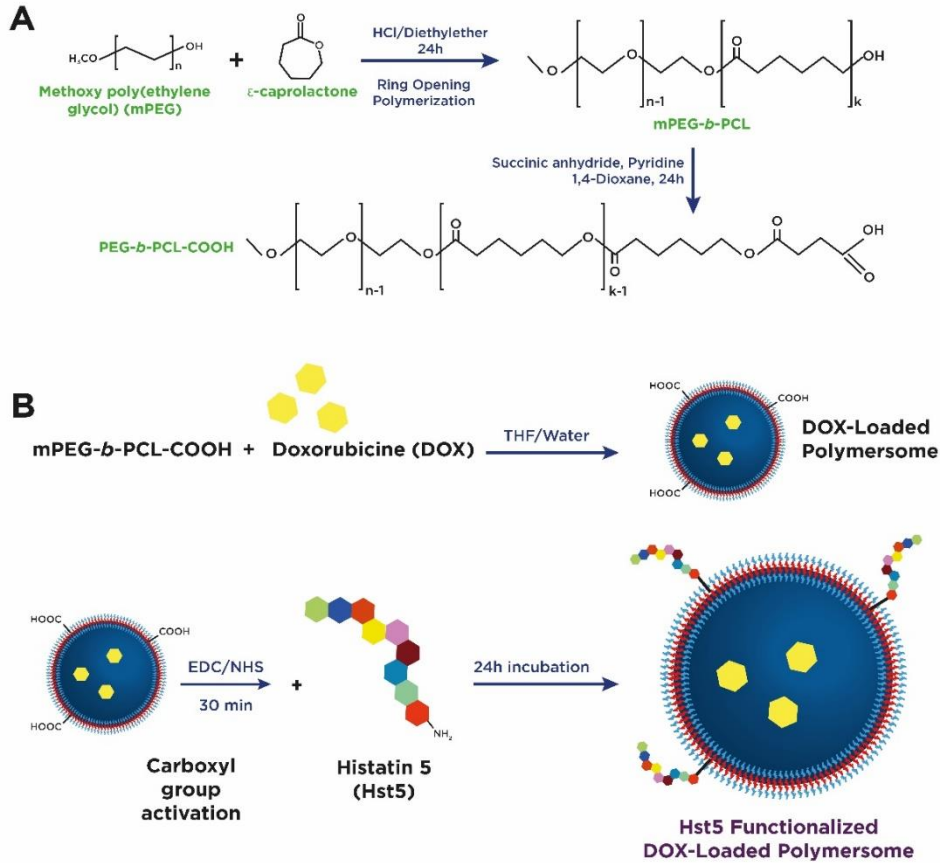
Çalışmadaki sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde verildi. İstatiksel çalışma Student's t-test (GraphPad Prism 5.0, California) kullanılarak gerçekleştirildi. P değeri 0,05'in altında ($p < 0.05$) bir değer ise karşılaştırma sonucu istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.



2.4 4.Bölüm: Teranostik Polimerzom; Hedeflenmiş-Akıllı İlaç Taşınımı İçin Histatin 5 ve Doksorubisin İçeren Metoksi PEG-b-poli kaprolakton Polimerinin Hazırlanması

2.4.1 Teranostik polimerzom hazırlanması

Bu çalışma kapsamında teranostik polimerzomun hazırlanmasında sırasıyla gerçekleştirilen adımlar; metoksi poli(etilen glikol)-b-poli (kaprolakton) iki bloklu kopolimerlerin (mPEG-b-PCL) oluşumu, kopolimere DOX enkapsülasyonu ve yüzeydeki iki bloğun karboksil gruplarının Hst5'i bağlamak için aktive edilmesi olarak özetlenebilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. pH duyarlı histatin 5 (Hst5) ile fonksiyonlanmış DOX ile yüklü teranostik polimerin sentezinin gösterimi (A) iki bloklu kopolimer sentez adımları (B) enkapsülasyon ve fonksiyonlama.

mPEG-b-PCL Diblok kopolimer sentezi

Sentez işlemi, Kim ve arkadaşları tarafından açıklanan teknik izlenerek gerçekleştirildi (Kim et al. 2004). 0.812 g (0.4 mmol) mPEG ($M_n = 2000$), 30 mL toluen ile karıştırıldı. Su ve toluen kalıntısını ortamdaki uzaklaştırmak için distile edildi. mPEG, 2.5 mL CH_2Cl_2 içinde süspanse edilerek 0.589 g (0.8 mmol) kaprolakton (CL) ilave edildi ve 24 saat süreyle $25^\circ C$ 'de inkübe edildi. Polimeri çöktürme amacı ile karışımın üzerine n-Heksan ilave edildi ve dekante edildi. Polimer tekrar CH_2Cl_2 içinde süspanse edilerek süzüldü. Buharlaştırılarak konsantre edildikten sonra vakum altında kurutuldu.

mPEG-b-PCL'un karboksilasyonu

mPEG-b-PCL'nin hidroksil gruplarının karboksilasyonu, bir katalizör olan DMAP varlığında süksinik anhidrit kullanılarak gerçekleştirildi (Kang et al. 2013). MPEG-b-PCL, süksinik anhidrit ve DMAP (1:2:1 w/w) 10 hacim 1,4-dioksan içinde çözüldü ve reaksiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 24 saat bırakıldı. mPEG-b-PCL-COOH, heksan/eter karışımı (1:1 v/v) ile üç kez çöktürüldükten sonra kurutuldu.

Polimerzomlara Doksorubisin enkapsülasyonu

Polimerzomlara DOX enkapsülasyonu Scarpa ve arkadaşlarının kullanmış olduğu yöntem ile gerçekleştirildi (Scarpa et al. 2016). Karboksilik ile modifiye edilmiş PEG-b-PCL (6.0 mg), 400 uL dimetilformamid (DMF) içinde tamamen çözünene kadar ultrasonik banyoda bekletildi. 0.5 M Doksorubisin çözeltisi %10 DMF içeren 0.1 M fosfat tamponunda (PBS) hazırlandı ve karıştırılarak polimer çözeltisi damla damla ilave edildi. Örnek karışımı, 24 saat boyunca (4 kez tampon değişimi) PBS'ye karşı diyalizlendi. Ortamdaki serbest kalan doksorubisini uzaklaştırmak için santrifüjlenerek elde edilen kırmızı-bordo çökelek liyofilize edildi.

Polimerzomlara Histatin 5 konjugasyonu

Histatin 5 konjugasyonunda ilk olarak EDC/NHS kimyası kullanılarak polimerzomun karboksil grubunun aktivasyonu gerçekleştirildi (Dieu et al. 2014). Bu amaçla, 1.0 mL polimerzom (10 mM MES tamponunda 10 mg/mL, pH 4.5), eşit hacimlerde (2.5 uL) EDC (8.0 mg/mL) ve NHS (22 mg/mL) ile karıştırıldı ve 30 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Polimerzomun Histatin 5 ile biyo-konjugasyonu 1000:1 oranında hazırlandı. EDC/NHS ile aktive edilmiş polimerzom, Hst5 (PBS içinde, 10 mM, pH 7.4) ile karıştırıldı ve gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Bağlanmayan peptitler, santrifüj ile uzaklaştırıldı ve bağlanan peptid miktarları spektrofotometrik olarak belirlendi.

2.4.2 Teranostik polimerzomun karakterizasyonu

Farklı nanoyapıların karakterizasyonu amacı ile ¹H-NMR (Varian Mercury-plus/AS-400), FTIR-ATR (Spectrum Two FT-IR Spektrometresi-PerkinElmer), Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Thermo Scientific Apreo S) ve Dinamik ışık saçılması (DLS) (Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments) gibi sistemlerin standart protokolleri kullanıldı. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), polimerzomun relatif moleküler ağırlığını (MW) tanımlamak için kullanıldı.

2.4.3 Enkapsülasyon Etkinliğinin belirlenmesi

DOX'un enkapsülasyon verimliliği (% EE), diyalizatta ve süpernatanda bulunan kapsüllenmemiş DOX'un floresan ölçümü ile belirlendi. Hazırlanan DOX standart eğrisi (0.01-0.5 mg/mL) ($y = 0.3303x + 0.0354$; $R^2 = 0.9983$) kullanılarak örneklerdeki DOX miktarları hesaplandı.

$$\% EE [(toplam \ ila\c - kaps\ulenenmemi\c)/toplam \ ila\c]*100$$

2.4.4 pH-Duyarlılığı ve salınım profilinin incelenmesi

Hazırlanan teranostik polimerzomların pH ya bağlı ilaç salınımları fizyolojik koşullar (pH 7.4) ve asidik koşullar (pH 5.5) için analiz edildi. 1.0 mg/mL DOX içeren polimerzomlar diyaliz torbalarına alınarak 15 mL fosfat tamponu (50 mM) (fizyolojik ve asit koşulları) içine daldırıldı. 37°C'de 24 saat boyunca belirli aralıklarla 1.0 mL örnek alındı ve aynı hacimde taze PBS (37°C) ortama ilave edildi. DOX konsantrasyonları, önceden belirlenmiş bir standart eğri ($y = 7.5228x - 0.0244$; $R^2 = 0.9955$) kullanılarak hesaplandı. Maksimum salıma ulaşmak için gerekli sürenin belirlenmesinden sonra, daha önce açıklanan koşullara benzer şekilde ilave pH ortamları (pH 5.5, pH 6, pH 6.5, pH 7, pH 7.5) test edildi ve ilaç içeriği 4. saatte ölçüldü.

2.4.5 Cell culture *In vitro* hücre toksisitesi (MTT Testi)

Hem serbest DOX'un hem de farklı polimerzom formülasyonlarının sitotoksitesinin analizi için insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7, ATCC® HTB-22™, ABD) kullanıldı (Ghorbanizamani et al. 2020). *In vitro* toksisite testlerinde izlenen yöntem 3. Bölümde detaylı olarak verildi. Bu bölümde test edilen örnekler sırasıyla kontrol mPEG-*b*-PCL, mPEG-*b*-PCL/DOX ve mPEG-*b*-PCL/DOX/Hst5 olarak verilebilir.

2.4.6 İstatiksel Analizler

Çalışmadaki sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma (SD) şeklinde verildi. İstatiksel çalışma Student's t-test (GraphPad Prism 5.0, California) kullanılarak gerçekleştirildi. P değeri 0,05'in altında ($p < 0.05$) bir değer ise karşılaştırma sonucu istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 1.Bölüm: Metal İyonu Peptid Etkileşiminin Proteinlerin Glikoksidasyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

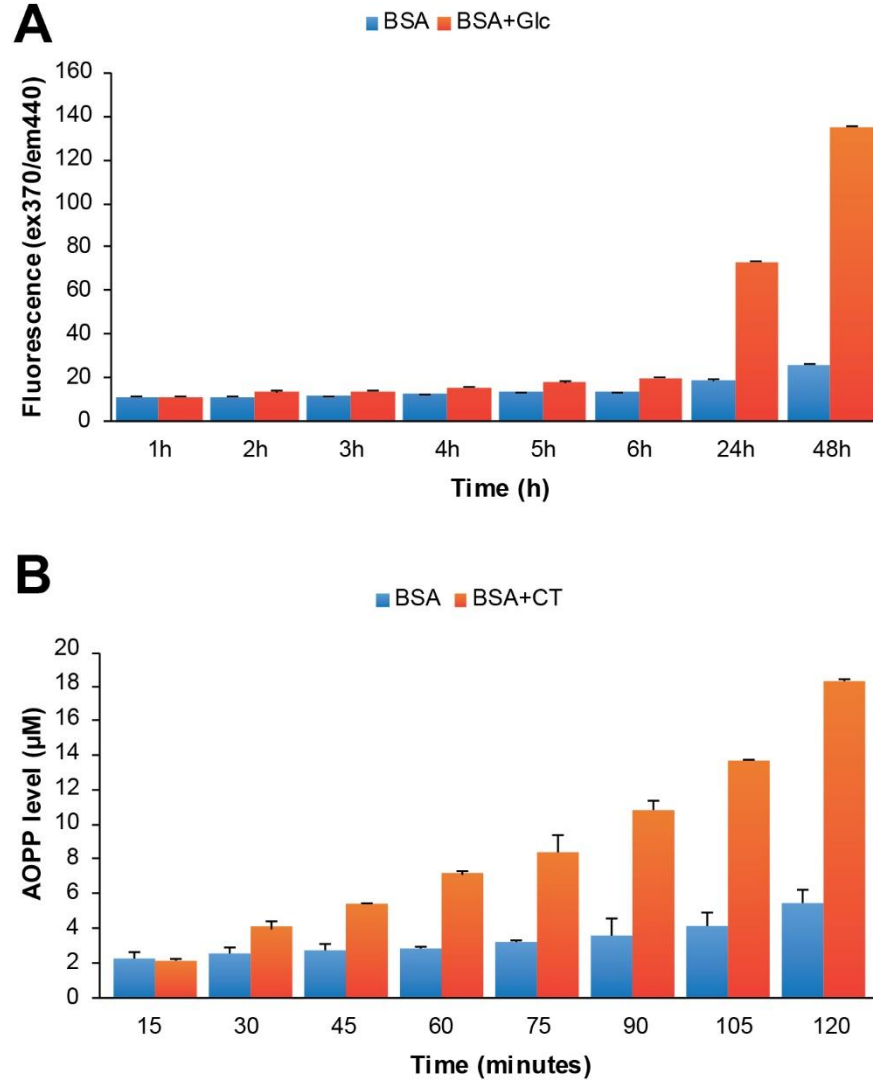
Geçiş metalleri ile karnosin metal kompleksleri, önemli farmakolojik uygulamaları nedeniyle incelenmiştir (Matsukura and Tanaka 2000). Ülserlere, mukozal lezyonlara ve *Helicobacter pylori* ile ilişkili gastrite karşı koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilen bir çinko-karnosin kompleksi sentezlenerek Polaprezinc veya Z-103 adı ile ticarileştirilmiştir (Mineo et al. 2002; Torreggiani et al. 2000).

Diğer yandan, protein glikasyonu ve agregasyonunun önlenmesinde çinko veya karnosinin etkisini inceleyen çalışmalar rapor edilmekle birlikte (Moulahoum et al. 2019; Tupe and Agte 2010) çinko karnosin kombinasyonunun, istenmeyen protein glikoksidasyonunu önleyici veya tedavi edici etkiye sahip olup olmadığına ilişkin çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle, çalışmanın bu bölümünde, farklı çinko konsantrasyonları (125, 250 ve 500 μ M) ile takviye edilmiş karnosinin kullanımının proteinlerin glikoksidasyonları üzerine etkisinin araştırılması hedeflendi.

Bu amaçla *in vitro* glikasyon ve oksidasyon modelleri oluşturularak standardize edildi. Sonrasında ise ileri glikasyon son ürünleri (AGE'ler) ve İleri Oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP'ler) analizleri tanımlanan zaman aralıklarında gerçekleştirildi. Elde edilen veriler 48 saatlik inkübasyon sırasında AGE'lerde zamana bağlı bir artışın olduğu ve 24 saat ile 48 saat arasında ise neredeyse ikiye katlandığı görüldü. Bu nedenle, AGE oluşumunun inhibisyon çalışmalarında değişimin kolay izlenebilmesi için 24 saat inkübasyon koşulu seçildi. Benzer şekilde, AOPP seviyelerinin de zamana bağlı artışın lineer olduğu görüldü, ve 1 ile 2 saatlik ölçümlerde gözlenebilir sonuçlar elde edildiği için bu protokol için 1 saatin uygun olduğu düşünüldü (Şekil 3.1).

Birçok doğal ve sentetik molekülün protein glikoksidasyon sonrasındaki yapısal değişikliklerin incelenmesinde genellikle AGE'lerin ve AOPP'lerin artışının

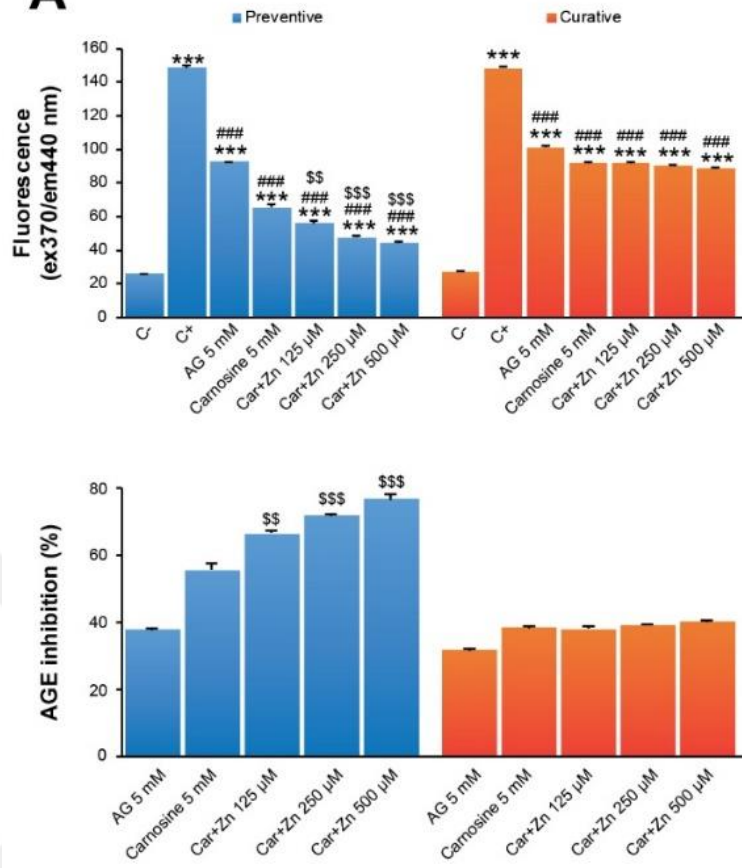
izlenmesinde bu deneysel model kullanılmaktadır (Grzebyk and Piwowar 2016b; Tupe et al. 2017).

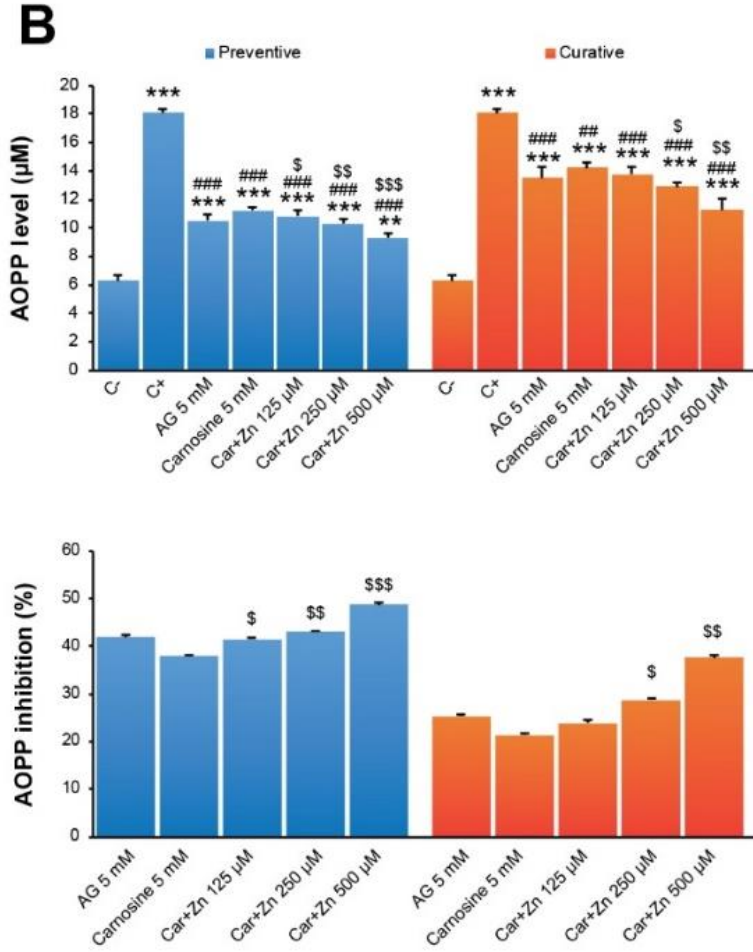


Şekil 3.1. Protein glikoksidasyon modellerinin incelenmesinde zaman etkisi (A) AGE oluşumu, (B) AOPP oluşumu.

Glikasyon sonucunda, protein agregasyonu ve oksidasyonu dışında çeşitli modifikasyonlar gerçekleşir. Bu değişiklikler, farklı bakış açıları ile hem *in vitro* hem de *in vivo* bulunabilen tiyol grupları, fruktozaminler ve protein karbonilleri vb. aracılığıyla izlenebilir (Awasthi and Saraswathi 2016; Aydın et al. 2018; Grzebyk and Piwowar 2016b; Tupe et al. 2017).

Daha önce karnosin (2.5, 5 ve 10 mM) ve aminogüadin'in (5 mM) BSA glikasyonu, agregasyonu ve oksidasyonunu azaltma üzerindeki etkisi tarafımızdan incelenmişti (Moulahoum ve diğeri 2019). Ancak, karnosinin *de novo* protein değişimini önleyip önlemediği veya değiştirilmiş proteinleri düzeltip düzeltmediği konusunda açıklamalar yeterli değildi. Ayrıca, bir histidine sahip olan dipeptidin yapısı ve karnosinin metal şelatlama kapasitesi göz önüne alındığında, iki değerlikli bir geçiş metalinin eklenmesinin aktivitesini etkileyeceğini düşünerek bu çalışmada, hem önleyici (protein modifikasyonu indüksiyonu sırasında) hem de iyileştirici (post indüksiyon) farklı protein modifikasyon modelleri üzerinde çeşitli çinko konsantrasyonlarına (125, 250, 500 µM) ek olarak karnosinin etkisi araştırıldı. Elde edilen veriler çinko ilavesinin AGE'leri, AOPP'leri, agregasyon seviyelerini azaltarak her iki protokol grubunda doza bağlı bir şekilde karnosin aktivitesinde bir artışa neden olduğunu gösterdi (Şekil 3.2). Bu sonuçlar çinko karnosin kombinasyonunun yaşa bağlı protein değişikliğine karşı önleyici bir engelleyici etki gösterdiğini göstermektedir.

A



Şekil 3.2 Karnosin ve çinko ile muamele edilmiş bir BSA protein modifikasyon modelinde AGE'lerin (A) ve AOPP'lerin (B) belirlenmesi ile protein modifikasyonunun değerlendirilmesi. **p<0.01 ve ***p<0.001 - C⁻, ##p<0.01 ve ###p<0.001 - C⁺, \$p<0.05, \$\$p<0.01 ve \$\$\$p<0.001 karnosine karşı 5 mM.

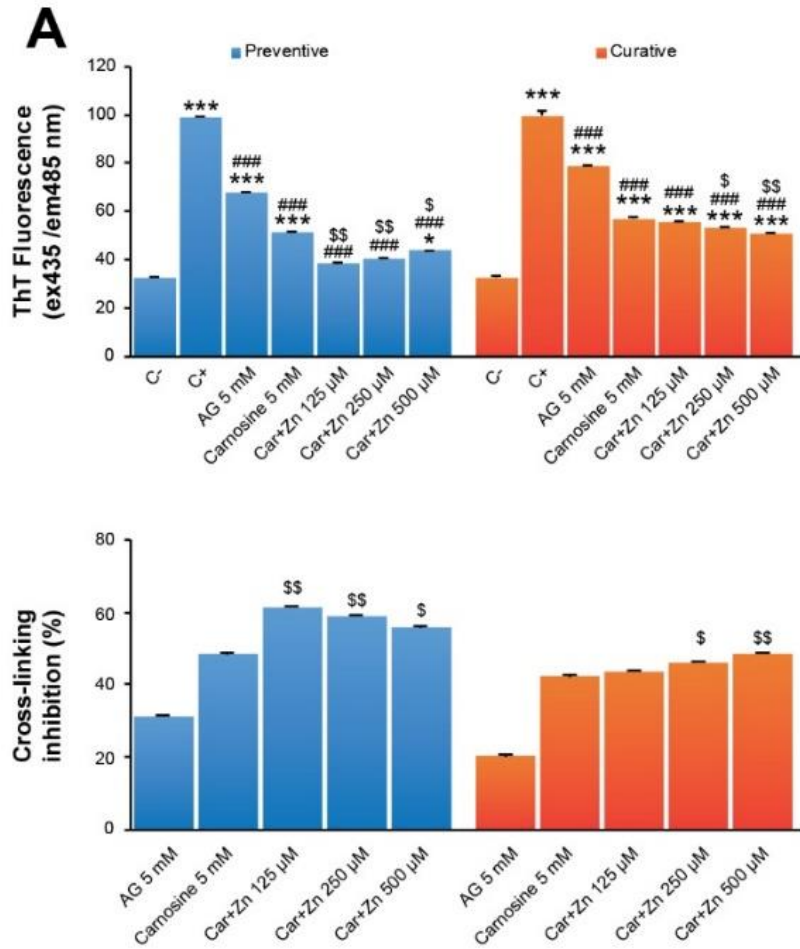
Çinko 300'den fazla enzimin kofaktörü olarak önemli bir metal olup ve seviyeleri hücredeki birçok biyolojik mekanizma ile ilişkilidir. Seviyelerinin bozulması, diyabet gibi hastalıklarda zararlı etkilere neden olur. Diyabetik hastalarda çinko metabolizması muhtemelen glikasyon sonrası proteinlerin yapı-fonksiyon kaybına bağlı olarak olumsuz etkilenir. Şeker hastalarına çinko ilavesinin faydalı olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, raporlar çinkonun tek başına protein modifikasyonlarını azaltabileceğini göstermiştir (Taylor 2005; Tupe et al. 2015).

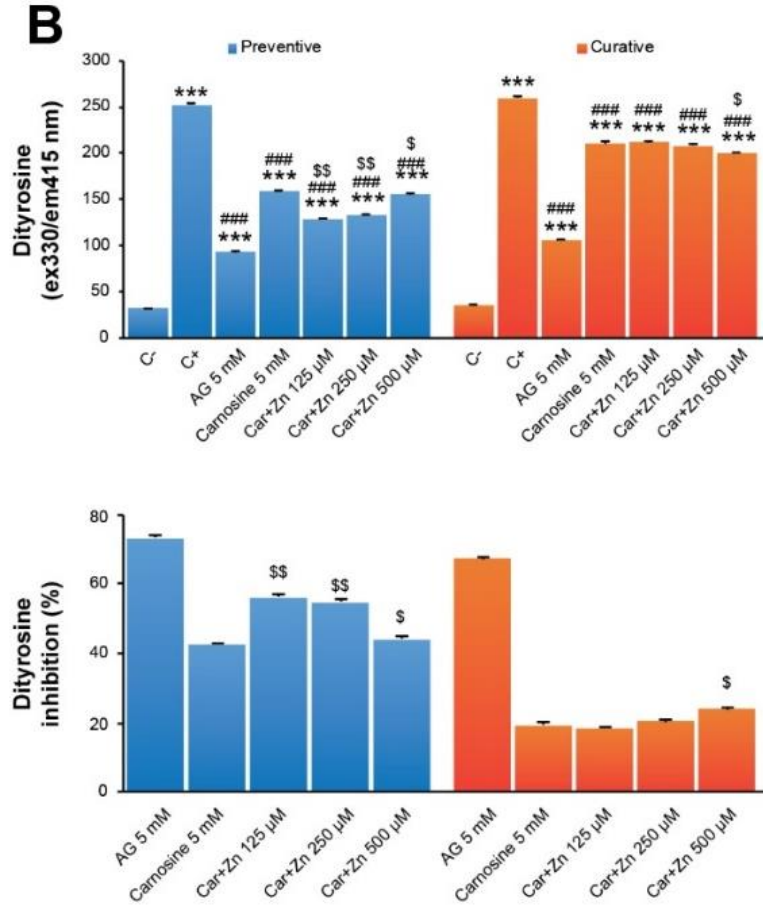
İnsan serum albümini üzerinde yapılan araştırmalar ile beş potansiyel çinko bağlanma bölgesi belirlenmiştir. Bu bölgelerde esas olarak histidin, asparagin ve aspartat üzerinden kompleks oluştuğu gösterilmiştir (Stewart et al. 2003). Glikasyon noktaları genellikle çinko bağlama bölgeleriyle ilgisi olmayan lizin ve arginin ile ilişkili olmasına rağmen, çinko bağlayıcı histidin ve sisteine yakın konumlandırılan lizin amino asitlerinin çinkodan etkilendiği ve bunların glukoz ile reaksiyonunu inhibe ettiği öngörülmüştür (Tupe et al. 2015).

Proteinler agregat oluşturmaya eğilimlidirler ve yapı ve dizilim açısından farklılık gösterebilirler de amiloid fibrillerinde gözlenenlere benzer çapraz β yapıları oluşturma potansiyeline sahiptirler (Alam et al. 2017b; Chiti and Dobson 2006). (Frousios et al. 2009; Hamodrakas 2011; Lopez de la Paz and Serrano 2004). *In vivo* protein glukozilasyonu, arginin, lizin ve sistein amino asitlerini içeren farklı bölgelerde meydana gelir ve gizli hidrofobik bölgelerin açılmasına neden olur ve zamanla alfa-helikal formdan beta-yaprak yapısına geçiş (amiloid oluşumu) gerçekleşir. Çalışmamızda, ThT ile karıştırılmış gliko proteinlerin florometrik seviyeleri ölçülerek beta-yaprak oluşumunun analizi yapıldı. Elde edilen veriler, glukoz (C+) varlığında yüksek düzeyde agregatlaşma olduğunu ve kontrol olarak kullanılan aminoguanidin ve karnosin'in agregasyonu önemli ölçüde önleyebildiğini gösterdi. Ayrıca, karnosin üzerine farklı çinko konsantrasyonlarının eklenmesi, doza bağlı bir şekilde anti-agregatif etkide kayda değer bir artışa neden oldu (Şekil 3.3 A). Karnosin'in varlığında gliko α -kristalinde amiloid fibril oluşumunun yüksek oranda önlendiği gösterilmiş olup, karnosin, beta-amiloid birikimi ve fibril oluşumunun bir baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır (Aloisi et al. 2013; Attanasio et al. 2009; Attanasio et al. 2013; Brender et al. 2010). Protein agregasyonu, çapraz bağlı proteinleri tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Bu agregatlar, lizozomlar, inklüzyon cisimcikleri, agresomlar, hatalı katlanma ve plaklar dahil olmak üzere farklı form ve yapılarda oluşturulabilir (Reeg and Grune 2015).

Protein değişimi sırasında genellikle analiz edilen bir başka belirteç, yaşlanma ve protein oksidasyonu (hücrel stres, UV ışınlaması ve patolojik koşullar) ile artan ditirozin çapraz bağlarının oluşumudur. Bu dimerler, oksitlenmiş proteinlerin

proteolizinden sonra salınan kimyasal olarak kararlı bileşiklerdir (Giulivi et al. 2003). Agregasyon sürecine ilişkin yapılan çalışmalarda, literatüre benzer şekilde ditirozin seviyelerinde bir yükselme olduğu gösterilmiştir. AG, karnosin ve çinko/karnosin kullanımının ditirozin düzeylerini önemli ölçüde azalttığı görüldü. Ayrıca çinkonun varlığı, daha yüksek konsantrasyonlarda karnosin aktivitesini artıran doza bağımlı bir etki gösterdiği gözlemlendi (Şekil 3.3B).





Şekil 3.3 Çinko / karnosin ile muamele edilmiş BSA protein modifikasyon modelinde (A) ThT analizi, (B) ditirozin oluşumu. * $p < 0.05$ ve *** $p < 0.001$ - C-, ### $p < 0.001$ - C+, \$ $p < 0.05$ ve \$\$ $p < 0.01$ - karnosin 5 mM.

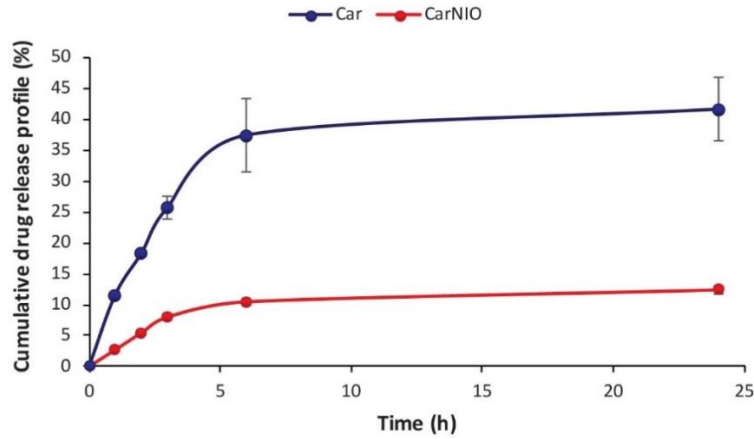
Azheimer hastalarının beyinlerinden izole edilen beta-amiloid dimerlerinin nörotoksik ve yıkıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu dimerler, beta amiloid bölgesini içeren amiloid öncüsü üzerinde bir ditirozin çapraz bağ bağının varlığından dolayı stabil ve tutarlıdır (Portelius et al. 2009; Roberts et al. 2012; Shankar et al. 2008). Karnosin ve homologlarının (homokarnosin ve anserin) karbonil ve ditirozin gruplarıyla etkileşim yoluyla çapraz bağlanmayı ve agregasyonu azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olup bu etkinin daha çok karnosinin antioksidan etkisi ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Cararo et al. 2015; Hipkiss et al. 2001; Kim and Kang 2007). Amiloid plaklarında yüksek miktarlarda çinko, demir ve bakırın bulunması metallerin Alzheimer hastalığının (AD) patogenezinde önemini vurgulamaktadır. Bazı raporlar, AD ve diyabetteki

geçiş metallerinin eksikliğinin, muhtemelen beta-amiloidler ve ROS üretimi ile metallerin tutulumuna bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bu nedenle, bir metal şelatör olarak karnosin etkisi ve çinko ile etkileşimi, amiloid plaklardan metalleri şelatlamının yanı sıra anti-agregasyon ve antioksidasyon etkisi nedeniyle ilginç bir yaklaşım olarak görülebilir (Al-Hilaly et al. 2013; Mukherjee et al. 2017).

Karnosinin terapötik potansiyelinin irdelenmesi ve çalışma sonuçlarının doğrulanmasında *in vivo* çalışmaların gerçekleştirilmesi gereklidir. Metabolik yanıt, absorpsiyon hızı ve terapötik dozlar gibi çeşitli faktörlerin ve mekanizmaların etkisi nedeniyle *in vitro* çalışmaların canlı vücutta olanlardan farklı olması anlaşılabilir bir durumdur. Serumda karnosinaz tarafından yürütülen bozunma olasılığı nedeniyle karnosin tedavisi hakkında bir endişe olmuştur. Bu nedenle, ya mevcut çalışmada açıklananlar gibi kompleksler oluşturarak ya da peptidi korumak için kapsülleme yöntemleri geliştirerek hidroliz sorununun üstesinden gelebilecek yeni formülasyonların araştırılması gereklidir (Bellia et al. 2012; Moulahoum et al. 2019).

3.2 2. Bölüm: Karnosin Enkapsüle Edilmiş Niozomların Sığır Serum Albumin Modifikasyonları Üzerine Etkisi

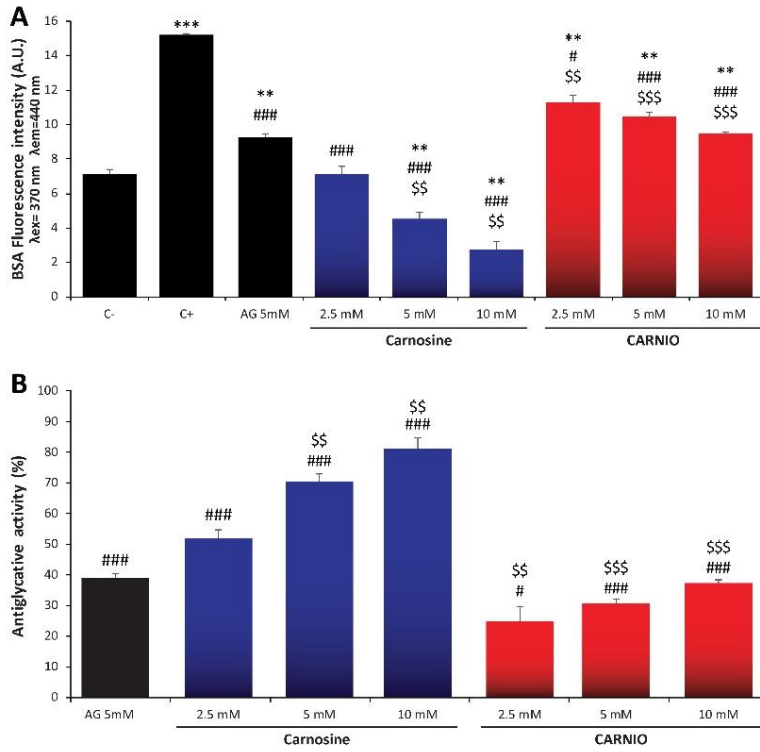
Hazırlanan niozomların karakterizasyon çalışmaları sonucunda morfolojik olarak, küresel formda ve ortalama 560 ± 203 nm büyüklüğünde olduğu belirlendi. Karnosin enkapsülasyon (CarNIO) için etkinliği (%EE) ise 32.4 ± 5 olarak bulundu. Ayrıca, formüle edilmiş niozomlar 30 gün 4°C 'de depolama sonrasında boyut ve dağılımda hiçbir farklılık göstermediği gözlemlendi. Nanotaşıyıcılar kullanımında yan etkilerden kaçınmak için molekül tutma ve sürekli salınım önemli kriterlerdir. Niozomlardan karnosinin salınımı, fizyolojik koşullarda diyaliz kullanılarak takip edildi. Karnosin yüklü niozomların ve serbest karnosinin salınım profile incelendiğinde ilk 5-6 saatte lineer olduğu, 24 saat sonrasında ise sırasıyla 12.4 ± 0.6 ve 41.5 ± 5 'e ulaştığı belirlendi. Ancak 6. Saat sonrasında da belirgin bir artış gözlenmedi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Serbest karnosin ve CarNIO'nun ilaç salım profili.

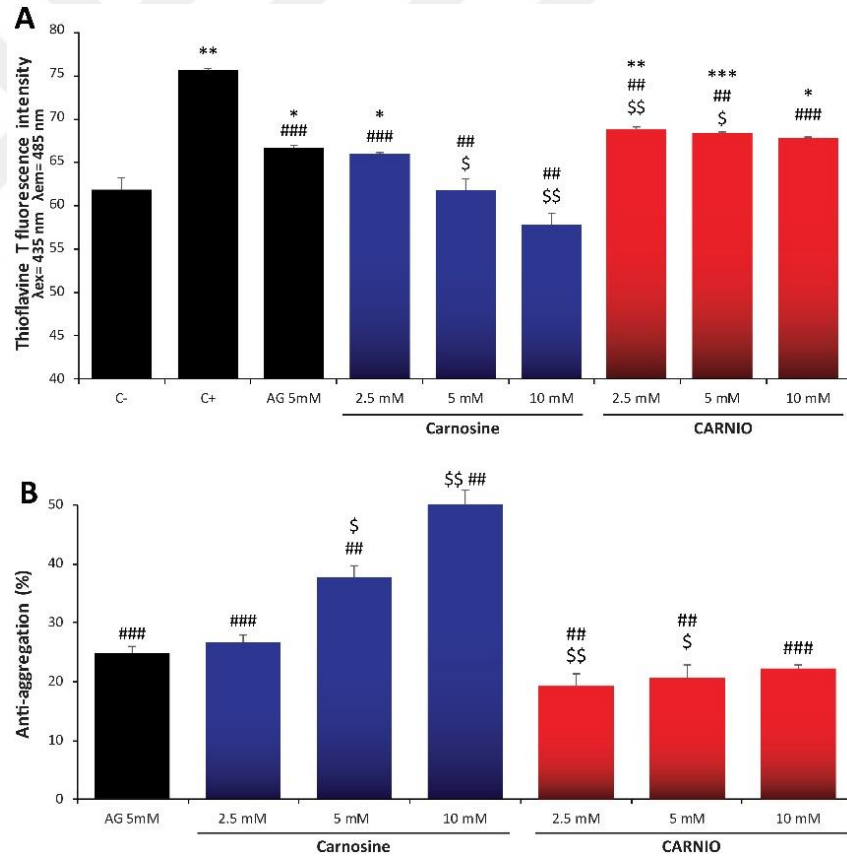
Serbest karnosin ve CarNIO'nun antiglikatif etkisi, Şekil 3.5 de verildi. Hem negatif (C-) hem de pozitif (C+) kontrollerden elde edilen floresans, glikasyon işleminin doğrulanmasına ve test moleküllerinin antiglikatif etkilerinin incelenmesinde kullanıldı. AGE'lerin floresan değerleri C+'da C-'ye kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olarak bulundu ($p < 0.001$) (Şekil 3.5A). Ayrıca, serbest veya karnosin

enkapsüle edilmiş niozomların glikasyon sürecinde doza bağlı bir azalma gösterdiği belirlendi. Paralel olarak, boş niozomlar aynı koşullarda ayrı ayrı test edildi ve önemli bir fark gözlenmedi. Aminoguanidin, referans antiglikatif ajan olarak kullanıldı ve yaklaşık olarak %40'lık bir inhibisyon yüzdesi gösterdi ($p<0.001$) (Şekil 3.5 B). Serbest karnosinin 2.5 mM'lik dozunun %53'lük bir azalma ile ($p<0.001$) referans AG'e kıyasla biraz daha iyi antiglikatif etkisi olduğu görüldü. Daha yüksek konsantrasyonlar (5 ve 10 mM), C+ ile karşılaştırıldığında sırasıyla %70'e ($p<0.001$) ve %82'ye ($p<0.001$) ulaşan daha iyi bir inhibitör etki göstermiştir. Aynı konsantrasyonlarda karnosin enkapsüle edilmiş niozomlar kullanıldığında ise 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM için sırasıyla %25 ($p<0.05$), %31 ($p<0.001$) ve %37 ($p<0.001$) antiglikatif etki gösterdiği belirlendi. Bu değerlerin, difüzyon nedeni ile serbest karnosin ile gözlenen değerlerden daha düşük olması doğal olarak karşılandı.



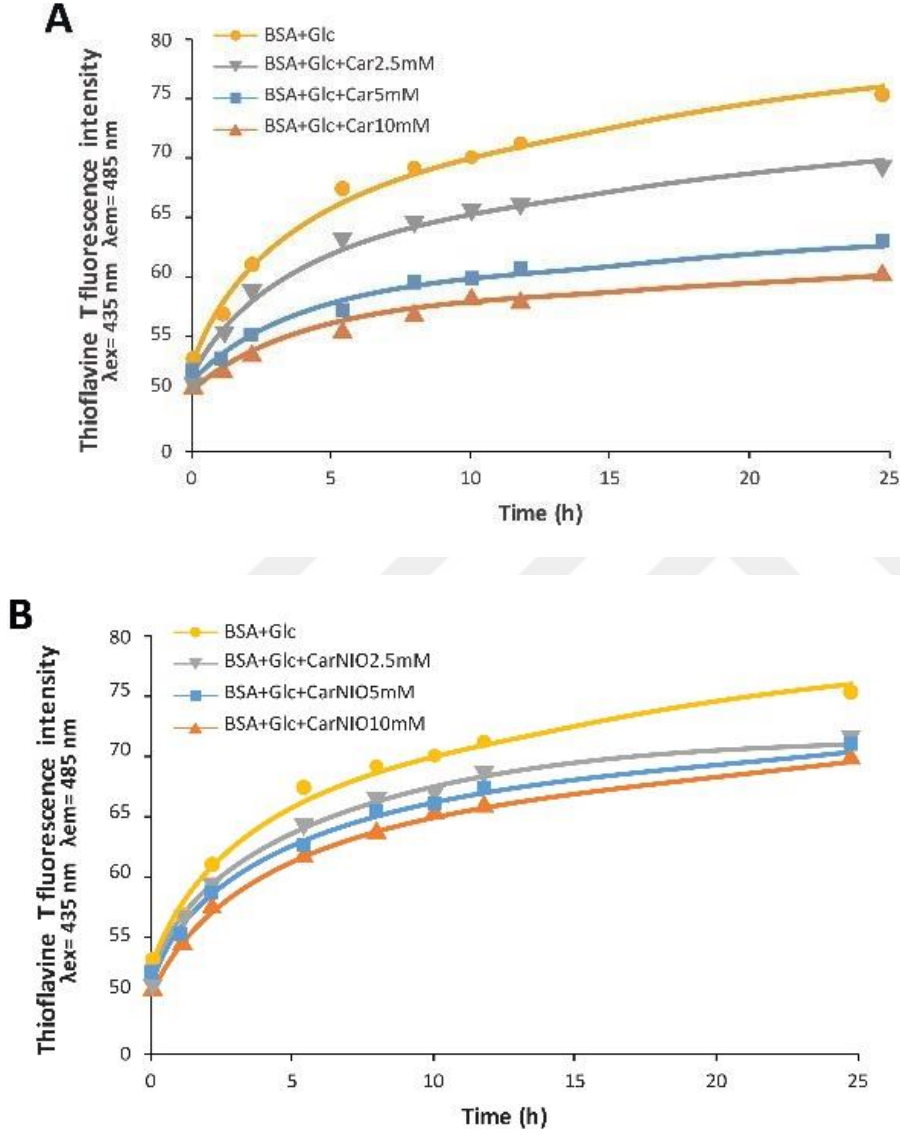
Şekil 3.5 Karnosin ve karnosin/niozomlarının (CarNIO) antiglikatif etkisi. (A), $\lambda_{ex}=370/\lambda_{em}=440$ nm'de floresan yoğunluğu, (B) gözlemlenen inhibisyon, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ ve C- grubu. # $p<0.05$, ### $p<0.01$ ve ### $p<0.001$ ve C+ grubu karşılaştırması. \$ $p<0.05$, \$\$ $p<0.01$ ve \$\$\$ $p<0.001$ ve AG 5mM grubu.

Albümin modelinde β -amiloid oluşum miktarı, spesifik olarak fibrillere bağlanan Tiyoflavin T testi ile değerlendirildi (Şekil 3.6). BSA'nın glukoz (C+) ile glikasyonu, negatif kontrole kıyasla ($p<0.01$) önemli bir artış gösterdi (Şekil 3.6A). Ayrıca, serbest karnosin ve CarNIO, pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında doza bağımlı bir şekilde amiloid oluşumunun azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.6 A ve B). Serbest karnosin, 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM tedavi dozları için sırasıyla %27 ($p<0.001$), %38 ($p<0.01$) ve %49.9 ($p<0.01$) koruma seviyesi gösterdi. Benzer şekilde, CarNIO için aynı doz aralığı için sırasıyla %19.4 ($p<0.01$), %20.6 ($p<0.01$) ve %22.2 ($p<0.001$) etkinlik gözlemlendi. 5 mM amino guanidin, referans molekül olarak kullanıldığında ise ve yaklaşık %25'lik bir fibril oluşumunu engelleme potansiyeli olduğu görüldü.



Şekil 3.6. Karnosin ve karnosin enkapsüllemiş niozomların (CarNIO) anti-fibril oluşum etkisinin belirlenmesi (A), $\lambda_{ex}=435/\lambda_{em}=485$ nm'de floresan yoğunluğu(B) gözlemlenen inhibisyon yüzdesi. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ ve C- grubu. ### $p<0.01$ ve ### $p<0.001$ ve C+ grubu. \$ $p<0.05$ ve \$\$ $p<0.01$ ve AG 5mM grubu.

Karnosin ve CARNIO (2.5, 5, 10 mM) varlığında ve yokluğunda BSA fibrilasyonunun kinetik çalışması, 24 saatlik bir süre boyunca ThT floresan ölçümleri ile izlendi (Şekil 3.7).

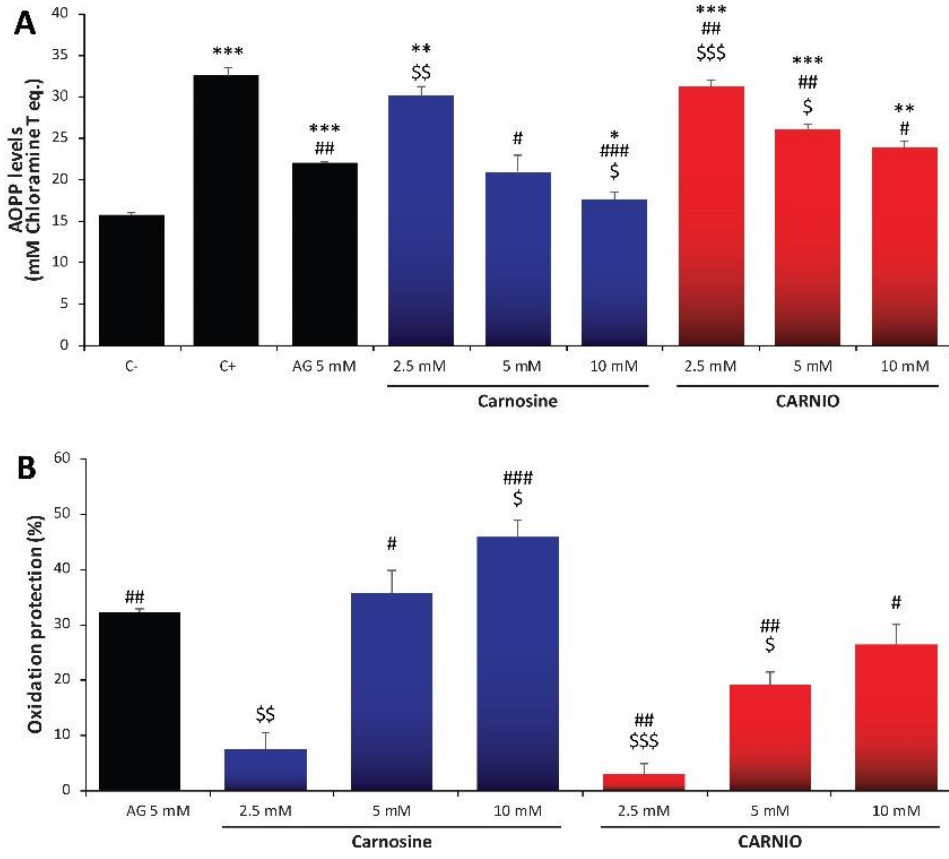


Şekil 3.7 BSA'nın ThT floresan kinetiği. (A) Karnosin, (B) CarNIO.

Elde edilen veriler fibril oluşumu inhibisyonunun olduğunu göstermektedir. Mevcut deneysel koşullar altında BSA fibrilasyonu işlemi sırasında herhangi bir gecikme fazı gözlenmedi ve bu nedenle reaksiyon başlangıcı, farklı karnosin konsantrasyonunun varlığından etkilenmediği görüldü. Bununla birlikte, karnosin

için en yüksek inhibitör etkisinin 10 mM konsantrasyonda olduğu gözlendi (Şekil 3.7B). $t_{1/2}$ 'de (yarı mr; ThT floresansıyla gösterilen fibril oluşumunun %50'si) sağa kayma, fibrilasyon oluşumunda genel bir azalmayı göstermektedir. Benzer şekilde, artan karnosin dozları ile BSA fibrilasyonunun $t_{1/2}$ 'sinde bir kayma gözlendi ve bunun da sürecin doza bağlı sabit düŐüŐünden kaynaklandığını düŐündürdü.

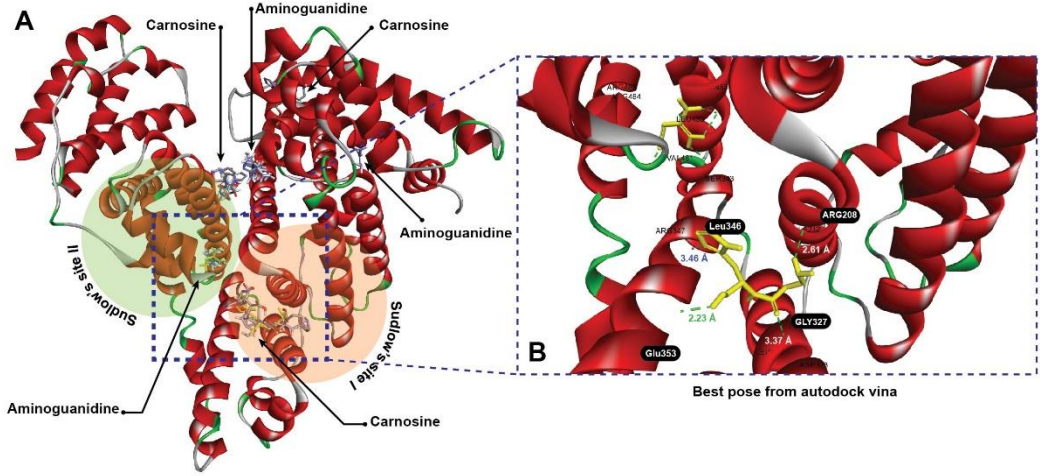
Protein oksidasyonunun incelenmesi amacı ile AOPP seviyeleri ölçüldü (Şekil 3.8). Genel olarak karnosinin (serbest veya kapsüllenmiş) mekanizma üzerinde önemli bir inhibitör etkiye sahip olduğunu gösterdi. Serbest karnosin, AOPP seviyelerini sırasıyla 2.5 mM, 5 mM ve 10 mM için %7.6 ($p>0.005$), %36 ($p<0.05$) ve %47 ($p<0.001$) oranında önemli ölçüde azaltırken benzer şekilde, CarNIO aynı dozları için %3.8 ($p<0.01$), %19.8 ($p<0.01$) ve %26.7 ($p<0.05$) AOPP seviyelerinde azalma sağladığı tespit edildi. Serbest karnosinin, 2.5 mM'den başlayarak referans molekül (AG) ile aynı etkiyi yarattığı ve 10 mM'de ise daha iyi bir etkiye ulaŐıldıėı görüldü.



Şekil 3.8. Karnosin ve enkapsüle karnosin niozomlarının (CarNIO) protein oksidasyonunu önleyici etkisi. (A) AOPP seviyeleri (B) gözlemlenen inhibisyon yüzdesi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ ve C- grubu. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ ve C+ grubu karşılaştırması. \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ ve \$\$\$ $p < 0.001$ ve AG 5mM grubu.

Karnosin ve BSA etkileşimine ilişkin verilerin teyit edilmesi için *in silico* model çalışması gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak agregasyonun başlamasıyla ilgili potansiyel bölgeler üzerinde farklı informatik araçlar kullanılarak yapılan model ile elde edilen sonuçlar agregasyonun proteinin primer yapısına dayalı olduğunu gösterdi. Karnosinin yerleştirme simülasyonlarını takiben, BSA'da (Sudlow'un sitesi I ve II) karnosinin çoğunun yoğunlaştığı iki potansiyel bölge tanımlandı (Şekil 3.9 A). En kararlı karnosin yapısının yöneliminin (en düşük enerji -5.5 kcal/mol) daha önce de elde edilen tahmini agregasyon bölgesinin yakınında olduğu görüldü (Şekil 3.9 B). Karnosin-BSA kompleksinin kararlılığında etkin olan dört hidrojen bağı: Arg208 (2.61 Å), Gly327 (3.37 Å), Leu346 (3.46 Å) ve Glu353 (2.23 Å) olarak belirlendi.

Diğer yandan karnosin ile referans antiglikasyon ajanı olan aminoguanidin (AG) arasında bir karşılaştırma yapıldı. Elde edilen afinite enerjileri ve farklı yapılar Çizelge 3.1 ve Şekil 3.9 A da verildi. İki molekülün BSA ile bağlanma afinitesi karşılaştırıldığında karnosinin bağlanma afinitesinin daha yüksek olduğu görüldü.



Şekil 3.9. (A) BSA ile karnosin ve aminoguanidin etkileşiminin *in silico* incelenmesi. (B) Genişletilmiş bölge.

Çizelge 3.1. Autodock Vina programı kullanılarak moleküler yerleştirmeden sonra karnosin ve aminoguanidin'in (AG) BSA bağlanma afinitesi.

Poses	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carnosine (kcal/mol)	-5.5	-4.7	-4.6	-4.4	-4.4	-4.4	-4.3	-4.2	-4.2
Aminoguanidine (kcal/mol)	-4.0	-4.0	-3.9	-3.9	-3.8	-3.7	-3.7	-3.7	-3.6

Enzimatik olmayan glikasyon ve oksidatif stres, makromoleküllerin, özellikle proteinlerin istenmeyen önemli modifikasyonlarından bir tanesidir. Bu modifikasyonlar, agregasyon ve birikim, parçalanma ve çapraz bağlama reaksiyonları gibi karşılaştırılabilir dönüşümler üstlenen AGE ve AOPP gibi karmaşık protein yapıları ile sonuçlanır. AGE ve AOPP'lerin her ikisi de gelişmiş glikasyon son ürünleri (RAGE) için reseptörü aktive edebilir ve daha sonra doku ve organ yapılarında ve fonksiyonlarında olumsuz değişikliklere neden olan bazı hücre içi sinyal yollarını modüle edebilir. Bu nedenle patogeneze süreçlerindeki ve diyabet

ve Alzheimer gibi belirli hastalıkların gelişimindeki rollerinin araştırılması için önemli mekanizmaları içinde barındırır (Demirbilek et al. 2007; Kalousova et al. 2005; Rondeau and Bourdon 2011).

Protein glikoksidasyonların günümüzün en yaygın olan diyabet, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların patalojisindeki rolü üzerine yapılan çalışmalar neticesinde gerek doğal maddelerin kullanımı gerekse benzeri sentetik bileşenler üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Alavi et al. 2011; Grzebyk and Piwowar 2016a; Hipkiss 2009; Maher and Schubert 2009). Karnosin ve analogları (homokarnosin, anserin ve beta- alanin), hayvanların beyin ve kaslarında yüksek miktarlarda bulunur ve karnosin antioksidan, metal-iyon şelatlayıcı ve antiglikasyon ajanı olduğu için daha önce bahsedilen kriterlerin neredeyse tamamını karşılamaktadır (Baran 2000; Calabrese et al. 2005; Hipkiss et al. 1995; Quinn et al. 1992). Ayrıca karnosinin, özellikle AD ve diyabet olmak üzere yaşlanma ile bağlantılı birçok protein modifikasyonunu önlediği gösterilmiştir (Bauer 2005; Hipkiss 2005; Hipkiss 2007).

BSA'nın glikasyonu, proteinlerde glikasyon ve agregasyon dışında birçok değişikliği indükler. Tiyo grupları, Amadori ürünleri (fruktozamin) ve protein karbonilleri glikasyondan sonra meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için kullanılan diğer belirteçlerdir (Awasthi and Saraswathi 2016). Bu belirteçler birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada yaygın olarak değerlendirilir (Aydin et al. 2018; Grzebyk and Piwowar 2016b; Tupe et al. 2017).

Farklı tipteki proteinlerin agregat oluşturma duyarlılığı hem deneysel hem de teorik olarak büyük ilgi gören bir konu olmuştur. Çalışmalar, yapısal veya dizi benzerliği olmamasına rağmen, proteinlerin amiloid fibrillerinde görülen çapraz β yapıları oluşturma eğilimi gösterdiğini ileri sürmektedir (Alam et al. 2017a; Chiti and Dobson 2006; Esteras-Chopo et al. 2005; Hamodrakas 2011; Lopez de la Paz and Serrano 2004; Rousseau et al. 2006). Birçok çalışma, agregasyon bölgelerinin genellikle hidrofobik ve protein yapıları içinde gizli bölgeler olduğunu tanımlamıştır (Frousios et al. 2009; Hamodrakas 2011; Sanchez de Groot et al.

2005). Birçok araştırma grubu agregasyon ve amiloid fibril oluşumunun anlaşılmasında fizikokimyasal özelliklere ve amino asit dizilerine dayalı siliko algoritmalar geliştirmiştir.

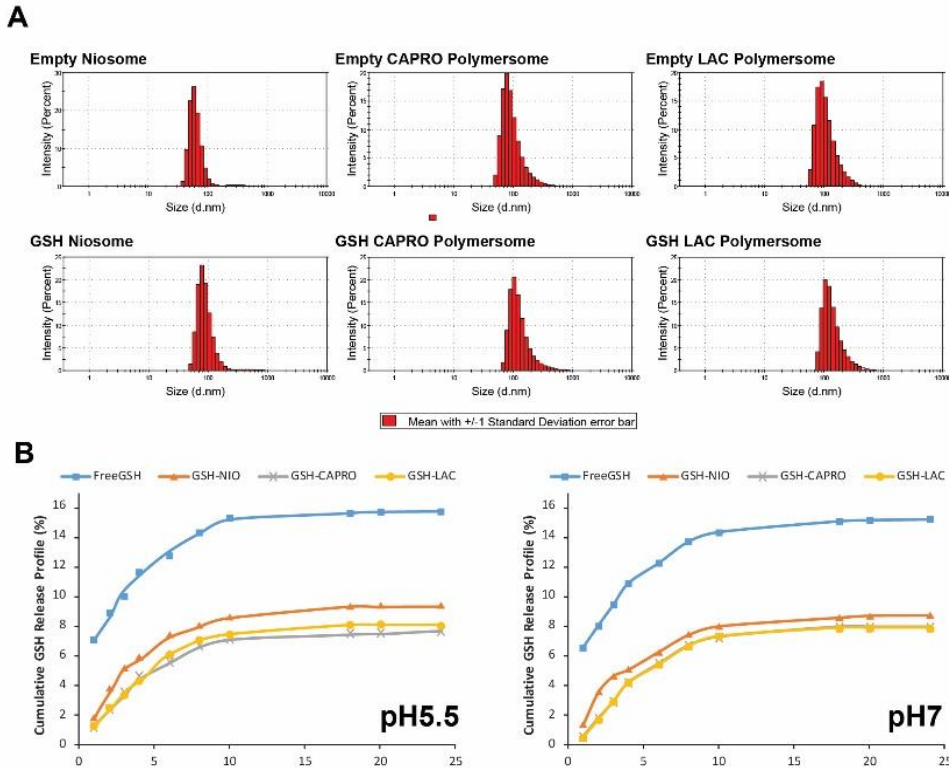
Proteinlerin, peptitlerin ve amino asitlerin şekerlerle enzimatik olmayan reaksiyonları geniş çapta araştırılmıştır. Varsayılan süreç, Schiff bazları üretimini, ardından bir Amadori düzenlemesini içerir ve AGE'lerin oluşumuyla sonuçlanır. Yerleştirme sonuçlarından, karnosinin, arginin ve lizin amino asit kalıntılarına çok yakın konumlandırıldığı gösterildi. Bu amino asitler Schiff bazı oluşumuna yatkındır ve bu nedenle karnosinin bu bölge üzerinden etki gösterme olasılığı güçlüdür. Bununla birlikte, bu hipotezi doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Belirli terapötik hedeflere (örneğin beyin) ulaşmanın zorluğu göz önüne alındığında, nanoteknoloji, bu tür zorlukların üstesinden gelmek için modern biyotıbbı büyük katkıda bulunmuştur. Niozomlar, iyonik olmayan yüzey aktif maddelerden hazırlanan nano yapıları taşıyıcılar olarak bilinir ve biyolojik olarak bozunabilir, biyolojik olarak uyumlu ve immünojenik olmadıkları bilinir, bu da terapideki potansiyellerini daha da iyi vurgular (Gharbavi et al. 2018).

Spesifik koşullar altında (pH, ısı ve basınç gibi çevresel stresler), herhangi bir patoloji biçimiyle ilgili olmayan proteinler, amiloid fibrilleri veya fibril benzeri kümeler oluşturabilir (Chiti and Dobson 2009; Ferrao-Gonzales et al. 2000; Wang et al. 2010). Araştırmalar, bu protein kümelerinin morfolojik ve histokimyasal özelliklerinin hastalıkla ilişkili amiloid proteinleriyle karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir. Bu, amiloid fibril oluşumu eğiliminin tüm polipeptitlerde görülen ortak bir özellik olduğunu göstermektedir (Naeem et al. 2011; Zhang et al. 2010). Terapötik moleküllerin vücuttaki etkisi, farmakokinetik farklanmalar nedeni ile çalışmalar ile tam olarak karşılaştırılmaz. Bu nedenle, karnosinin protein modifikasyonları üzerinde indüklediği mekanizmaları araştıran daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

3.3 3. Bölüm: Glutasyon (GSH) Yüklü Niozomlar ve Kaprolakton/Laktid Polimerzomları ile Protein Glikoksidasyonunun Önlenmesi

Niozomların, kaprolakton polimerzomlarının ve laktid polimerzomlarının ilk incelemesi DLS ile yapıldı. Boş niozomların boyutu ortalama 62.5 ± 15.8 nm iken, Boş-CAPRO ve BoşLAC sırasıyla 101 ± 51.4 nm ($p < 0.05$) ve 147.8 ± 76.2 nm ($p < 0.05$) olarak bulundu. GSH'nin farklı nanotaşıyıcılarda (niozom ve polimerzomlar) kapsüllenmesi sonrasında boyutlar sırasıyla 90.3 ± 29.3 nm ($p > 0.05$), 137 ± 81.6 nm ($p > 0.05$) ve 147.8 ± 76.2 nm ($p > 0.05$) olarak bulundu. Buna göre farklı nanotaşıyıcıların hazırlanmasına dayalı olarak boyuttaki farklılıkları tutarlı olduğu düşünüldü (Şekil 3.10 A) Farklı yapıların $+4^\circ\text{C}$ 'deki stabilitesi, bir aylık süre boyunca sürekli takip edildi ve yukarıda açıklanan ilk sonuçlara kıyasla önemli bir fark gözlemlenmedi.



Şekil 3.10. GSH yüklü nano taşıyıcıların karakterizasyonu. (A) DLS'den elde edilen boyut dağılımı sonuçları. (B) Farklı nanotaşıyıcıların pH 7.2 ve pH 5.5 salım profili.

Nanotaşıyıcıların içeriklerinin sürekli salım kapasitesi, yan etkilerin üstesinden gelmek ve etkili ilaç taşınımı için önemli bir özelliktir. GSH'nin niosomlardan ve polimerzomlardan salım profili, iki pH aralığında diyaliz kullanılarak izlendi: fizyolojik koşullar (pH 7.2) ve kanser hücrelerinin ortamını taklit eden asidik koşullar (pH 5.0) (Şekil 3.10 B). Burada, tüm nanotaşıyıcıların serbest GSH'den daha iyi performans göstermesine rağmen hem fizyolojik hem de asidik koşullarda GSH-CAPRO ve GSH-LAC'ın GSH-NIO'dan daha yüksek alıkonmaya sahip olduğunu görülmektedir. Veriler, 8 ila 10 saatlik inkübasyon arasında bir platoya ulaşıldığını göstermektedir; pH 7.4'te kontrol (serbest GSH) %14 salım gösterirken, GSH-NIO için %7,8, GSH-CAPRO için %7,1, GSH-LAC için %7 olarak görüldü. Diğer yandan bu değerler asidik koşullarda (pH 5.5) önemli bir farklılık göstermedi.

Zeta potansiyeli değerlendirmesi, tüm nano taşıyıcıların negatif bir yüke sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca PDI değerleri 0.278-0.541 arasında değişmektedir (Çizelge 3.2). DLS gözlemlerine benzer şekilde, veziküllerin içine GSH yüklendikten sonra yapıların boyutu artmaktadır. Farklı formülasyonların enkapsülasyon verimliliği (%EE), GSH-NIO için $99,02 \pm 0,005$, GSH-CAPRO için $95,19 \pm 2,27$ ve GSH-LAC için $95,68 \pm 3,05$ 'e olarak belirlendi.

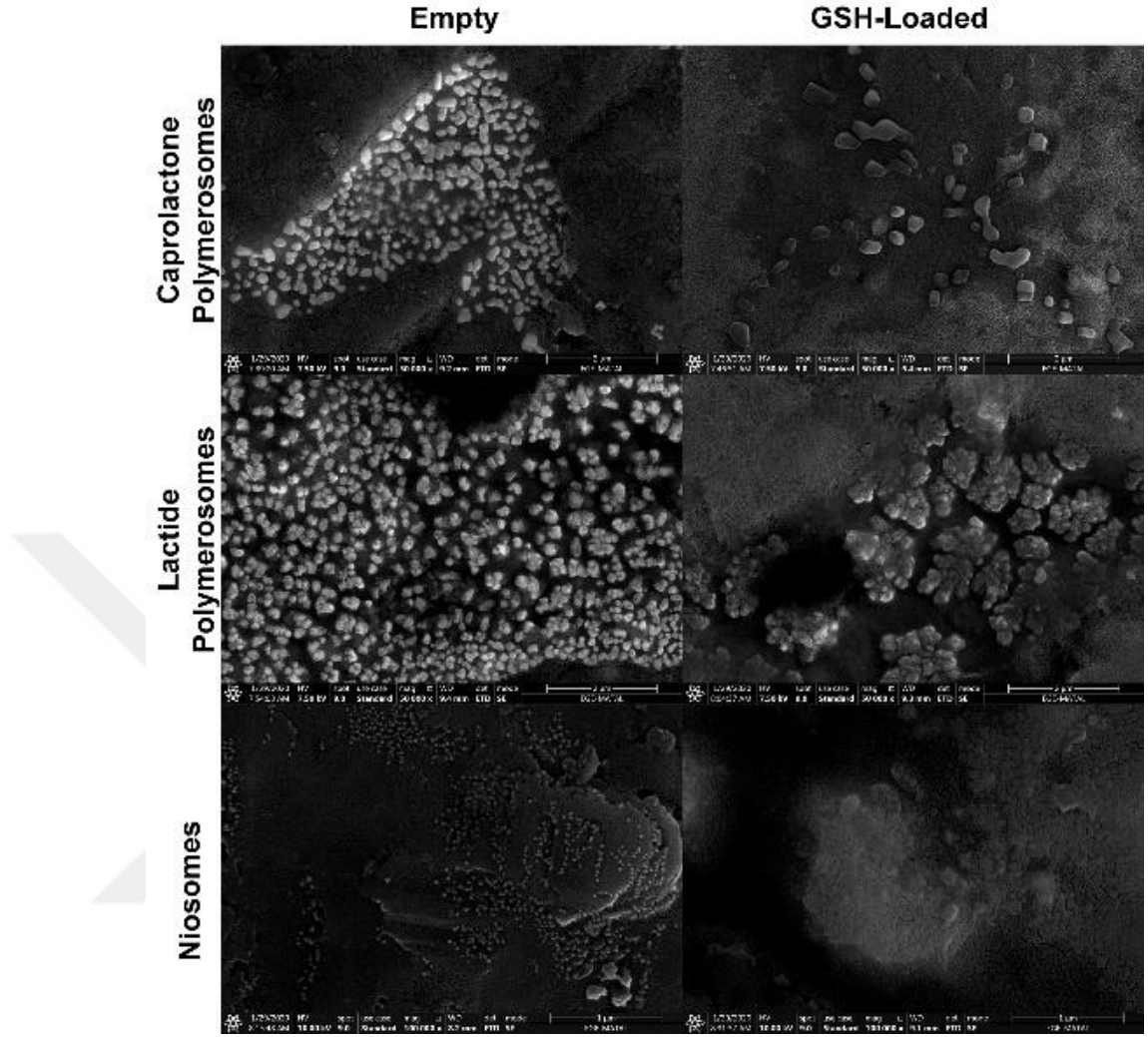
Çizelge 3.2 Farklı nanoyapıların karakterizasyonu (boyut, zeta potansiyeli ve PDI) ve enkapsülasyon verimliliği (%EE).

	EE (%)	Size (nm)	Zeta potential (mV)	PDI
Empty-NIO	–	62.5±15.8	-37.1±5.24	0.509
GSH-NIO	99.02±0.005	90.3±29.3 ^a	-35.2±4.5 ^{ns}	0.541
Empty-CAPRO	–	101±51.4 ^a	-42.2±6.9 ^{ns}	0.278
GSH-CAPRO	95.19±2.27	137±81.6 ^{ns}	-41.4±6.4 ^{ns}	0.335
Empty-LAC	–	114.1±52.2 ^a	-38.5±5.3 ^{ns}	0.263
GSH-LAC	95.68±3.05	147.8±76.2 ^{ns}	-43±8.08 ^{ns}	0.338

^a p<0.05 boş niosoma karşı-NIO, ^{ns} anlamlı olmayan değer.

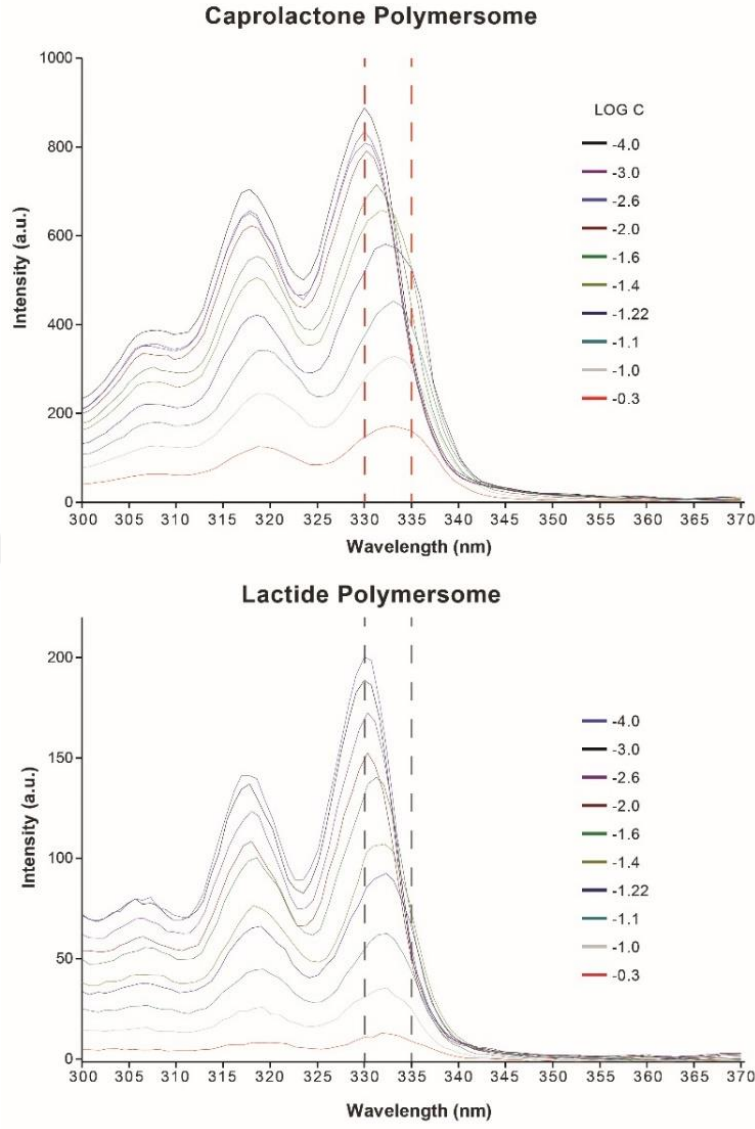
Nanotaşıyıcılar, ilaçların ve farklı fizikokimyasal özelliklere sahip diğer moleküllerin hedef bölgelere taşıyıcılarıdır (Qian et al. 2012). Bu nanotaşıyıcıların çapı 1-100 nm arasında değişen küçük bir boyuta sahipken, biyomedikal uygulamalarda vücudun mikro kapillerlerinin 200 nm civarında olması nedeniyle bu

sınır 200 nm'ye ulaşabilmektedir (Singh and Lillard 2009). Elde ettiğimiz sonuçlar bu tanımlama ile uyumludur. Ayrıca nanoparçacıkların yüzeyinde negatif yüklerin bulunması yapının kırılmasını engeller. Nanopartiküllerin büyük boyutlu ve yüksek yük seviyelerinin, makrofajlar tarafından kolayca yakalanmalarını sağladığı gösterilmiştir. Öte yandan, hafif yüzey yüküne sahip küçük boyutun, çeşitli mekanizmalar yoluyla farklı hücre hatlarındaki alım sürecini etkilediği gösterilmiştir (Honary and Zahir 2013). Bir *in vivo* biyodağılım çalışmasında, negatif yüklü polimerik nanoparçacıklara sahip küçük boyutlu (yaklaşık 150 nm) farklı organların tümörlerinde daha kolay birikme eğiliminde olduğu gösterilmiştir (He et al. 2010). Bu bulgular, boyut ve yüke dayalı olarak geliştirilmiş etkinlik ve kontrollü dağıtım ile yeni nanotaşıyıcıların tasarımı için bir temel oluşturmaktadır. SEM mikroskobu altında farklı nano taşıyıcıların karakterizasyonu, bu tip nano taşıyıcılar için tipik olan veziküler yapıları gösterdi (Şekil 3.11).

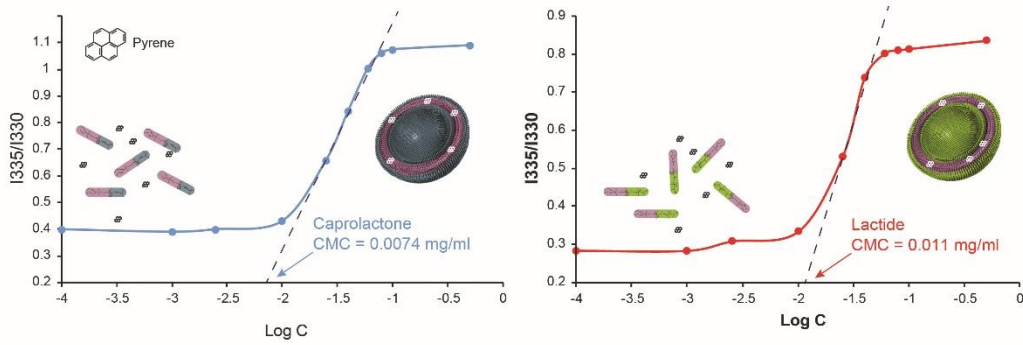


Şekil 3.11. Sentezlenen farklı nanotaşıyıcıların taramalı elektronik mikroskopi (SEM) görüntüleri. Sol taraf boş formülasyonları gösterirken sağ taraf GSH yüklü nanoformülasyonları göstermektedir.

Kritik misel konsantrasyonu (CMC), polimerik nanotaşıyıcıların oluşumunu kanıtlamak için bir karakterizasyon aracıdır. Ölçüm sonuçları, artan konsantrasyonlarla, 300 nm'de (sudaki pirenin özelliği) maksimum spektrumdan 335 nm'ye (hidrofobik ortamda piren) bir kaymanın gözlemlendiğini göstermiştir (Şekil 3.12). Bu, pirenin sulu bir ortamdan hidrofobik misel ortamına transferinin dönüşümünü ifade etmektedir. CMC değerleri, polimerlerin logaritmik konsantrasyonlarına karşı eksitasyon yoğunluk oranı (I335/I330) grafiğinden elde edildi (Şekil 3.13).



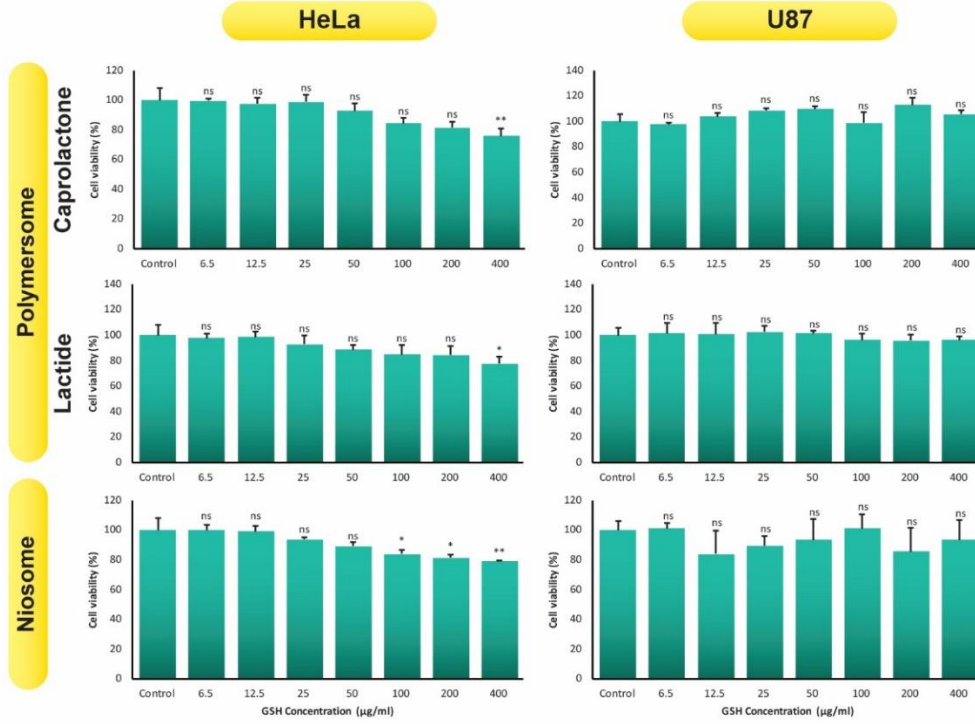
Şekil 3.12. CMC tayini için nanotaşıyıcıların eksitasyon spektrumları.



Şekil 3.13. Kaprolakton ve laktit bazlı polimerzomların kritik misel konsantrasyonu (CMC).

Sitotoksosite çalışmasının amacı, temel olarak iki hücre hattında (HeLa ve U87) farklı nano formülasyonların güvenliğini araştırmaktır. U87 hücre hatları, kontrollere kıyasla anlamlı bir azalma göstermeden üç nanotaşıyıcıya daha toleranslı olarak bulundu ($p>0.05$). Düşük dozlarda boş kaprolakton ve laktid polimerzomları (0-200 $\mu\text{g/mL}$) önemli bir etki göstermedi. 400 $\mu\text{g/mL}$ 'de kaprolakton için $\%81.3\pm3.8$ 'e ($p<0.01$) ve laktid polimerzomları için $\%84.36\pm1.69$ 'a ulaşan önemli bir toksik etki gözlemlendi ($p<0.05$). Ayrıca, HeLa hücreleri, $>100 \mu\text{g/mL}$ 'den başlayarak $\%84.06\pm2.3$ 'e ulaşan önemli bir düşüşün kaydedildiği niozomlara karşı daha duyarlı olarak gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 3.14).

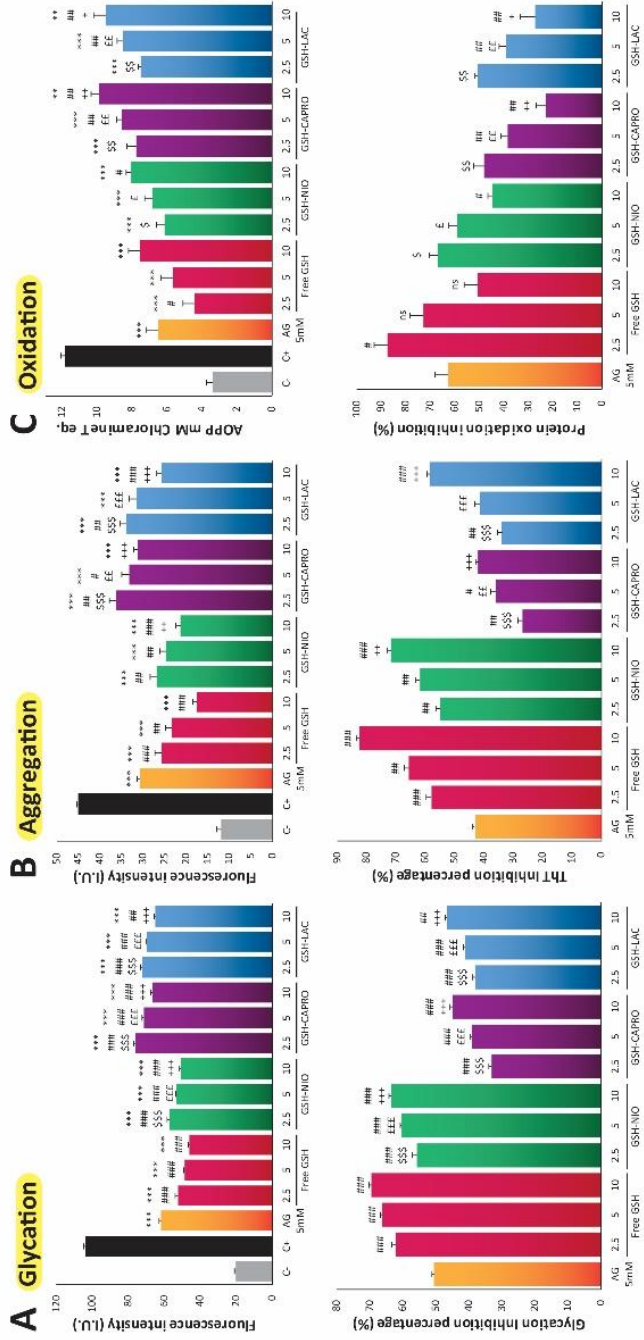
Nanopartiküllerin toksisitesi yoğunluk ve polariteden etkilenir. Yüklü nanopartiküllerin nötr olanlardan daha sitotoksik olduğu öne sürülmüştür (Schaeublin et al. 2011). Ayrıca, pozitif yüklü altın, ZnO ve diğer nanopartiküller, negatif yüklü olanlara kıyasla daha fazla sitotoksositeye sahiptir (Baek et al. 2011; Bhattacharjee et al. 2010; Goodman et al. 2004; Oh et al. 2010; Ruizendaal et al. 2009). Bu ifadeler tüm nanopartiküller için geçerli değildir. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) partiküllerinde yükün önemli bir rolü yok gibi görünmektedir (Mura et al. 2011). Nanotaşıyıcılar ile görülen toksisiteyi azaltmak amacıyla araştırmalar yapılmaktadır ve önerilen uygulanabilir çözümlerden biri, yüzeyin fonksiyonel gruplar ve PEGilasyonu ile korunmasıdır (Luo et al. 2012).



Şekil 3.14 İki farklı hücre hattında (HeLa ve U87 hücre hatları) farklı nanotaşıyıcılar için hücre sitotoksikite testi (MTT testi). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ Kontrol grubuna karşı.

GSH, hücre metabolizmasında ve reaktif oksidatif türlerin (ROS) düzenlenerek fizyolojik dengenin korunmasında rol oynayan doğal bir antioksidan peptittir. Öte yandan, kanser hücrelerinde hücre ölümünü önlemek için GSH düzeylerinin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Lv et al. 2019). Yukarıdaki bulgular sadece hücrelerin canlılığını açıklamaktadır ve GSH'nin hücrelerdeki yolunu ve etkilerini takip etmek için moleküler ve sinyalizasyon çalışmalarına ihtiyaç vardır.

GSH yüklü nano taşıyıcıların her üçü de, protein glikasyon mekanizması üzerinde doza bağlı bir etki sergilemektedir. Referans antiglikasyon molekülü aminoguanidin (AG) ile karşılaştırma, sonucunda serbest GSH'nin tüm dozlarda AG'den daha iyi etkiler elde edebildiğini göstermiştir (Şekil 3.15). Aynı zamanda, GSH enkapsülasyonu, serbest GSH'ye kıyasla farklı derecelerde doza bağımlı bir etki üretmiştir. Niozomlar, tüm doz aralığı için serbest GSH'den biraz daha düşük bir etki göstermiştir ($p < 0.05$). İki polimerzom formülasyonu, serbest GSH ve GSH-NIO'dan daha düşük bir inhibitör etki göstermektedir ($p < 0.05$).



Şekil 3.15 *in vitro* BSA modelinde protein modifikasyon parametreleri. (A) Serbest GSH'nin ve GSH ile yüklü farklı nano taşıyıcıların (GSH-NIO, GSH-CAPRO ve GSH-LAC) anti-glikasyon etkisi. (B) anti-fibril oluşumu etkisinin (anti-agregasyon) ThT ölçümü. (C) Protein oksidasyonu önleyici etkisi (AOPP). Üst grafikler floresan/optik yoğunlukları temsil ederken alt grafikler inhibisyon yüzdesini göstermektedir. **p<0.01 ve ***p<0.001 ve C+ grubu. #p<0.05, ##p<0.01 ve ###p<0.001 ile AG 5mM grubu karşılaştırması. \$p<0.05, \$\$p<0.01 ve \$\$\$p<0.001 ile serbest GSH 2.5mM grubu karşılaştırması. £p<0.05, ££p<0.01 ve £££p<0.001 ile ücretsiz GSH 5mM grubu karşılaştırması. +p<0.05, ++p<0.01 ve +++p<0.001 ve serbest GSH 10mM grubu.

Paralel olarak, boş niozomlar ve polimerzomlar aynı şekilde test edildi ve önemli bir değişiklik gözlenmedi. Nanotaşıyıcıların antiglikasyon etkisinin serbest GSH'den farklı olmasının nedeni, muhtemelen GSH ve BSA etkileşimi arasındaki fiziksel veya kimyasal etkileşimden kaynaklanmakta olup difüzyon etkisinin varlığı göz ardı edilmemelidir. Bu bağlamda farklı nano taşıyıcılardan serbest bırakılan içeriğin, serbest olan GSH ile görülen etkin konsantrasyonlara ulaşmamış olması da mümkündür, bu sırada nano taşıyıcılar, reaksiyon karışımındaki içeriklerini yavaşça serbest bırakır. Ditirozin, N'-formilkinürenin ve bunun öncüsü kinurenin gibi diğer protein modifikasyon belirteçleri, farklı nanoformülasyonlar altında AGE'lerin inhibisyonu ile benzer sonuçlar göstermiştir ($p<0.01$) (Çizelge 3.3). Bir belirteç olarak ditirozin kullanmanın avantajı, kimyasal stabilitesinin yanı sıra oksitlenmiş proteinlerin proteolizini takiben serbest bırakılmasından kaynaklanmaktadır (Giulivi et al. 2003). Bu nedenle, ditirozinin değerlendirilmesi, protein modifikasyonunun derecesini yansıtabilir (DiMarco and Giulivi 2007).

Çizelge 3.3 GSH ve GSH Yüklü nano taşıyıcıların BSA glikoksidasyonu üzerindeki etkileri.

		Dityrosine (%)	N'-Formylkynurenine (%)	Kynurenine (%)
C- (BSA alone)		15.9±4.2 ^c	16.9±0.5 ^c	25.3±0.2 ^c
C+ (BSA+Glucose, no additive)	100	100	100	100
Different Treatments				
AG	5 mM	48.8±1.9 ^c	50.6±1.2 ^c	63.0±0.7 ^c
	2.5 mM	52.0±3.7 ^c	54.6±2.5 ^c	92.2±0.9 ^e
Free GSH	5 mM	37.6±5.3 ^{c,f}	46.1±5.6 ^c	83.9±0.7 ^{c,f}
	10 mM	27.8±6.8 ^{c,f}	37.5±6.8 ^{c,e}	66.1±4.3 ^c
GSH-NIO	2.5 mM	71.1±2 ^{c,f,h}	77.2±1.2 ^{c,f,h}	89.3±0.6 ^{b,f}
	5 mM	56.5±3.5 ^{c,d,k}	58.7±2.8 ^{c,d,j}	70.2±3.6 ^{b,j}
GSH-CAPRO	10 mM	37.4±11.7 ^{c,d,m}	41.3±6.7 ^{c,d}	66.4±2.1 ^c
	2.5 mM	85.8±0.8 ^{b,f,i}	87.9±0.4 ^{b,f,h}	85.5±2.2 ^d
GSH-LAC	5 mM	66.9±1.4 ^{c,f,l}	69.3±2.6 ^{c,e,k}	72.4±2.7 ^{b,j}
	10 mM	53.2±5.0 ^{c,m}	61.4±2.4 ^{c,e,o}	67.6±4.1 ^{c,m}
GSH-LAC	2.5 mM	77.7±1.4 ^{c,f,h}	85.2±0.4 ^{b,f,h}	95.2±0.4 ^e
	5 mM	68.1±0.9 ^{c,f,l}	68.5±3 ^{c,e,j}	88.5±0.9 ^{a,e}
	10 mM	54.4±2.6 ^{c,f,o}	60.9±2.5 ^{c,e,o}	67.9±6 ^b

^{a,b,c} $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ C+'a karşı; ^{d,e,f} $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ AG'ye karşı; ^{g,h,i} $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ serbest GSH 2.5mM kıyasla; ^{j,k,l} $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ serbest GSH 5mM kıyasla; ^{m,n,o} $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ serbest GSH 10mM kıyasla ; ^{ns} anlamlı olmayan değer

Albümünde beta-amiloid oluşumu, fibrilleri seçici olarak bağlayan Tiyoflavin T testi ile belirlendi (Şekil3.15 B). BSA'nın glukoz (C+) ile glikasyonu, C-'ye kıyasla β -amiloid oluşumunda önemli bir artış göstermektedir ($p<0.001$). Ek olarak, GSH ilavesi ile (serbest veya kapsüllenmiş), pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında ($p<0.001$) doza bağımlı bir şekilde amiloid oluşumunu engellediği gözlemlendi. Serbest GSH, C+ ile karşılaştırıldığında üç doz (2.5 mM, 5mM ve 10 mM) için sırasıyla %58 ($p<0.001$), %65 ($p<0.001$) ve %82 ($p<0.001$) oranında inhibisyon gerçekleştiği görüldü. GSH-NIO aynı doz aralığı için irdelendiğinde ise sırası ile %27 ($p<0,001$), %24 ($p<0,001$) ve %21 ($p<0,001$) inhibisyon değerleri tespit edildi.

2.5 mM doz için GSH-CAPRO ve GSH-LAC sırasıyla %36 ($p<0.001$) ve %33 ($p<0.001$) oranında fibril oluşumundan korunmuştur; 5 mM tedavi dozu için %33 ($p<0,001$) ve %31 ($p<0,001$); ve son olarak, C+ ile karşılaştırıldığında 10 mM doz için %31 ($p<0,001$) ve %25 ($p<0,001$) olaral fibril oluşumu engellendiği görülmüştür.

Proteinlerin agregat oluşturmaya yatkınlığı önemli birçok hastalık ve komplikasyonları açısından önemli bir konu olmuştur. Birçok çalışmada, benzer bir yapı bulunamamasına rağmen, proteinlerin amiloid fibrillerindekilere benzeyen çapraz β yapılar eğilimli olduğu belirtilmiştir (Alam et al. 2017a). Proteinler, β -tabakaları oluşturmak için aynı özellikleri paylaşan belirli dizilerden yararlanır (Rousseau et al. 2006). Proteinlerde agregasyon oluşumunda etken olan bölgelerin protein yapılarının içine gömülü hidrofobik bölgeler olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Frousios et al. 2009; Moulahoum et al. 2019) (Shankar et al. 2008) (Portelius et al. 2009; Roberts et al. 2012).

BSA'nın protein oksidasyonu, AOPP içeriğinin ölçülmesi yoluyla takip edildi. BSA'nın kloramin T (C+) ile inkübasyonu, AOPP seviyelerinde önemli bir artışa neden oldu ($p<0.001$). Farklı nanoformülasyonlar ve serbest GSH, 2.5 mM dozda ile karşılaştırıldığında serbest GSH için protein oksidasyon ürünlerinin seviyelerinin maksimum %87 ile önemli bir düşüş gösterdiği görüldü. Üç nanokapsülleme

arasında, GSH-NIO, üç dozun tümü için en önemli düşüşü gösterdi ($p<0.001$) (Şekil 3.15 C).

Galiniak ve ark. (2017) hem BSA modelinde hem de eritrosit hücrelerinin içindeki hemoglobin üzerinde *in vitro* protein modifikasyonu süreci üzerindeki amino asitlerin ve peptitlerin etkilerini araştırmışlardır (Galiniak et al. 2017). Ayrıca GSH eksikliğinin hücrelerde hemoglobinin glikasyon hızını arttırdığı bulunmuştur (Ramamurthy et al.2001). Lens proteinleri galaktozilasyonunun GSH tedavisi ile inhibe edildiği gösterilmiştir (Huby and Harding 1988). GSH'nin glikasyon ve protein modifikasyonunun inhibisyonunun istenmeyen etkilerden arınmış olmadığı belirtilmelidir. GSH'nin glukoz ile etkileşiminin, GSH'de glutamat kalıntısının alfa amino grubunun veya sisteinin -SH grubunun glikasyonu ile sonuçlanabileceği öne sürülmüştür. Elde edilen modifiye bileşiğin, glutatyon enzimatik sisteminde dönüşüme uğratılamaması söz konusu olduğundan glutatyon S-transferaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz ile düşük etkileşim seviyesine sahip olduğu bilinmektedir (Linetsky et al. 2005).

Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar literatürde belirtilen araştırma raporlarıyla uyumludur.

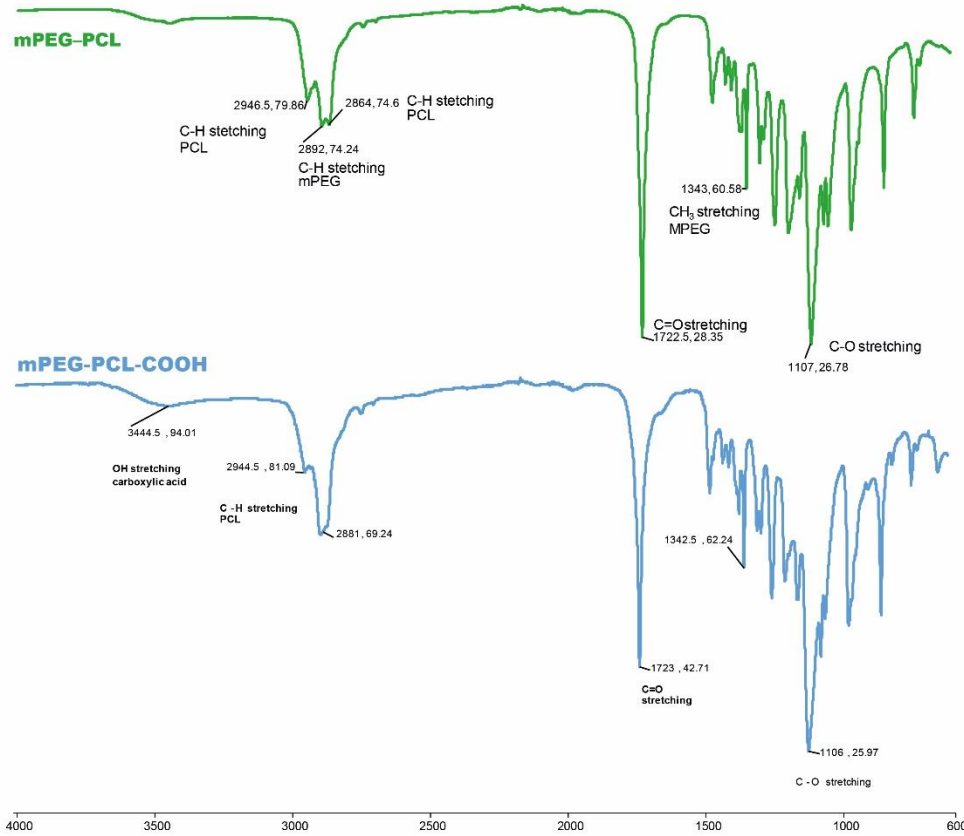
Hücre kültürü, tekniğin kapsadığı çeşitlilik ve kısa süre gerektirmesi nedeniyle medikal alanda yaygın olarak kullanılan araçlardan biridir. *In vitro* çalışmalar, farmakoloji ve terapötik araştırmalar dahil olmak üzere temel yaklaşım olarak kabul edilir. Yöntem çoğunlukla, yeni terapötik ajanların tanımlanması ve geliştirilmesinde bir başlangıç noktası olarak kullanılır. Hali hazırda kullanılan hücre hatlarında görülen çeşitlilik ve intrinsik mekanizmalar ile insan hastalıkları arasındaki benzerlikler nedeniyle, belirli patolojilerde bileşiklerin etkisini araştırmak için uygun bir seçim sağlarlar. Yine de hücre kültürü temelli deneyler, farmakolojik yanıtın bütününe tercüme edemez ve biyokimyasal yollar ve genetik çeşitlilik gibi belirli özelliklerle sınırlıdır. Hücre kültürü, dokular ve organizmalar yerine tek bir hücre tipine odaklanır. Bu nedenle, çapraz sinyal mekanizmaları, hormonlar, sıvılar ve diğer çevresel etkiler bu çalışmalarda genellikle eksiktir.

Esasen, ilaçların farmakokinetiği gibi bazı parametreler *in vitro* testler yoluyla araştırılmaz ve yeni geliştirilen ilaçlar ve bileşiklerin tam olarak anlaşılması için hayvan deneylerinin gerekliliği açıktır.

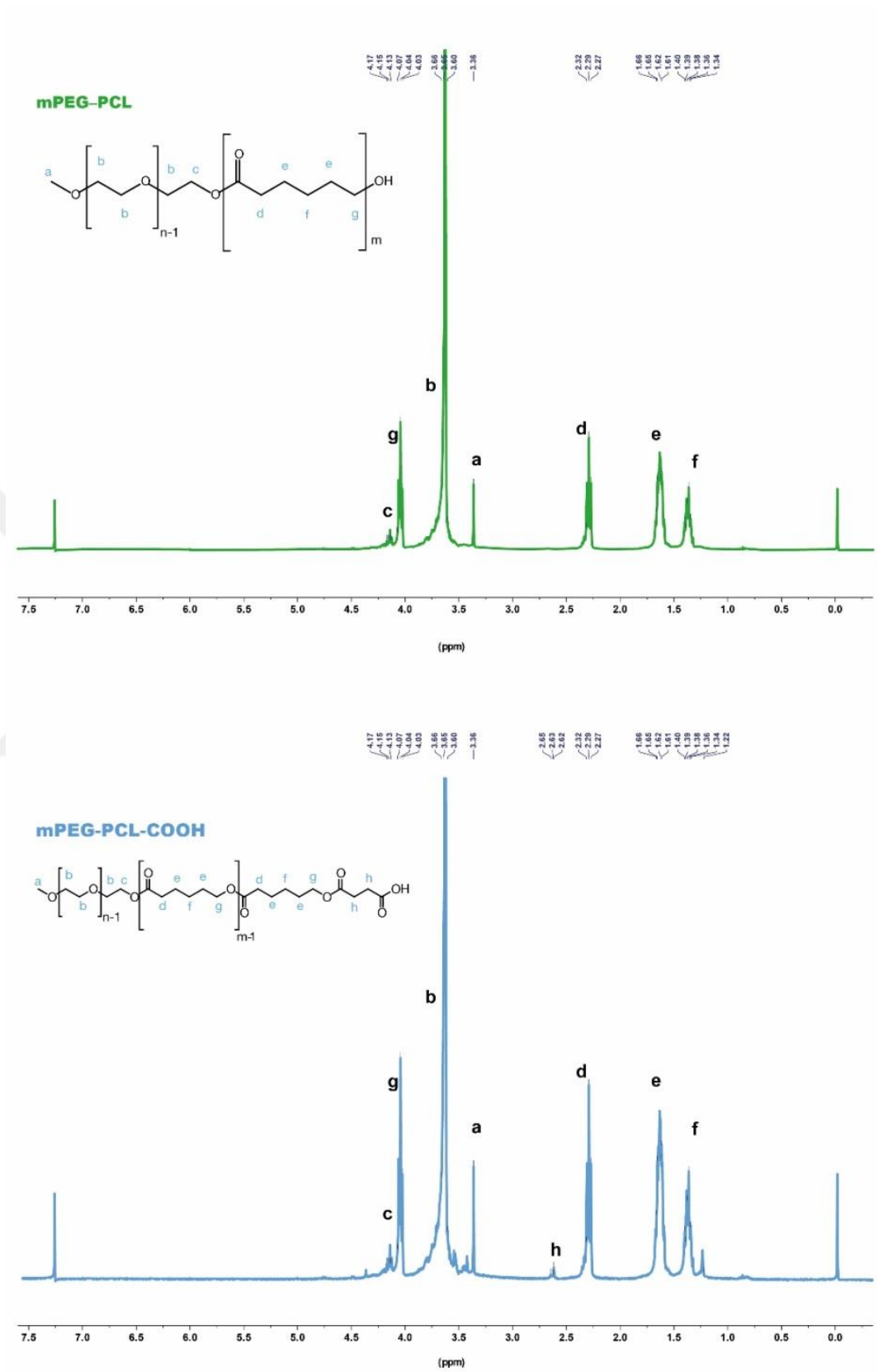


3.4 4.Bölüm: Teranostik Polimerzom; Hedeflenmiş-Akıllı İlaç Taşınımı İçin Histatin 5 ve Doksorubisin İçeren Metoksi PEG-b-poli kaprolakton Polimerinin Hazırlanması

Bu bölüm kapsamında hazırlanan teranostik polimerzomların yapıları $^1\text{H-NMR}$, FTIR ve DLS kullanılarak karakterize edildi (Şekil 3.16 ve 3.17). Öte yandan, farklı nanotaşıyıcıların boyutunu, dağılımını ve yüzey yükünü belirlemek için DLS analizi kullanıldı. DOX'un enkapsülasyonu ve fonksiyonlanması sonrasında partikül boyutunun büyüdüğü gözlemlendi (Çizelge 3.4). SEM sonuçları, tipik olarak gözlemlenen küresel polimerzom yapılarını gösteren DLS sonuçlarını doğruladığı görüldü (Şekil 3.18).



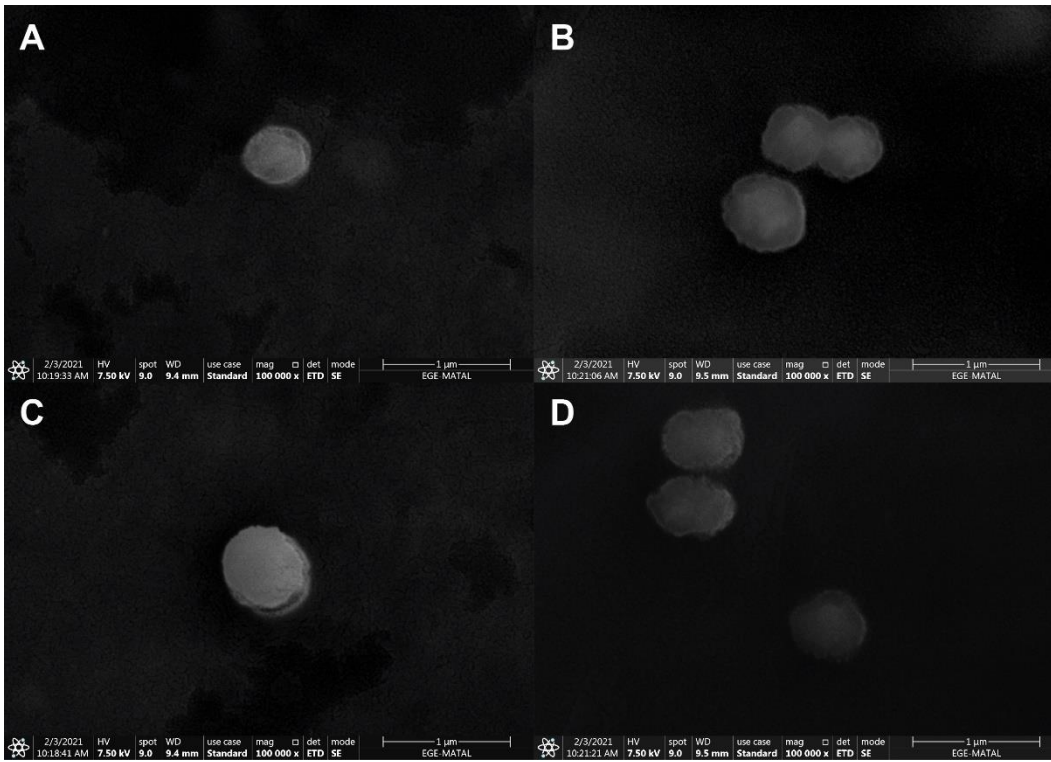
Şekil 3.16 Sentezlenen polimerzom çift blokunun FTIR sonuçları ve aktivasyonu.



Şekil 3.17 Polimerzom bileşenlerinin ^1H -NMR analizi.

Çizelge 3.4. Dokсорubisin enkapsülasyon etkinliği (EE%), mPEG-b-PCL polimerzomunun karakterizasyonu.

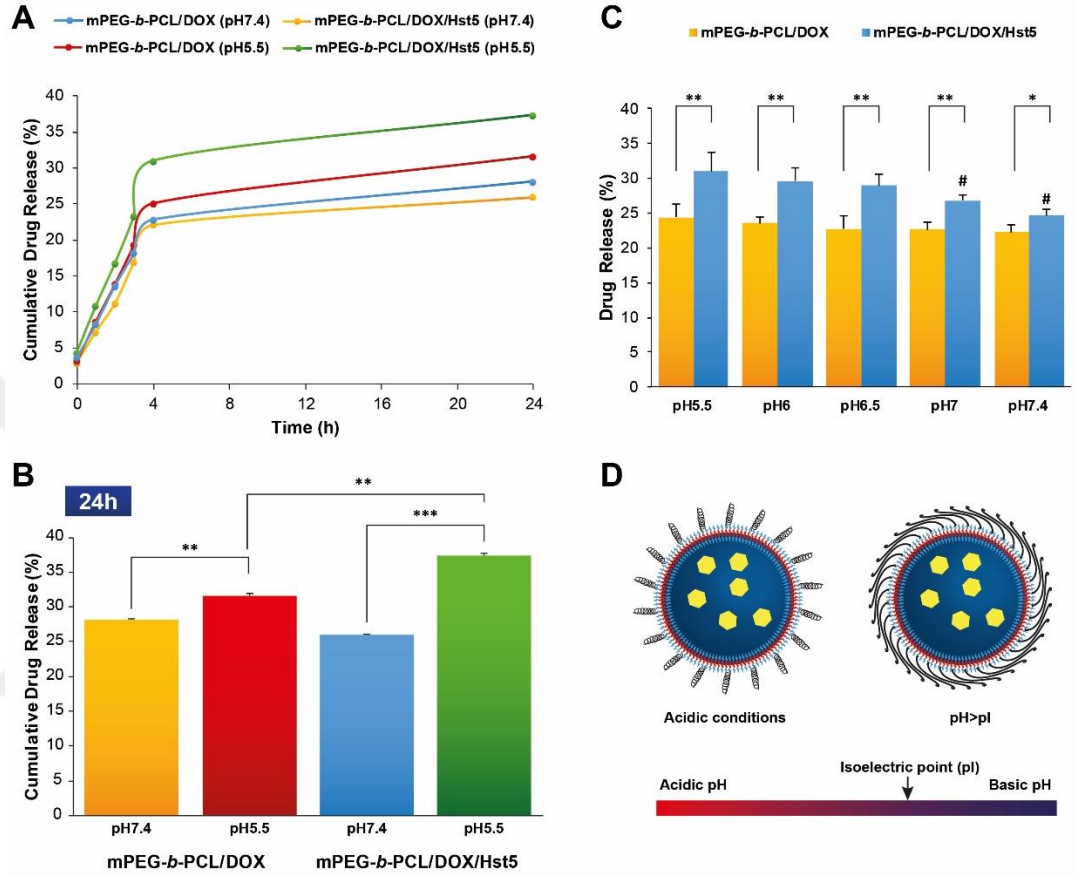
	Encapsulation efficacy (EE%)	Hst5 attachment (%)	Size (nm)	PDI	Zeta-Potential (mV)
mPEG-b-PCL	-	-	138.5 ± 20.53	0.683	-40.9 ± 3.47
mPEG-b-PCL/Hst5	-	81.82 ± 3.96	140.1 ± 23.68	0.271	-32.5 ± 5.7
mPEG-b-PCL/DOX	37.82 ± 3.78	-	145.6 ± 14.83	0.386	-37.2 ± 3.49
mPEG-b-PCL/DOX/Hst5	69.18 ± 1.62	79.32 ± 4.05	154.8 ± 15.13	0.312	-30.9 ± 7.62



Şekil 3.18 Polimerzomların SEM görüntüleri (100000X büyütme). (A) polimerzom (B) Polimerzom/Hst5, (C) Polimerzom/DOX, (D) Polimerzom/DOX/Hst5.

İlaç salınımının araştırılması iki farklı pH ortamında (pH 7.4 ve pH 5.5) gerçekleştirildi. Çeşitli polimerler arasındaki farklar, asidik koşullarda daha yüksek salım oranlarının gözlemlendiği üçüncü saatten başlayarak daha belirgin hale gelmektedir (Şekil 3.19 A). 24 saatte ilaç salınımı, Hst5'in varlığında ve yokluğunda, mPEG-b-PCL polimerzomlarının pH 5.5'te pH 7.4'e kıyasla daha yüksek salınıma sahip olduğunu gösterdi (Şekil 3.19 B). Sonuçlar, ilaç salınımının

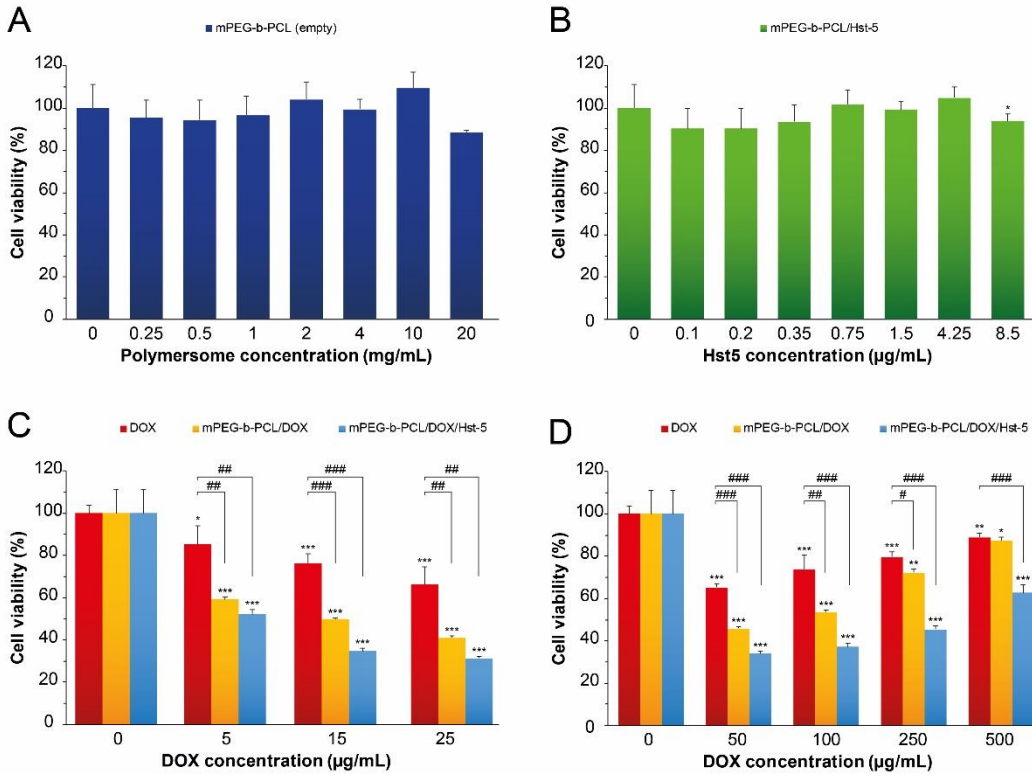
yaklaşık 4 saatte maksimuma ulaştığını göstermekte olup asidik ortamda yüksek salınımı indüklendiği belirlendi (Şekil 3.19 C). Şekil 3.19 D de Hst5'in salınımına etkisi davranışını farklı pH ortamlarında gösterildi.



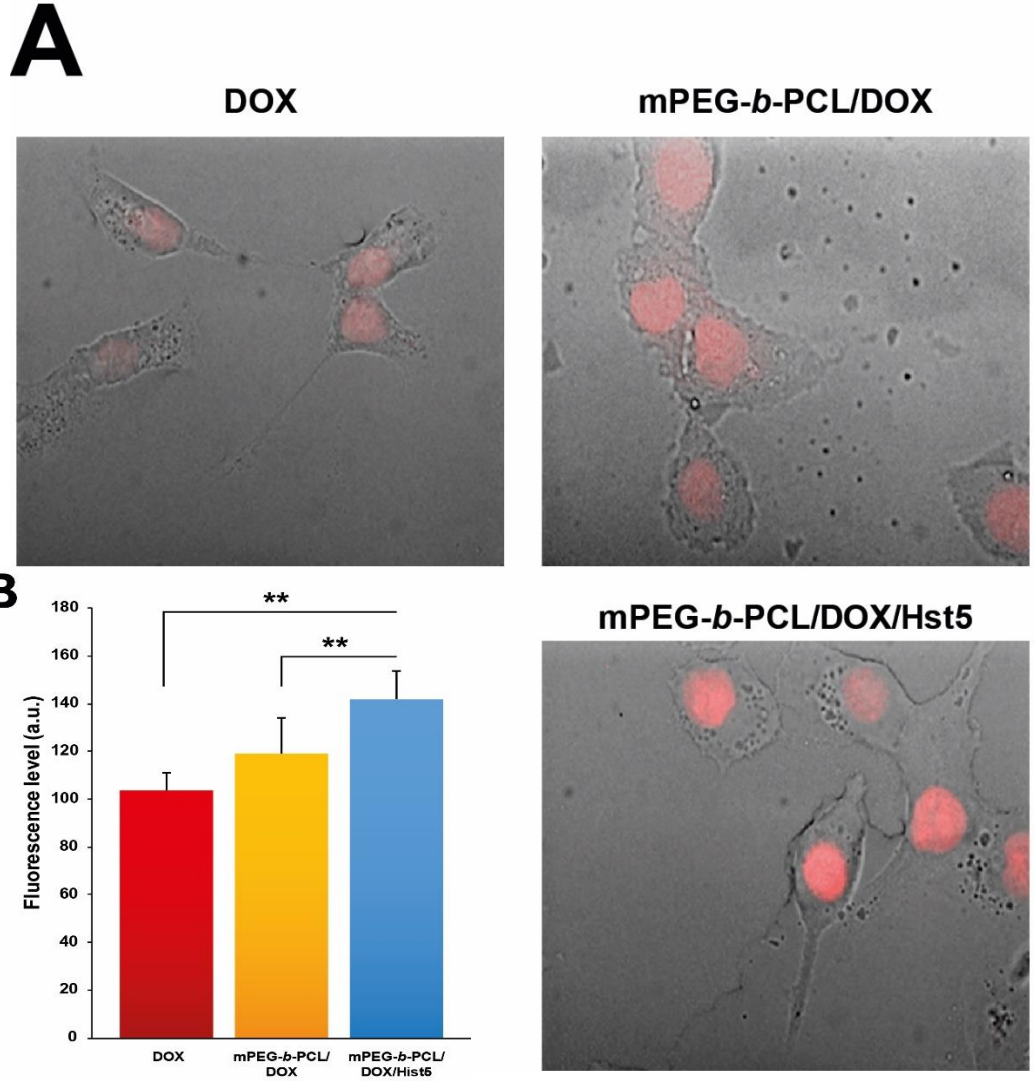
Şekil 3.19 Farklı pH larda kümülatif ilaç salınımı. (A) Fizyolojik koşullar (pH 7.4) ve asidik koşullar (pH 5.5) altında 24 saat boyunca zamana bağlı ilaç salınımı. (B) 24 saatte ilaç salınımının karşılaştırmalı analizi. (C) Tümör çevresi etrafındaki fizyolojik ve asidik gradienti taklit eden koşullar altında ilaç salımı gözlemi (4 saat inkübasyon). (D) Farklı pH koşulları altında Hst5'in davranışının şematik açıklaması. Gruplar arası istatistiksel anlamlılık **p<0.01 ve ***p<0.001'dir. #p<0.05, pH 5.5'te elde edilen değerlere kıyasla.

Boş mPEG-b-PCL polimerzomları ve Hst5-fonksiyonelleştirilmiş polimerzomlar düşük veya hiç toksisite göstermedi (Şekil 3.20 A-B). Doksorubisin iki tür davranış gösterdi. Antikanser aktivite, 5.0-25 µg/mL doz aralığı arasında doza bağımlı bir şekilde gösterilirken, diğer yandan daha yüksek dozlar, artan hücre canlılığı ile belirlenen daha düşük toksisite gösterdi (Şekil 3.20 C-D). DOX'un polimerzom

içinde kapsüllenmesi ile antikanser etkisinin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.20 C-D). DOX yüklü polimerzom ve Hst5 kombinasyonu, serbest DOX ile karşılaştırıldığında hücre toksisitesini %26-41 oranında artırdı. IC_{50} değerleri serbest DOX, Polimerzom/DOX ve Polimerzom/DOX/Hst5 için sırasıyla 46.13 ± 1.01 , 23.6 ± 0.77 ve 15.74 ± 1.45 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu. Son olarak, Hst5, test edilen tüm dozlar için polimerzom tarafından gözlemlenen etkilerini daha da attırdığı görüldü (Şekil 3.20 C-D). Floresan mikroskopisi sonuçlarından, hücre toksisite testine benzer gözlemler elde edildi. DOX'un kapsüllenmesi ve Hst5 ile fonksiyonlanmasından sonra artan floresan yoğunluğu gözlemlendi (Şekil 3.21). Tüm tedavi türleri için floresan varlığının çekirdekte odaklandığı gözlemlendi.



Şekil 3.20 Hst5 ile fonksiyonlanmış DOX yüklü polimerzomların antikanser etkisinin analizi. (A) Boş polimerzomun sitotoksitesi. (B) Hst5 işlevselleştirmesinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. (C) 5.0-25 $\mu\text{g/mL}$ dozlarda serbest DOX, polimerzom/DOX ve polimerzom/DOX/Hst5'in antikanser etkisi (D) 50 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ arasındaki üç formülasyonun analizi. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$ ile kontrol (0). *# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ ve ### $p < 0.001$ ile serbest DOX karşılaştırması.



Şekil 3.21 İlaç penetrasyonunun ve ilaç taşınımının belirlenmesi. (A) Floresan mikroskobu altında gözlenen hücreler (B) Gözlenen floresan ölçümü. $^{**}p < 0.01$ ve ücretsiz DOX.

İlaç taşınması için tasarlanan ideal nanotaşıyıcıların, hedef dokularda veya organlarda spesifik olarak birikme kabiliyetine sahip olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca, içeriklerini hücre içine iletmek için hücre zarını aşmaları gerekir (Torchilin 2008). Akümüasyon, tümör çevresinde pasif hedefleme ve sürekli salıverme yoluyla gerçekleştirilebilir veya reseptör/ligand (veya CPP'ler) etkileşimini ve ilaç dağıtımını kullanan aktif hedefleme yoluyla gerçekleştirilebilir (Das et al. 2020; Torchilin 2008; Xie et al. 2020; Xu et al. 2020; Yang et al. 2020). Nanotaşıyıcılar, içeriklerini akıllı bir şekilde iletebilecek ve belirli koşullar altında açılmaya imkân sağlayarak spesifik olmayan hücre penetrasyonundan kaçınacak şekilde

oluşturulmalıdır. Bu, nanotaşıyıcıların hedef dokuda birikmesine izin veren ve bazı özel koşullar altında (pH veya sıcaklık) içeriklerini ileten duyarlı kısımların dâhil edilmesiyle başarılabilir (Torchilin 2008).

Tüm bu bilgilerin değerlendirilmesi ile, metoksi poli(etilen glikol)-b-polikaprolakton (mPEG-b-PCL) çift bloğundan hazırlanan bir teranostik polimer çalışmanın bu bölümünde önerildi. Polimerzoma DOX yüklendi ve Hst5 ile fonksiyonlandı. Polipleks nanotaşıyıcı, spesifik hedefleme ve hücre penetrasyonuna izin veren bir CPP olan polimer ve Hst5 peptidi tarafından sağlanan pH ile aktive olan ve pH'ya duyarlı yapılara sahiptir. Ek olarak, doksorubisin kullanımı, kemoterapötik ve floresan özelliklerinden dolayı ikili bir kullanıma sahiptir. Bildiğimiz kadarıyla, bu, Hst5'in kanser tedavisi için polimerzoma bağlı hücreye nüfuz eden bir peptit olarak kullanılmasına ilişkin ilk rapordur. Aslında, polimerzom yapısının tek başına veya Hst5'in varlığında pH'a duyarlı bir özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Fizyolojik koşullarda (pH 7.4), polimerzomlar, 24 saat sonra salınan %25 ilaçla içeriklerini muhafaza edebildiler. Asidik koşullarda (pH 5.5) salınımın daha hızlı arttığı gözlemlendi. Daha önceki bir çalışmada, poli(etilen oksit)-b-poli(kaprolakton) (mPEG-b-PCL) çift bloklu polimerlere dayalı ilaç dağıtımı için pH'a duyarlı bir polimer yapısı önerilmişti. Hazırlanan yapının, yüklü ilaç etkisini arttırabildiği ve içeriğini asidik koşullar altında serbest bıraktığı gözlenmiştir (Ghorbanizamani et al. 2020). Bununla birlikte asidik koşullar altında reaksiyona başlamak için aktivasyon gecikmesinde (birkaç saat) bu yapıların dezavantajıdır (Park et al. 2019). Bu zorluklar, farklı uyarıcılar ile hedefleme için kullanılabilecek daha spesifik yapılara olan ihtiyacı vurgulamaktadır. Antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) ve CPP'ler gibi peptitler, tümörlerin pH ortamını hedeflemek için ilgi çekici seçeneklerdir. Penetrasyon yetenekleri ve zardan geçmeleriyle bilinirler. Kanser tedavisi için nano taşıyıcılarla birleştirilmiş tedaviler veya vektörler olarak kullanılmışlardır (Alves et al. 2015; Ng et al. 2016).

Hst5'in farklı ortamlardaki davranışı, ilaç dağıtımında uygulanması çok ilginç bir kavramdır. Hst5, fizyolojik koşullar altında rastgele bir yapıdadır ve genellikle tümör ortamında bulunan asidik koşullarda aktif bir α -sarmal formuna dönüşür

(Moulahoum et al. 2020; Seo et al. 2012). Bu nedenle polimerzomun Hst5 ile fonksiyonlanması ile polimerzomun pH-duyarlılığının artırılarak, spesifik ilaç dağıtımına yönelik bir tasarım gerçekleştirildi. Verilerimiz, Hst5 ilavesiyle kapsüllemeden sonra DOX'un anti-kanser aktivitesinde önemli bir artış olduğunu ortaya koydu. Kapsülleme ve fonksiyonlamadan sonra daha düşük IC₅₀ değerlerinin elde edilmesi de tedaviye hücre duyarlılığında bir artış ile yansımıştır Hücre kültürü araştırmalarımızın ikinci kısmı, hücrelerde direnç neden olabilecek yüksek doz tedavilerin kullanımının değerlendirilmesine yönelik olarak gerçekleştirildi. Kemoterapide en çok kullanılan antikanser ilaçlarından biri olan doksorubisin, çoklu ilaç direncinin (MDR) ortaya çıkması, sağlıklı dokulara zarar vermesi ve diğer kritik organlara toksisitesi gibi birçok dezavantaja sahiptir (Chao et al. 2017). Yüksek doz kemoterapinin ilaç direncinin ortaya çıkmasını önlediğine dair bir inanç vardır. Ancak, bu yaklaşımı kanıtlamak için yeterli bilimsel veri yoktur. Aksine, artan ilaç miktarları ile direnç oluşumu arasında tek yönlü bir bağlantı olduğu savunulmaktadır (Day and Read 2016). Elde edilen veriler, yüksek dozda serbest DOX'un daha az etkili hale geldiği önceki ifadeyle tutarlıdır. DOX'un Hst5 fonksiyonlanması ile kapsüllenmesi, DOX ve diğer kemoterapötik ajanlarda görülen dezavantajların üstesinden gelebilecek daha verimli bir etki gösterdiği gözlemlendi.

Hücrelerde DOX birikimi, floresan mikroskobu kullanılarak araştırıldı. DOX'un hücre içi varlığı, kapsülleme ve Hst5 fonksiyonlanmasından sonra artmaktadır. DOX'un varlığı esas olarak çekirdek bölgesinde görüldü. Bu, inkübasyonun uzunluğuna ve muhtemelen hücrelerde endositoz ve çekirdeğin çevresine iletilen endozomlara yönlendirilmesine bağlanabilir (Chao et al. 2017).

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Bu tez çalışmasında, çeşitli fonksiyonlara sahip doğal peptitlerin kullanımı yoluyla yaşlanmaya bağlı hastalıkların tedavisinde teranostik uygulamalar için nanotaşıyıcı platform geliştirilmesi temel olarak amaçlanmıştır. Çalışma 4 bölümden oluşmakta olup yaşlanma ile ilgili protein modifikasyonlarının önlenmesi/tedavisi için uygun peptitlerin seçilmesi ilk olarak gerçekleştirildi. Ek olarak, metallerin peptit aktiviteleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Başlangıçta, çinko varlığının antiglikatif yeteneği üzerindeki etkisini araştırmak için bir dipeptid olan karnosin seçildi. Bir sonraki adımda, karnosinin lipid bazlı nano taşıyıcılar “Niozomlar” içinde enkapsülasyonu ile etkinin uzun süreli salınımının ile gerçekleştiği gösterildi. Daha sonra, niozomlar ve polimerzomlar dahil olmak üzere iki tür nanotaşıyıcı karşılaştırmalı olarak protein glikoksidasyon üzerine etkileri araştırıldı. Burada, antiglikasyon ve antikanser etkilerine ek olarak, polimerik bazlı bir nanoformülasyonun terapötik yaklaşımın daha iyi kontrolünü ve stabilitesini sağladığını gösterildi. Son adımda ise, önceki deneylerden elde edilen verilerin ve deneyimlerin kullanılması ile doksorubisin (floresan kapasiteli antikanser ajan) ile yüklü bir polimer kullanılarak teranostik bir platform formüle edildi. Polimerzomların yüzeyi, histatin-5 adı verilen bir CPP'nin eklenmesiyle biyofonksiyonelleştirildi. Aslında, sonuçlar, böyle bir teranostik yaklaşımın kullanılmasının, serbest moleküller veya biyokonjuge olmayan polimerzomlara kıyasla daha iyi ilaç iletimi sağladığını gösterdi. Bu formülasyon, kanserin tanısı ve tedavisi için CPP'leri nano taşıyıcılarla birleştiren türünün ilk örneğidir. Gelecekte, yapıyı daha da geliştirmek ve peptidlerin uyarıcılara yanıt verebilirliğini daha ayrıntılı araştırılmasına temel olacak bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Kullanılan peptitlerin metal bağlama kapasiteleri olmasına rağmen, mevcut tez bu özelliği yeterince araştırmamıştır ve metallerin önerilen nanotaşıyıcının teranostik kapasiteleri üzerindeki etkisini incelemek büyük bir etkiye sahip olacaktır. Son olarak, bu çalışmanın potansiyelini daha fazla vurgulamak için hayvan deneylerine büyük ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adamo G, Grimaldi N, Campora S, Antonietta M, Sabatin CD, Ghersia GJCE (2014) Glutathione-sensitive nanogels for drug release Chemical Engineering Transactions 38:457-462 doi:10.3303/CET1438077
- Adams TE, Hockin MF, Mann KG, Everse SJ (2004) The crystal structure of activated protein C-inactivated bovine factor Va: Implications for cofactor function Proc Natl Acad Sci U S A 101:8918-8923 doi:10.1073/pnas.0403072101
- Ahmed N, Thornalley PJ (2003) Quantitative screening of protein biomarkers of early glycation, advanced glycation, oxidation and nitrosation in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring Biochem Soc Trans 31:1417-1422 doi:10.1042/bst0311417
- Al-Hilaly YK et al. (2013) A central role for dityrosine crosslinking of Amyloid-beta in Alzheimer's disease Acta Neuropathol Commun 1:83 doi:10.1186/2051-5960-1-83
- Alam P et al. (2017a) Ascorbic acid inhibits human insulin aggregation and protects against amyloid induced cytotoxicity Archives of biochemistry and biophysics 621:54-62 doi:10.1016/j.abb.2017.04.005
- Alam P, Chaturvedi SK, Siddiqi MK, Rajpoot RK, Ajmal MR, Zaman M, Khan RH (2016) Vitamin k3 inhibits protein aggregation: Implication in the treatment of amyloid diseases Scientific reports 6:26759 doi:10.1038/srep26759
- Alam P, Siddiqi K, Chaturvedi SK, Khan RH (2017b) Protein aggregation: From background to inhibition strategies Int J Biol Macromol 103:208-219 doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.048

- Alam P, Siddiqi MK, Chaturvedi SK, Zaman M, Khan RH (2017c) Vitamin B12 offers neuronal cell protection by inhibiting Abeta-42 amyloid fibrillation Int J Biol Macromol 99:477-482 doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.001
- Alam P, Siddiqi MK, Malik S, Chaturvedi SK, Uddin M, Khan RH (2019) Elucidating the inhibitory potential of Vitamin A against fibrillation and amyloid associated cytotoxicity Int J Biol Macromol 129:333-338 doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.134
- Alavi NM, Alami L, Taefi S, Gharabagh GS (2011) Factor analysis of self-treatment in diabetes mellitus: a cross-sectional study BMC public health 11:761 doi:10.1186/1471-2458-11-761
- Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC (2008) Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles Mol Pharm 5:505-515 doi:10.1021/mp800051m
- Alibolandi M et al. (2017) Extensive preclinical investigation of polymersomal formulation of doxorubicin versus Doxil-mimic formulation J Control Release 264:228-236 doi:10.1016/j.jconrel.2017.08.030
- Aloisi A, Barca A, Romano A, Guerrieri S, Storelli C, Rinaldi R, Verri T (2013) Anti-aggregating effect of the naturally occurring dipeptide carnosine on abeta1-42 fibril formation PLoS One 8:e68159 doi:10.1371/journal.pone.0068159
- Aluri S, Janib SM, Mackay JA (2009) Environmentally responsive peptides as anticancer drug carriers Adv Drug Deliv Rev 61:940-952 doi:10.1016/j.addr.2009.07.002
- Alves ID, Carré M, Lavielle S (2015) A Pathway Toward Tumor Cell-Selective CPPs? In: Langel Ü (ed) Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols. Springer New York, New York, NY, pp 279-301. doi:10.1007/978-1-4939-2806-4_18

- Arias LS, Pessan JP, Vieira APM, Lima TMT, Delbem ACB, Monteiro DR (2018) Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity Antibiotics (Basel) 7 doi:10.3390/antibiotics7020046
- Attanasio F et al. (2009) Protective effects of L- and D-carnosine on alpha-crystallin amyloid fibril formation: implications for cataract disease Biochemistry 48:6522-6531 doi:10.1021/bi900343n
- Attanasio F et al. (2013) Carnosine inhibits Abeta(42) aggregation by perturbing the H-bond network in and around the central hydrophobic cluster ChemBioChem 14:583-592 doi:10.1002/cbic.201200704
- Awasthi S, Saraswathi NT (2016) Sinigrin, a major glucosinolate from cruciferous vegetables restrains non-enzymatic glycation of albumin Int J Biol Macromol 83:410-415 doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.019
- Aydin AF, Kucukgergin C, Coban J, Dogan-Ekici I, Dogru-Abbasoglu S, Uysal M, Kocak-Toker N (2018) Carnosine prevents testicular oxidative stress and advanced glycation end product formation in D-galactose-induced aged rats Andrologia 50 doi:10.1111/and.12939
- Baek M, Kim IS, Yu J, Chung HE, Choy JH, Choi SJ (2011) Effect of different forms of anionic nanoclays on cytotoxicity J Nanosci Nanotechnol 11:1803-1806 doi:10.1166/jnn.2011.3408
- Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS (2004) Noninvasive imaging of quantum dots in mice Bioconjug Chem 15:79-86 doi:10.1021/bc034153y
- Baran EJ (2000) Metal complexes of carnosine Biochemistry Biokhimiia 65:789-797

- Barlas FB, Demir B, Guler E, Senisik AM, Arican HA, Unake P, Timur S (2016) Multimodal theranostic assemblies: double encapsulation of protoporphyrine-IX/Gd³⁺ in niozomes Rsc Advances 6:30217-30225 doi:10.1039/c5ra26737d
- Barondeau DP, Getzoff ED (2004) Structural insights into protein-metal ion partnerships Curr Opin Struct Biol 14:765-774 doi:10.1016/j.sbi.2004.10.012
- Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA, Getzoff ED (2004) Nickel superoxide dismutase structure and mechanism Biochemistry 43:8038-8047 doi:10.1021/bi0496081
- Batist G et al. (2009) Safety, pharmacokinetics, and efficacy of CPX-1 liposome injection in patients with advanced solid tumors Clin Cancer Res 15:692-700 doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0515
- Bauer K (2005) Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain Neurochemical research 30:1339-1345 doi:10.1007/s11064-005-8806-z
- Bawa P, Pillay V, Choonara YE, du Toit LC (2009) Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery Biomed Mater 4:022001 doi:10.1088/1748-6041/4/2/022001
- Bayne WF, Mayer LD, Swenson CE (2009) Pharmacokinetics of CPX-351 (cytarabine/daunorubicin HCl) liposome injection in the mouse J Pharm Sci 98:2540-2548 doi:10.1002/jps.21620
- Baynes JW (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes Diabetes 40:405-412 doi:10.2337/diab.40.4.405
- Behzadi S et al. (2017) Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell Chemical Society reviews 46:4218-4244 doi:10.1039/c6cs00636a

- Bellia F, Vecchio G, Rizzarelli E (2012) Carnosine derivatives: new multifunctional drug-like molecules *Amino Acids* 43:153-163 doi:10.1007/s00726-011-1178-6
- Berkessel A, Herault DA (1999) Discovery of peptide-zirconium complexes that mediate phosphate hydrolysis by batch screening of a combinatorial undecapeptide library *Angewandte Chemie-International Edition* 38:102-105 doi:10.1002/(Sici)1521-3773(19990115)38:1/2<102::Aid-Anie102>3.0.Co;2-H
- Bhattacharjee S et al. (2010) Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells *Part Fibre Toxicol* 7:25 doi:10.1186/1743-8977-7-25
- Blanco E, Shen H, Ferrari M (2015) Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery *Nature biotechnology* 33:941-951 doi:10.1038/nbt.3330
- Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR (2016) Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date *Pharm Res* 33:2373-2387 doi:10.1007/s11095-016-1958-5
- Brambilla D et al. (2011) Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues *Nanomedicine* 7:521-540 doi:10.1016/j.nano.2011.03.008
- Brender JR et al. (2010) Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation *J Am Chem Soc* 132:8973-8983 doi:10.1021/ja1007867
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis *Adv Drug Deliv Rev* 54:631-651 doi:10.1016/s0169-409x(02)00044-3

- Brownlee M (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging *Annu Rev Med* 46:223-234 doi:10.1146/annurev.med.46.1.223
- Calabrese V et al. (2005) Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures *Neurochemical research* 30:797-807 doi:10.1007/s11064-005-6874-8
- Cararo JH, Streck EL, Schuck PF, Ferreira Gda C (2015) Carnosine and Related Peptides: Therapeutic Potential in Age-Related Disorders *Aging and disease* 6:369-379 doi:10.14336/AD.2015.0616
- Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ (2005) The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis *Nat Rev Cancer* 5:786-795 doi:10.1038/nrc1713
- Carpenter CP, Woodside MD, Kinkead ER, King JM, Sullivan LJ (1971) Response of dogs to repeated intravenous injection of polyethylene glycol 4000 with notes on excretion and sensitization *Toxicol Appl Pharmacol* 18:35-40 doi:10.1016/0041-008x(71)90312-7
- Carvalho AN, Lim JL, Nijland PG, Witte ME, Van Horssen J (2014) Glutathione in multiple sclerosis: more than just an antioxidant? *Mult Scler* 20:1425-1431 doi:10.1177/1352458514533400
- Casey JL, Coley AM, Tilley LM, Foley M (2000) Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools *Protein Eng* 13:445-452 doi:10.1093/protein/13.6.445
- Chao Y et al. (2017) Biodegradable Polymersomes as Nanocarriers for Doxorubicin Hydrochloride: Enhanced Cytotoxicity in MCF-7/ADR Cells and Prolonged Blood Circulation *Pharm Res* 34:610-618 doi:10.1007/s11095-016-2088-9
- Chari RV (2008) Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs *Acc Chem Res* 41:98-107 doi:10.1021/ar700108g

- Chen AM, Zhang M, Wei D, Stueber D, Taratula O, Minko T, He H (2009) Co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells *Small* 5:2673-2677 doi:10.1002/sml.200900621
- Chimento DP, Mohanty AK, Kadner RJ, Wiener MC (2003) Substrate-induced transmembrane signaling in the cobalamin transporter BtuB *Nat Struct Biol* 10:394-401 doi:10.1038/nsb914
- Chiti F, Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease vol 75. doi:10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901
- Chiti F, Dobson CM (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions *Nature chemical biology* 5:15-22 doi:10.1038/nchembio.131
- Conchillo-Sole O, de Groot NS, Aviles FX, Vendrell J, Daura X, Ventura S (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides *BMC bioinformatics* 8:65 doi:10.1186/1471-2105-8-65
- Conde R, Arguello M, Izquierdo J, Noguez R, Moreno M, Lanz H (2012) Natural Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *InTech*. doi:10.5772/33293
- Conklin SE, Bridgman EC, Su Q, Riggs-Gelasco P, Haas KL, Franz KJ (2017) Specific Histidine Residues Confer Histatin Peptides with Copper-Dependent Activity against *Candida albicans* *Biochemistry* 56:4244-4255 doi:10.1021/acs.biochem.7b00348
- Corona C et al. (2011) Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice *PLoS One* 6:e17971 doi:10.1371/journal.pone.0017971

- Couvreux P, Vauthier C (2006) Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease *Pharm Res* 23:1417-1450 doi:10.1007/s11095-006-0284-8
- Das SS et al. (2020) Stimuli-Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery, Imaging, and Theragnosis *Polymers* 12 doi:10.3390/polym12061397
- Davoudi Z et al. (2014) Molecular target therapy of AKT and NF- κ B signaling pathways and multidrug resistance by specific cell penetrating inhibitor peptides in HL-60 cells *Asian Pac J Cancer Prev* 15:4353-4358 doi:10.7314/apjcp.2014.15.10.4353
- Day T, Read AF (2016) Does High-Dose Antimicrobial Chemotherapy Prevent the Evolution of Resistance? *PLoS Comput Biol* 12:e1004689 doi:10.1371/journal.pcbi.1004689
- de Oliveira GA, Rangel LP, Costa DC, Silva JL (2015) Misfolding, Aggregation, and Disordered Segments in c-Abl and p53 in Human Cancer *Front Oncol* 5:97 doi:10.3389/fonc.2015.00097
- de Sousa-Pereira P, Amado F, Abrantes J, Ferreira R, Esteves PJ, Vitorino R (2013) An evolutionary perspective of mammal salivary peptide families: cystatins, histatins, statherin and PRPs *Arch Oral Biol* 58:451-458 doi:10.1016/j.archoralbio.2012.12.011
- Demirbilek ME, Kilic N, Komurcu HF, Akin KO (2007) Advanced Oxidation Protein Products in Aged with Dementia *American Journal of Immunology* 3:52-55 doi:10.3844/ajisp.2007.52.55
- Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery *Trends Cell Biol* 8:84-87 doi:10.1016/s0962-8924(98)80017-2

- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes
The Journal of biological chemistry 269:10444-10450
- DeVita VT, Jr., Young RC, Canellos GP (1975) Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer
Cancer 35:98-110 doi:10.1002/1097-0142(197501)35:1<98::aid-cncr2820350115>3.0.co;2-b
- Dieu LH, Wu D, Palivan CG, Balasubramanian V, Huwyler J (2014) Polymersomes conjugated to 83-14 monoclonal antibodies: in vitro targeting of brain capillary endothelial cells Eur J Pharm Biopharm 88:316-324 doi:10.1016/j.ejpb.2014.05.021
- DiMarco T, Giulivi C (2007) Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples Mass Spectrom Rev 26:108-120 doi:10.1002/mas.20109
- Dinca A, Chien WM, Chin MT (2016) Intracellular Delivery of Proteins with Cell-Penetrating Peptides for Therapeutic Uses in Human Disease Int J Mol Sci 17:263 doi:10.3390/ijms17020263
- Ding J et al. (2019) Engineered nanomedicines with enhanced tumor penetration Nano Today 29:100800 doi:<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2019.100800>
- Discher DE, Ahmed F (2006) Polymersomes Annu Rev Biomed Eng 8:323-341 doi:10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095838
- Dou Y, Hynynen K, Allen C (2017) To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes Journal of Controlled Release 249:63-73 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.025>

- Drummond DC, Hong K, Park JW, Benz CC, Kirpgtin DB (2000) Liposome targeting to tumors using vitamin and growth factor receptors. Elsevier. doi:10.1016/s0083-6729(00)60022-5
- Dubikovskaya EA, Thorne SH, Pillow TH, Contag CH, Wender PA (2008) Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters Proc Natl Acad Sci U S A 105:12128-12133 doi:10.1073/pnas.0805374105
- Duncan R (2009) Development of HPMA copolymer-anticancer conjugates: clinical experience and lessons learnt Adv Drug Deliv Rev 61:1131-1148 doi:10.1016/j.addr.2009.05.007
- Durán-Lobato M, Niu Z, Alonso MJ (2020) Oral Delivery of Biologics for Precision Medicine Advanced Materials 32:1901935 doi:<https://doi.org/10.1002/adma.201901935>
- El-Andaloussi S, Holm T, Langel U (2005) Cell-penetrating peptides: mechanisms and applications Curr Pharm Des 11:3597-3611 doi:10.2174/138161205774580796
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups Archives of biochemistry and biophysics 82:70-77 doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6
- Elmqvist A, Lindgren M, Bartfai T, Langel U (2001) VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions Exp Cell Res 269:237-244 doi:10.1006/excr.2001.5316
- Emilienne Soma C, Dubernet C, Bentolila D, Benita S, Couvreur P (2000) Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles Biomaterials 21:1-7 doi:10.1016/s0142-9612(99)00125-8

- Ensign LM, Cone R, Hanes J (2012) Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers *Advanced Drug Delivery Reviews* 64:557-570 doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009>
- Esteras-Chopo A, Serrano L, Lopez de la Paz M (2005) The amyloid stretch hypothesis: recruiting proteins toward the dark side *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16672-16677 doi:10.1073/pnas.0505905102
- Ezzat K, El Andaloussi S, Abdo R, Langel U (2010) Peptide-based matrices as drug delivery vehicles *Curr Pharm Des* 16:1167-1178 doi:10.2174/138161210790963832
- Farokhzad OC et al. (2006) Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6315-6320 doi:10.1073/pnas.0601755103
- Farokhzad OC, Langer R (2009) Impact of nanotechnology on drug delivery *ACS Nano* 3:16-20 doi:10.1021/nn900002m
- Fei L, Yap LP, Conti PS, Shen WC, Zaro JL (2014) Tumor targeting of a cell penetrating peptide by fusing with a pH-sensitive histidine-glutamate co-oligopeptide *Biomaterials* 35:4082-4087 doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.047
- Feldman EJ et al. (2011) First-in-man study of CPX-351: a liposomal carrier containing cytarabine and daunorubicin in a fixed 5:1 molar ratio for the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia *J Clin Oncol* 29:979-985 doi:10.1200/JCO.2010.30.5961
- Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins *Nature biotechnology* 22:1302-1306 doi:10.1038/nbt1012

- Ferrao-Gonzales AD, Souto SO, Silva JL, Foguel D (2000) The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6445-6450 doi:10.1073/pnas.97.12.6445
- Fischer PM (2007) Cellular uptake mechanisms and potential therapeutic utility of peptidic cell delivery vectors: progress 2001-2006 *Med Res Rev* 27:755-795 doi:10.1002/med.20093
- Fleige E, Quadir MA, Haag R (2012) Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications *Adv Drug Deliv Rev* 64:866-884 doi:10.1016/j.addr.2012.01.020
- Fonseca SB, Pereira MP, Kelley SO (2009) Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications *Adv Drug Deliv Rev* 61:953-964 doi:10.1016/j.addr.2009.06.001
- Forget KJ, Tremblay G, Roucou X (2013) p53 Aggregates penetrate cells and induce the co-aggregation of intracellular p53 *PLoS One* 8:e69242 doi:10.1371/journal.pone.0069242
- Foroozandeh P, Aziz AA (2018) Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles *Nanoscale Res Lett* 13:339-339 doi:10.1186/s11671-018-2728-6
- Frousios KK, Iconomidou VA, Karletidi CM, Hamodrakas SJ (2009) Amyloidogenic determinants are usually not buried *BMC Struct Biol* 9:44 doi:10.1186/1472-6807-9-44
- Fu Q, Dai H, Hu W, Fan Y, Shen Y, Zhang W, Chen Z (2008) Carnosine protects against Abeta42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells *Cellular and molecular neurobiology* 28:307-316 doi:10.1007/s10571-007-9235-0

- Futaki S, Nakase I, Tadokoro A, Takeuchi T, Jones AT (2007) Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms *Biochem Soc Trans* 35:784-787 doi:10.1042/BST0350784
- Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y (2003) Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies *Clin Pharmacokinet* 42:419-436 doi:10.2165/00003088-200342050-00002
- Galiniak S, Bartosz G, Sadowska-Bartos I (2017) Glutathione is the main endogenous inhibitor of protein glycation *Gen Physiol Biophys* 36:175-186 doi:10.4149/gpb_2016044
- Ganta S, Amiji M (2009) Coadministration of Paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells *Mol Pharm* 6:928-939 doi:10.1021/mp800240j
- Garcia J, Gerber SH, Sugita S, Sudhof TC, Rizo J (2004) A conformational switch in the Piccolo C2A domain regulated by alternative splicing *Nat Struct Mol Biol* 11:45-53 doi:10.1038/nsmb707
- Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A (2018) Niozome: A Promising Nanocarrier for Natural Drug Delivery through Blood-Brain Barrier *Advances in pharmacological sciences* 2018:6847971 doi:10.1155/2018/6847971
- Ghorbanizamani F, Moulahoum H, Sanli S, Bayir E, Zihnioglu F, Timur S (2020) pH-bioresponsive poly(epsilon-caprolactone)-based polymersome for effective drug delivery in cancer and protein glycoxidation prevention *Archives of biochemistry and biophysics* 695:108643 doi:10.1016/j.abb.2020.108643
- Giacco F, Brownlee M (2010) Oxidative stress and diabetic complications *Circ Res* 107:1058-1070 doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223545

- Giulivi C, Traaseth NJ, Davies KJ (2003) Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance *Amino Acids* 25:227-232 doi:10.1007/s00726-003-0013-0
- Gladyshev VN (2012) On the cause of aging and control of lifespan: heterogeneity leads to inevitable damage accumulation, causing aging; control of damage composition and rate of accumulation define lifespan *Bioessays* 34:925-929 doi:10.1002/bies.201200092
- Gladyshev VN (2013) The origin of aging: imperfectness-driven non-random damage defines the aging process and control of lifespan *Trends Genet* 29:506-512 doi:10.1016/j.tig.2013.05.004
- Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM (2004) Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains *Bioconjug Chem* 15:897-900 doi:10.1021/bc049951i
- Grogan J, McKnight CJ, Troxler RF, Oppenheim FG (2001) Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5 *FEBS Lett* 491:76-80 doi:10.1016/s0014-5793(01)02157-3
- Grzebyk E, Piwowar A (2016a) Inhibition of glycoxidative modification of proteins by some substances of natural origin *Herba Polonica* 62:66-82 doi:10.1515/hepo-2016-0006
- Grzebyk E, Piwowar A (2016b) Inhibitory actions of selected natural substances on formation of advanced glycation endproducts and advanced oxidation protein products *BMC Complement Altern Med* 16:381 doi:10.1186/s12906-016-1353-0
- Gump JM, June RK, Dowdy SF (2010) Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction *The Journal of biological chemistry* 285:1500-1507 doi:10.1074/jbc.M109.021964

- Guo Z, Peng H, Kang J, Sun D (2016) Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications *Biomed Rep* 4:528-534 doi:10.3892/br.2016.639
- Hamodrakas SJ (2011) Protein aggregation and amyloid fibril formation prediction software from primary sequence: towards controlling the formation of bacterial inclusion bodies *FEBS J* 278:2428-2435 doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08164.x
- Hamodrakas SJ, Liappa C, Iconomidou VA (2007) Consensus prediction of amyloidogenic determinants in amyloid fibril-forming proteins *Int J Biol Macromol* 41:295-300 doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.03.008
- Handa O et al. (2002) Inhibitory effect of polaprezinc on the inflammatory response to *Helicobacter pylori* *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 16:785-789 doi:10.1155/2002/631070
- Harman D (1981) The aging process *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7124-7128 doi:10.1073/pnas.78.11.7124
- Hayashi N, Kipriyanov S, Fuchs P, Welschof M, Dorsam H, Little M (1995) A single expression system for the display, purification and conjugation of single-chain antibodies *Gene* 160:129-130 doi:10.1016/0378-1119(95)00218-u
- He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C (2010) Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles *Biomaterials* 31:3657-3666 doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.065
- Helmerhorst EJ et al. (1999) The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion *The Journal of biological chemistry* 274:7286-7291 doi:10.1074/jbc.274.11.7286

- Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG (2001) The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14637-14642 doi:10.1073/pnas.141366998
- Helmfors H, Eriksson J, Langel U (2015) Optimized luciferase assay for cell-penetrating peptide-mediated delivery of short oligonucleotides *Anal Biochem* 484:136-142 doi:10.1016/j.ab.2015.05.023
- Hill TL, Blikslager AT (2012) Effect of a zinc L-carnosine compound on acid-induced injury in canine gastric mucosa *ex vivo* *American journal of veterinary research* 73:659-663 doi:10.2460/ajvr.73.5.659
- Hipkiss AR (2005) Glycation, ageing and carnosine: are carnivorous diets beneficial? *Mech Ageing Dev* 126:1034-1039 doi:10.1016/j.mad.2005.05.002
- Hipkiss AR (2007) Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 11:229-240 doi:10.3233/jad-2007-11210
- Hipkiss AR (2009a) Carnosine, diabetes and Alzheimer's disease Expert review of neurotherapeutics 9:583-585 doi:10.1586/ern.09.32
- Hipkiss AR (2009b) Chapter 3 Carnosine and Its Possible Roles in Nutrition and Health. Elsevier. doi:10.1016/s1043-4526(09)57003-9
- Hipkiss AR, Brownson C, Carrier MJ (2001) Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups *Mech Ageing Dev* 122:1431-1445 doi:10.1016/S0047-6374(01)00272-X
- Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P (1995) Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent *FEBS Lett* 371:81-85 doi:10.1016/0014-5793(95)00849-5

- Honary S, Zahir F (2013) Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2) Tropical Journal of Pharmaceutical Research 12:265-273 doi:10.4314/tjpr.v12i2.20
- Hu C-MJ, Zhang L (2012) Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer Biochemical Pharmacology 83:1104-1111 doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.008>
- Hu X, Jing X (2009) Biodegradable amphiphilic polymer-drug conjugate micelles Expert Opin Drug Deliv 6:1079-1090 doi:10.1517/17425240903158917
- Huang X, Pieczko ME, Long EC (1999) Combinatorial optimization of the DNA cleaving Ni(II) x Xaa-Xaa-His metallotriptide domain Biochemistry 38:2160-2166 doi:10.1021/bi982587o
- Huang Y et al. (2013) Curb challenges of the "Trojan Horse" approach: smart strategies in achieving effective yet safe cell-penetrating peptide-based drug delivery Adv Drug Deliv Rev 65:1299-1315 doi:10.1016/j.addr.2012.11.007
- Huby R, Harding JJ (1988) Non-enzymic glycosylation (glycation) of lens proteins by galactose and protection by aspirin and reduced glutathione Exp Eye Res 47:53-59 doi:10.1016/0014-4835(88)90023-1
- Ignatovich IA, Dizhe EB, Pavlotskaya AV, Akifiev BN, Burov SV, Orlov SV, Perevozchikov AP (2003) Complexes of plasmid DNA with basic domain 47-57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways The Journal of biological chemistry 278:42625-42636 doi:10.1074/jbc.M301431200
- Imamura Y, Fujigaki Y, Oomori Y, Ouryouji K, Yanagisawa S, Miyazawa H, Wang PL (2009) Transcriptional regulation of the salivary histatin gene: finding of a strong positive regulatory element and its binding protein J Biochem 145:279-288 doi:10.1093/jb/mvn165

- Jahde E, Rajewsky MF, Baumgartl H (1982) Ph Distributions in Transplanted Neural Tumors and Normal-Tissues of Bdx Rats as Measured with Ph Microelectrodes *Cancer Research* 42:1498-1504
- Jani P, Subramanian S, Korde A, Rathod L, Sawant KK (2020) Theranostic Nanocarriers in Cancer: Dual Capabilities on a Single Platform. In: *Functional Bionanomaterials*. Springer, pp 293-312
- Jha P, Ali A (2019) Bionanoparticles in the treatment of glycation-induced secondary complications of diabetes. In: *Nanomaterials and plant potential*. Springer, pp 299-316
- Jiang J, Tong X, Zhao Y (2005) A new design for light-breakable polymer micelles *J Am Chem Soc* 127:8290-8291 doi:10.1021/ja0521019
- Jiang T et al. (2012) Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery *Biomaterials* 33:9246-9258 doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.027
- Jiang W, Kim BY, Rutka JT, Chan WC (2008) Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent *Nat Nanotechnol* 3:145-150 doi:10.1038/nnano.2008.30
- Johnsen KB et al. (2019) Modulating the antibody density changes the uptake and transport at the blood-brain barrier of both transferrin receptor-targeted gold nanoparticles and liposomal cargo *Journal of Controlled Release* 295:237-249 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.01.005>
- Jones LR, Goun EA, Shinde R, Rothbard JB, Contag CH, Wender PA (2006) Releasable luciferin-transporter conjugates: tools for the real-time analysis of cellular uptake and release *J Am Chem Soc* 128:6526-6527 doi:10.1021/ja0586283

- Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J (2005) Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background Mutation research 579:37-46 doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.03.024
- Kang SH, Cho MJ, Kole R (1998) Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development Biochemistry 37:6235-6239 doi:10.1021/bi980300h
- Kang SW, Li Y, Park JH, Lee DS (2013) pH-triggered unimer/vesicle-transformable and biodegradable polymersomes based on PEG-b-PCL-grafted poly(β -amino ester) for anti-cancer drug delivery Polymer 54:102-110 doi:10.1016/j.polymer.2012.10.055
- Karmali PP, Kotamraju VR, Kastantin M, Black M, Missirlis D, Tirrell M, Ruoslahti E (2009) Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors Nanomedicine 5:73-82 doi:10.1016/j.nano.2008.07.007
- Kato T et al. (2016) Plasmid DNA delivery by arginine-rich cell-penetrating peptides containing unnatural amino acids Bioorg Med Chem 24:2681-2687 doi:10.1016/j.bmc.2016.04.031
- Khurshid Z et al. (2017) Histatin peptides: Pharmacological functions and their applications in dentistry Saudi Pharm J 25:25-31 doi:10.1016/j.jsps.2016.04.027
- Kim MS, Seo KS, Khang G, Cho SH, Lee HB (2004) Preparation of poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) copolymers and their applications as thermo-sensitive materials J Biomed Mater Res A 70:154-158 doi:10.1002/jbm.a.30049
- Kim NH, Kang JH (2007) Protective effects of histidine dipeptides on the modification of neurofilament-L by the cytochrome c/hydrogen peroxide

system *Journal of biochemistry and molecular biology* 40:125-129
doi:10.5483/bmbrep.2007.40.1.125

Knop K, Hoogenboom R, Fischer D, Schubert US (2010) Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives *Angew Chem Int Ed Engl* 49:6288-6308 doi:10.1002/anie.200902672

Ko JK, Leung CC (2010) Ginger extract and polaprezinc exert gastroprotective actions by anti-oxidant and growth factor modulating effects in rats *Journal of gastroenterology and hepatology* 25:1861-1868 doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06347.x

Koide H et al. (2009) [Elucidation of accelerated blood clearance phenomenon caused by repeat injection of PEGylated nanocarriers] *Yakugaku Zasshi* 129:1445-1451 doi:10.1248/yakushi.129.1445

Kucheryavykh LY, Ortiz-Rivera J, Kucheryavykh YV, Zayas-Santiago A, Diaz-Garcia A, Inyushin MY (2019) Accumulation of Innate Amyloid Beta Peptide in Glioblastoma Tumors *Int J Mol Sci* 20:2482 doi:10.3390/ijms20102482

Law B, Tung CH (2009) Proteolysis: a biological process adapted in drug delivery, therapy, and imaging *Bioconjug Chem* 20:1683-1695 doi:10.1021/bc800500a

Lee CC, Gillies ER, Fox ME, Guillaudeu SJ, Frechet JM, Dy EE, Szoka FC (2006) A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16649-16654 doi:10.1073/pnas.0607705103

Lee ES, Gao Z, Bae YH (2008) Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology *J Control Release* 132:164-170 doi:10.1016/j.jconrel.2008.05.003

- Li X et al. (2006) Effect of stealthy liposomal topotecan plus amlodipine on the multidrug-resistant leukaemia cells in vitro and xenograft in mice *Eur J Clin Invest* 36:409-418 doi:10.1111/j.1365-2362.2006.01643.x
- Li XS, Reddy MS, Baev D, Edgerton M (2003) Candida albicans Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5 *The Journal of biological chemistry* 278:28553-28561 doi:10.1074/jbc.M300680200
- Li YP et al. (2001) PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats *Journal of Controlled Release* 71:203-211 doi:Doi 10.1016/S0168-3659(01)00218-8
- Liang GW et al. (2008) Enhanced therapeutic effects on the multi-drug resistant human leukemia cells in vitro and xenograft in mice using the stealthy liposomal vincristine plus quinacrine *Fundam Clin Pharmacol* 22:429-437 doi:10.1111/j.1472-8206.2008.00613.x
- Liang J, Wu WL, Xu XD, Zhuo RX, Zhang XZ (2014) pH responsive micelle self-assembled from a new amphiphilic peptide as anti-tumor drug carrier *Colloids Surf B Biointerfaces* 114:398-403 doi:10.1016/j.colsurfb.2013.10.037
- Licini G, Scrimin P (2003) Metal-ion-binding peptides: from catalysis to protein tagging *Angew Chem Int Ed Engl* 42:4572-4575 doi:10.1002/anie.200301668
- Lim WS et al. (2010) Leukemia-selective uptake and cytotoxicity of CPX-351, a synergistic fixed-ratio cytarabine:daunorubicin formulation, in bone marrow xenografts *Leuk Res* 34:1214-1223 doi:10.1016/j.leukres.2010.01.015
- Lindgren M et al. (2006) Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide *Biochem Pharmacol* 71:416-425 doi:10.1016/j.bcp.2005.10.048

- Linetsky MD, Shipova EV, Legrand RD, Argirov OO (2005) Glucose-derived Amadori compounds of glutathione *Biochimica et biophysica acta* 1724:181-193 doi:10.1016/j.bbagen.2005.04.003
- Łoboda D, Kozłowski H, Rowińska-Żyrek M (2018) Antimicrobial peptide–metal ion interactions – a potential way of activity enhancement *New Journal of Chemistry* 42:7560-7568 doi:10.1039/c7nj04709f
- Loo C, Lowery A, Halas N, West J, Drezek R (2005) Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy *Nano Letters* 5:709-711 doi:10.1021/nl050127s
- Lopez de la Paz M, Serrano L (2004) Sequence determinants of amyloid fibril formation *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:87-92 doi:10.1073/pnas.2634884100
- Lundin P, Johansson H, Guterstam P, Holm T, Hansen M, Langel U, S ELA (2008) Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates *Bioconjug Chem* 19:2535-2542 doi:10.1021/bc800212j
- Luo X, Feng M, Pan S, Wen Y, Zhang W, Wu C (2012) Charge shielding effects on gene delivery of polyethylenimine/DNA complexes: PEGylation and phospholipid coating *J Mater Sci Mater Med* 23:1685-1695 doi:10.1007/s10856-012-4632-4
- Lv H, Zhen C, Liu J, Yang P, Hu L, Shang P (2019) Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy *Oxid Med Cell Longev* 2019:3150145 doi:10.1155/2019/3150145
- Madamsetty VS, Mukherjee A, Mukherjee S (2019) Recent Trends of the Bio-Inspired Nanoparticles in Cancer Theranostics *Front Pharmacol* 10:1264

- Maeda H (2001) The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting *Adv Enzyme Regul* 41:189-207 doi:10.1016/s0065-2571(00)00013-3
- Maher PA, Schubert DR (2009) Metabolic links between diabetes and Alzheimer's disease Expert review of neurotherapeutics 9:617-630 doi:10.1586/ern.09.18
- Maillard LC (1912) Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie methodique *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 154:66-68
- Majorek KA et al. (2012) Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins *Molecular immunology* 52:174-182 doi:10.1016/j.molimm.2012.05.011
- Manshian BB, Jimenez J, Himmelreich U, Soenen SJ (2017) Personalized medicine and follow-up of therapeutic delivery through exploitation of quantum dot toxicity *Biomaterials* 127:1-12 doi:10.1016/j.biomaterials.2017.02.039
- Maruyama K, Ishida O, Takizawa T, Moribe K (1999) Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes *Adv Drug Deliv Rev* 40:89-102 doi:10.1016/s0169-409x(99)00042-3
- Matsukura T, Tanaka H (2000) Applicability of zinc complex of L-carnosine for medical use *Biochemistry Biokhimiia* 65:817-823
- Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs *Cancer Res* 46:6387-6392
- Matsuura N, Aradate T, Sasaki C, Kojima H, Ohara M, Hasegawa J, Ubukata M (2002) Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural product extracts *J Health Sci* 48:520-526 doi:DOI 10.1248/jhs.48.520

- Melino S, Rufini S, Sette M, Morero R, Grottesi A, Paci M, Petruzzelli R (1999) Zn(2+) ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain *Biochemistry* 38:9626-9633 doi:10.1021/bi990212c
- Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B (2014) Histatins: salivary peptides with copper(II)- and zinc(II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications *FEBS J* 281:657-672 doi:10.1111/febs.12612
- Mineo P, Vitalini D, La Mendola D, Rizzarelli E, Scamporrino E, Vecchio G (2002) Electrospray mass spectrometric studies of L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) complexes with copper(II) or zinc ions in aqueous solution *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM 16:722-729 doi:10.1002/rcm.633
- Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R (2021) Engineering precision nanoparticles for drug delivery *Nat Rev Drug Discov* 20:101-124 doi:10.1038/s41573-020-0090-8
- Miyata K, Kakizawa Y, Nishiyama N, Harada A, Yamasaki Y, Koyama H, Kataoka K (2004) Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression *J Am Chem Soc* 126:2355-2361 doi:10.1021/ja0379666
- Monje M, Dietrich J (2012) Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis *Behav Brain Res* 227:376-379 doi:10.1016/j.bbr.2011.05.012
- Monsuez JJ, Charniot JC, Vignat N, Artigou JY (2010) Cardiac side-effects of cancer chemotherapy *Int J Cardiol* 144:3-15 doi:10.1016/j.ijcard.2010.03.003

- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *J Immunol Methods* 65:55-63 doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Moulahoum H, Ghorbani Zamani F, Timur S, Zihnioglu F (2020) Metal Binding Antimicrobial Peptides in Nanoparticle Bio-functionalization: New Heights in Drug Delivery and Therapy *Probiotics Antimicrob Proteins* 12:48-63 doi:10.1007/s12602-019-09546-5
- Moulahoum H, Ghorbanizamani F, Zihnioglu F, Timur S (2021) Surface Biomodification of Liposomes and Polymersomes for Efficient Targeted Drug Delivery *Bioconjugate Chemistry* 32:1491-1502 doi:10.1021/acs.bioconjchem.1c00285
- Moulahoum H, Sanli S, Timur S, Zihnioglu F (2019) Potential effect of carnosine encapsulated niozomes in bovine serum albumin modifications *Int J Biol Macromol* 137:583-591 doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.003
- Mukherjee S et al. (2017) Characterization and Identification of Dityrosine Cross-Linked Peptides Using Tandem Mass Spectrometry *Anal Chem* 89:6136-6145 doi:10.1021/acs.analchem.7b00941
- Mura S et al. (2011) Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells *International journal of nanomedicine* 6:2591-2605 doi:10.2147/IJN.S24552
- Mura S, Nicolas J, Couvreur P (2013) Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery *Nat Mater* 12:991-1003 doi:10.1038/nmat3776
- Naeem A, Khan TA, Muzaffar M, Ahmad S, Saleemuddin M (2011) A partially folded state of ovalbumin at low pH tends to aggregate *Cell biochemistry and biophysics* 59:29-38 doi:10.1007/s12013-010-9108-x

- Nag OK, Delehanty JB (2019) Active Cellular and Subcellular Targeting of Nanoparticles for Drug Delivery Pharmaceuticals 11 doi:10.3390/pharmaceutics11100543
- Nagel G, Sousa-Herves A, Wedepohl S, Calderón M (2020) Matrix Metalloproteinase-sensitive Multistage Nanogels Promote Drug Transport in 3D Tumor Model Theranostics 10:91-108 doi:10.7150/thno.34851
- Naus E (2019) Targeting protein aggregation during cancer development. KU Leuven
- Neu M, Germershaus O, Mao S, Voigt KH, Behe M, Kissel T (2007) Crosslinked nanocarriers based upon poly(ethylene imine) for systemic plasmid delivery: in vitro characterization and in vivo studies in mice J Control Release 118:370-380 doi:10.1016/j.jconrel.2007.01.007
- Ng KE, Amin MC, Katas H, Amjad MW, Butt AM, Kesharwani P, Iyer AK (2016) pH-Responsive Triblock Copolymeric Micelles Decorated with a Cell-Penetrating Peptide Provide Efficient Doxorubicin Delivery Nanoscale Res Lett 11:539 doi:10.1186/s11671-016-1755-4
- Oh WK et al. (2010) Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality ACS Nano 4:5301-5313 doi:10.1021/nn100561e
- Pardridge WM (1999) Blood-brain barrier biology and methodology J Neurovirol 5:556-569 doi:10.3109/13550289909021285
- Park JW et al. (2001) Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes Journal of Controlled Release 74:95-113 doi:Doi 10.1016/S0168-3659(01)00315-7
- Park SE, Sajid MI, Parang K, Tiwari RK (2019) Cyclic Cell-Penetrating Peptides as Efficient Intracellular Drug Delivery Tools Mol Pharm 16:3727-3743 doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00633

- Patel NR, Rath A, Mongayt D, Torchilin VP (2011) Reversal of multidrug resistance by co-delivery of tariquidar (XR9576) and paclitaxel using long-circulating liposomes *Int J Pharm* 416:296-299 doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.082
- Patil Y, Sadhukha T, Ma L, Panyam J (2009) Nanoparticle-mediated simultaneous and targeted delivery of paclitaxel and tariquidar overcomes tumor drug resistance *J Control Release* 136:21-29 doi:10.1016/j.jconrel.2009.01.021
- Patil YB, Swaminathan SK, Sadhukha T, Ma L, Panyam J (2010) The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance *Biomaterials* 31:358-365 doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.048
- Pedrote MM et al. (2020) Oncogenic Gain of Function in Glioblastoma Is Linked to Mutant p53 Amyloid Oligomers *iScience* 23:100820 doi:10.1016/j.isci.2020.100820
- Peracchia MT et al. (1999) Stealth® PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting *Journal of Controlled Release* 60:121-128 doi:10.1016/s0168-3659(99)00063-2
- Pereira M, Tome D, Domingues AS, Varanda AS, Paulo C, Santos MAS, Soares AR (2018) A Fluorescence-Based Sensor Assay that Monitors General Protein Aggregation in Human Cells *Biotechnol J* 13:e1700676 doi:10.1002/biot.201700676
- Perrault SD, Walkey C, Jennings T, Fischer HC, Chan WC (2009) Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design *Nano Lett* 9:1909-1915 doi:10.1021/nl900031y
- Pooga M, Hallbrink M, Zorko M, Langel U (1998) Cell penetration by transportan *FASEB J* 12:67-77 doi:10.1096/fasebj.12.1.67

- Portelius E, Brinkmalm G, Tran AJ, Zetterberg H, Westman-Brinkmalm A, Blennow K (2009) Identification of novel APP/Abeta isoforms in human cerebrospinal fluid *Neurodegener Dis* 6:87-94 doi:10.1159/000203774
- Poulson BG, Szczepski K, Lachowicz JJ, Jaremko L, Emwas AH, Jaremko M (2020) Aggregation of biologically important peptides and proteins: inhibition or acceleration depending on protein and metal ion concentrations *Rsc Advances* 10:215-227 doi:10.1039/c9ra09350h
- Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DTJ, Romero IA, Abbott JN (1998) Toxic effects of β -amyloid(25–35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and β -alanine *Neuroscience Letters* 242:105-108 doi:10.1016/s0304-3940(98)00058-5
- Puglisi A, Bayir E, Timur S, Yagci Y (2019) pH-Responsive Polymersome Microparticles as Smart Cyclodextrin-Releasing Agents *Biomacromolecules* 20:4001-4007 doi:10.1021/acs.biomac.9b01083
- Puri S, Edgerton M (2014) How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5 *Eukaryot Cell* 13:958-964 doi:10.1128/EC.00095-14
- Qian WY, Sun DM, Zhu RR, Du XL, Liu H, Wang SL (2012) pH-sensitive strontium carbonate nanoparticles as new anticancer vehicles for controlled etoposide release *International journal of nanomedicine* 7:5781-5792 doi:10.2147/IJN.S34773
- Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE (1992) Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications *Molecular aspects of medicine* 13:379-444 doi:10.1016/0098-2997(92)90006-l
- Ramamurthy B, Hook P, Jones AD, Larsson L (2001) Changes in myosin structure and function in response to glycation *FASEB J* 15:2415-2422 doi:10.1096/fj.01-0183com

- Reeg S, Grune T (2015) Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxid Redox Signal* 23:239-255 doi:10.1089/ars.2014.6062
- Rideau E, Dimova R, Schwille P, Wurm FR, Landfester K (2018) Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking *Chem Soc Rev* 47:8572-8610 doi:10.1039/c8cs00162f
- Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H (2009) Nanomedicine--challenge and perspectives *Angew Chem Int Ed Engl* 48:872-897 doi:10.1002/anie.200802585
- Roberts BR, Ryan TM, Bush AI, Masters CL, Duce JA (2012) The role of metallobiology and amyloid-beta peptides in Alzheimer's disease *Journal of neurochemistry* 120 Suppl 1:149-166 doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07500.x
- Rondeau P, Bourdon E (2011) The glycation of albumin: structural and functional impacts *Biochimie* 93:645-658 doi:10.1016/j.biochi.2010.12.003
- Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L (2006) Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds? *Curr Opin Struct Biol* 16:118-126 doi:10.1016/j.sbi.2006.01.011
- Ruizendaal L et al. (2009) Synthesis and cytotoxicity of silicon nanoparticles with covalently attached organic monolayers *Nanotoxicology* 3:339-347 doi:10.3109/17435390903288896
- Ryser HJ, Hancock R (1965) Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture *Science* 150:501-503 doi:10.1126/science.150.3695.501

- Saad M, Garbuzenko OB, Minko T (2008) Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrug-resistant cancer *Nanomedicine (Lond)* 3:761-776 doi:10.2217/17435889.3.6.761
- Salvador Morales C, Zhang L, Langer R, Farokhzad O (2009) Abstract #641: Understanding the immunological properties of functionalized lipid-polymeric nanoparticles *Cancer Research* 69:641
- Sanchez de Groot N, Pallares I, Aviles FX, Vendrell J, Ventura S (2005) Prediction of "hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides *BMC Struct Biol* 5:18 doi:10.1186/1472-6807-5-18
- Sanhai WR, Sakamoto JH, Canady R, Ferrari M (2008) Seven challenges for nanomedicine *Nat Nanotechnol* 3:242-244 doi:10.1038/nnano.2008.114
- Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L (2016) Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases *Journal of Controlled Release* 235:34-47 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.05.044>
- Scarpa E et al. (2016) Quantification of intracellular payload release from polymersome nanoparticles *Scientific reports* 6:29460 doi:10.1038/srep29460
- Schaeublin NM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, Miller JM, Hutchison J, Schlager JJ, Hussain SM (2011) Surface charge of gold nanoparticles mediates mechanism of toxicity *Nanoscale* 3:410-420 doi:10.1039/c0nr00478b
- Scheetz L, Park KS, Li Q, Lowenstein PR, Castro MG, Schwendeman A, Moon JJ (2019) Engineering patient-specific cancer immunotherapies *Nat Biomed Eng* 3:768-782 doi:10.1038/s41551-019-0436-x

- Schneider P (2000) Production of Recombinant TRAIL and TRAIL Receptor: Fc Chimeric Proteins. Elsevier. doi:10.1016/s0076-6879(00)22031-4
- Scholz C, Iijima M, Nagasaki Y, Kataoka K (1995) A Novel Reactive Polymeric Micelle with Aldehyde Groups on Its Surface *Macromolecules* 28:7295-7297 doi:DOI 10.1021/ma00125a040
- Seo MD, Won HS, Kim JH, Mishig-Ochir T, Lee BJ (2012) Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review *Molecules* 17:12276-12286 doi:10.3390/molecules171012276
- Shankar GM et al. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory *Nat Med* 14:837-842 doi:10.1038/nm1782
- Shi K et al. (2015) A pH-responsive cell-penetrating peptide-modified liposomes with active recognizing of integrin $\alpha v \beta 3$ for the treatment of melanoma *J Control Release* 217:138-150 doi:10.1016/j.jconrel.2015.09.009
- Siddiqi MK, Alam P, Chaturvedi SK, Khan MV, Nusrat S, Malik S, Khan RH (2018) Capreomycin inhibits the initiation of amyloid fibrillation and suppresses amyloid induced cell toxicity *Biochimica et biophysica acta Proteins and proteomics* 1866:549-557 doi:10.1016/j.bbapap.2018.02.005
- Siemers NO et al. (1997) Construction, expression, and activities of L49-sFv-beta-lactamase, a single-chain antibody fusion protein for anticancer prodrug activation *Bioconjug Chem* 8:510-519 doi:10.1021/bc9700751
- Singh R, Lillard JW, Jr. (2009) Nanoparticle-based targeted drug delivery *Exp Mol Pathol* 86:215-223 doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004

- Song XR et al. (2009) Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of vincristine and verapamil in PLGA nanoparticles *Eur J Pharm Sci* 37:300-305 doi:10.1016/j.ejps.2009.02.018
- Soomets U et al. (2000) Deletion analogues of transportan *Biochimica et biophysica acta* 1467:165-176 doi:10.1016/s0005-2736(00)00216-9
- Sorace AG, Warram JM, Umphrey H, Hoyt K (2012) Microbubble-mediated ultrasonic techniques for improved chemotherapeutic delivery in cancer *Journal of Drug Targeting* 20:43-54 doi:10.3109/1061186X.2011.622397
- Sousa F, Dhaliwal HK, Gattacceca F, Sarmento B, Amiji MM (2019) Enhanced anti-angiogenic effects of bevacizumab in glioblastoma treatment upon intranasal administration in polymeric nanoparticles *Journal of Controlled Release* 309:37-47 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.033>
- Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Sadler PJ (2003) Interdomain zinc site on human albumin *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3701-3706 doi:10.1073/pnas.0436576100
- Suji G, Sivakami S (2004) Glucose, glycation and aging *Biogerontology* 5:365-373 doi:10.1007/s10522-004-3189-0
- Sun X, Salih E, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ (2009) Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties *FASEB J* 23:2691-2701 doi:10.1096/fj.09-131045
- Tanaka T, Shiramoto S, Miyashita M, Fujishima Y, Kaneo Y (2004) Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME) *Int J Pharm* 277:39-61 doi:10.1016/j.ijpharm.2003.09.050

- Tannock IF, Rotin D (1989) Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation *Cancer Res* 49:4373-4384
- Taylor CG (2005) Zinc, the pancreas, and diabetes: insights from rodent studies and future directions *BioMetals* 18:305-312 doi:10.1007/s10534-005-3686-x
- Torchilin VP (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers *Nat Rev Drug Discov* 4:145-160 doi:10.1038/nrd1632
- Torchilin VP (2008) Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery *Biopolymers* 90:604-610 doi:10.1002/bip.20989
- Torreggiani A, Bonora S, Fini G (2000) Raman and IR spectroscopic investigation of zinc(II)-carnosine complexes *Biopolymers* 57:352-364 doi:10.1002/1097-0282(2000)57:6<352::AID-BIP50>3.0.CO;2-Y
- Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading *Journal of computational chemistry* 31:455-461 doi:10.1002/jcc.21334
- Troxler RF, Offner GD, Xu T, Vanderspek JC, Oppenheim FG (1990) Structural relationship between human salivary histatins *J Dent Res* 69:2-6 doi:10.1177/00220345900690010101
- Tupe R et al. (2015) Zinc inhibits glycation induced structural, functional modifications in albumin and protects erythrocytes from glycated albumin toxicity *Int J Biol Macromol* 79:601-610 doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.028
- Tupe RS, Agte VV (2010) Role of zinc along with ascorbic acid and folic acid during long-term in vitro albumin glycation *Br J Nutr* 103:370-377 doi:10.1017/S0007114509991929

- Tupe RS, Kemse NG, Khaire AA, Shaikh SA (2017) Attenuation of glycation-induced multiple protein modifications by Indian antidiabetic plant extracts *Pharm Biol* 55:68-75 doi:10.1080/13880209.2016.1228683
- Turk BE, Cantley LC (2003) Peptide libraries: at the crossroads of proteomics and bioinformatics *Current Opinion in Chemical Biology* 7:84-90 doi:10.1016/S1367-5931(02)00004-2
- Uchida K, Otsuka H, Kaneko M, Kataoka K, Nagasaki Y (2005) A reactive poly(ethylene glycol) layer to achieve specific surface plasmon resonance sensing with a high S/N ratio: the substantial role of a short underbrushed PEG layer in minimizing nonspecific adsorption *Anal Chem* 77:1075-1080 doi:10.1021/ac0486140
- van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Hennink WE, Storm G, Schiffelers RM, Mastrobattista E (2011) In vivo methods to study uptake of nanoparticles into the brain *Pharm Res* 28:456-471 doi:10.1007/s11095-010-0291-7
- Vargas JR, Stanzl EG, Teng NN, Wender PA (2014) Cell-penetrating, guanidinium-rich molecular transporters for overcoming efflux-mediated multidrug resistance *Mol Pharm* 11:2553-2565 doi:10.1021/mp500161z
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review *Cancer Res* 49:6449-6465
- Vives E, Brodin P, Lebleu B (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus *The Journal of biological chemistry* 272:16010-16017 doi:10.1074/jbc.272.25.16010
- Vives E, Schmidt J, Pelegri A (2008) Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery *Biochimica et biophysica acta* 1786:126-138 doi:10.1016/j.bbcan.2008.03.001

- Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis *Nat Med* 10:310-315 doi:10.1038/nm996
- Wang J, Potocny AM, Rosenthal J, Day ES (2020) Gold Nanoshell-Linear Tetrapyrrole Conjugates for Near Infrared-Activated Dual Photodynamic and Photothermal Therapies *ACS Omega* 5:926-940 doi:10.1021/acsomega.9b04150
- Wang SS, Liu KN, Han TC (2010) Amyloid fibrillation and cytotoxicity of insulin are inhibited by the amphiphilic surfactants *Biochimica et biophysica acta* 1802:519-530 doi:10.1016/j.bbadis.2010.02.008
- Wang Y, Gao S, Ye WH, Yoon HS, Yang YY (2006) Co-delivery of drugs and DNA from cationic core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer *Nat Mater* 5:791-796 doi:10.1038/nmat1737
- Wang Y, Shim MS, Levinson NS, Sung HW, Xia Y (2014) Stimuli-Responsive Materials for Controlled Release of Theranostic Agents *Adv Funct Mater* 24:4206-4220 doi:10.1002/adfm.201400279
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13003-13008 doi:10.1073/pnas.97.24.13003
- West KR, Otto S (2005) Reversible covalent chemistry in drug delivery *Curr Drug Discov Technol* 2:123-160 doi:10.2174/1570163054866882
- Wiesner J, Vilcinskas A (2010) Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system *Virulence* 1:440-464 doi:10.4161/viru.1.5.12983

- Wilson JJ, Matsushita O, Okabe A, Sakon J (2003) A bacterial collagen-binding domain with novel calcium-binding motif controls domain orientation EMBO J 22:1743-1752 doi:10.1093/emboj/cdg172
- Witko-Sarsat V et al. (1996) Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia Kidney Int 49:1304-1313 doi:10.1038/ki.1996.186
- Witschi A, Reddy S, Stofer B, Lauterburg BH (1992) The systemic availability of oral glutathione Eur J Clin Pharmacol 43:667-669 doi:10.1007/BF02284971
- Wu J, Lu Y, Lee A, Pan X, Yang X, Zhao X, Lee RJ (2007) Reversal of multidrug resistance by transferrin-conjugated liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques 10:350-357
- Wuerges J, Lee JW, Yim YI, Yim HS, Kang SO, Djinovic Carugo K (2004) Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site Proc Natl Acad Sci U S A 101:8569-8574 doi:10.1073/pnas.0308514101
- Xie J, Bi Y, Zhang H, Dong S, Teng L, Lee RJ, Yang Z (2020) Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application Front Pharmacol 11:697 doi:10.3389/fphar.2020.00697
- Xing G, DeRose VJ (2001) Designing metal-peptide models for protein structure and function Current Opinion in Chemical Biology 5:196-200 doi:10.1016/s1367-5931(00)00190-3

- Xu Y et al. (2020) Antitumor Activity of a Novel Double-Targeted System for Folate Receptor-Mediated Delivery of Mitomycin C ACS Omega 5:26864-26870 doi:10.1021/acsomega.0c04042
- Yan SD et al. (1995) Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide Nat Med 1:693-699 doi:10.1038/nm0795-693
- Yang C et al. (2020) pH-Sensitive Mixed Micelles Assembled from PDEAEMA-PPEGMA and PCL-PPEGMA for Doxorubicin Delivery: Experimental and DPD Simulations Study Pharmaceutics 12 doi:10.3390/pharmaceutics12020170
- Yang W, Liang H, Ma S, Wang D, Huang J (2019) Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment Sustainable Materials and Technologies 22:e00109 doi:10.1016/j.susmat.2019.e00109
- Yao J et al. (2017) Design of new acid-activated cell-penetrating peptides for tumor drug delivery PeerJ 5:e3429 doi:10.7717/peerj.3429
- Yong JM, Mantaj J, Cheng Y, Vllasaliu D (2019) Delivery of Nanoparticles across the Intestinal Epithelium via the Transferrin Transport Pathway Pharmaceutics 11:298 doi:10.3390/pharmaceutics11070298
- Zan Y, Dai Z, Liang L, Deng Y, Dong L (2019) Co-delivery of plantamajoside and sorafenib by a multi-functional nanoparticle to combat the drug resistance of hepatocellular carcinoma through reprogramming the tumor hypoxic microenvironment Drug Deliv 26:1080-1091 doi:10.1080/10717544.2019.1654040

- Zaro JL, Fei L, Shen WC (2012) Recombinant peptide constructs for targeted cell penetrating peptide-mediated delivery J Control Release 158:357-361 doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.039
- Zhang C, Jackson AP, Zhang ZR, Han Y, Yu S, He RQ, Perrett S (2010) Amyloid-like aggregates of the yeast prion protein ure2 enter vertebrate cells by specific endocytotic pathways and induce apoptosis PLoS One 5:e12529 doi:10.1371/journal.pone.0012529
- Zhang W, Song J, Zhang B, Liu L, Wang K, Wang R (2011) Design of acid-activated cell penetrating peptide for delivery of active molecules into cancer cells Bioconjug Chem 22:1410-1415 doi:10.1021/bc200138d
- Zhang Z, Chen H, Lai L (2007) Identification of amyloid fibril-forming segments based on structure and residue-based statistical potential Bioinformatics 23:2218-2225 doi:10.1093/bioinformatics/btm325
- Zhou Y, Drummond DC, Zou H, Hayes ME, Adams GP, Kirpotin DB, Marks JD (2007) Impact of single-chain Fv antibody fragment affinity on nanoparticle targeting of epidermal growth factor receptor-expressing tumor cells J Mol Biol 371:934-947 doi:10.1016/j.jmb.2007.05.011
- Zhu L, Kate P, Torchilin VP (2012) Matrix metalloprotease 2-responsive multifunctional liposomal nanocarrier for enhanced tumor targeting ACS Nano 6:3491-3498 doi:10.1021/nn300524f
- Zhuang J et al. (2018) The influence of nanoparticle shape on bilateral exocytosis from Caco-2 cells Chinese Chemical Letters 29:1815-1818 doi:<https://doi.org/10.1016/j.cclet.2018.10.012>
- Ziegler A (2008) Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans Adv Drug Deliv Rev 60:580-597 doi:10.1016/j.addr.2007.10.005



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında çok büyük destek ve rehberlik sağlayan iki tez direktörüm Prof. Dr. Figen ZİHNİÖĞLU ve Prof. Dr. Suna TİMUR başta olmak üzere emeği geçen meslektaşlarım ve arkadaşlarıma en derin şükran ve saygılarımı sunuyorum. Bilimsel ya da kişisel olsun, fikrini belirten herkese çok teşekkür ediyorum çünkü bu tartışmalar çalışmama olumlu bir şekilde devam etmeme yardımcı oldu.

Kalbim, her zaman, beni mesafeler olsa dahi cesaretlendirmeye devam eden ve başarılı olmam için bana en üst düzeyde manevi destek veren ailemle birlikte. Bu tezi size adıyorum.

Stresimi ve endişelerimi paylaştığım, bu tez sırasında beni yolda tutan kişi, eşim, yol arkadaşım. Sonsuz teşekkür ederim...

Hichem

ÖZGEÇMİŞ

Hichem MOULAHOUIM

Öğrenim Bilgisi

- **Lisans- Biyoteknoloji**

2005-2008: Université des Sciences et de la Technologie Huari Boumediene (USTHB), Cezayir

- **Yüksek Lisans – Farmakoloji**

2008-2010: Université des Sciences et de la Technologie Huari Boumediene (USTHB), Cezayir

- **Doktora - Farmakoloji**

2011-2015: Université des Sciences et de la Technologie Huari Boumediene (USTHB), Cezayir

- **Türkçe dili hazırlık**

2015-2016: Ege Üniversitesi

- **Doktora Biyokimya**

2016-2021: Ege Üniversitesi/Fen Fakültesi/Biyokimya Bölümü

Görevler

- **Özel öğretmen**

2010-2011 - USTHB, Biyoloji Fakültesi, Cezayir

- **Araştırma Görevlisi**

2010-2011 - Institut Pasteur d'Algérie, Cezayir

- **Misafir araştırmacı**

2012 - Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Gent Üniversite Hastanesi – Gent, Belçika

- **Misafir araştırmacı**

2015 - Fizyoloji Bölümü, Tıp ve Eczacılık Üniversitesi Iuliu Hatiengu – Cluj-Napoca, Romanya

- **Yardımcı öğretmen**

2011-2015 – USTHB, Biyoloji Fakültesi, Cezayir

Projelerde Yaptığı Görevler

2011-2015 (Bursiyer)

“Pharmacotechnologie dans les Syndromes Inflammatoires et la Leishmaniose” projesi “Programme National de Recherche en Sciences Fondamentales, 2011, Algerie” tarafından destek verildi.

2020-2021 (Bursiyer)

120Z200, Artemisia Bitki Ekstraktı Hazırlanması ve Protein Gliko-Oksidasyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, 1001 – Araştırma projesi.

Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

1. **Moulaoum H**, Ghorbanizamani F, Zihnioglu F, Timur S. Surface Biomodification of Liposomes and Polymersomes for Efficient Targeted Drug Delivery. Bioconjugate Chemistry. 2021. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.1c00285
2. Ghorbanizamani F, Tok K, **Moulaoum H**, Harmanci D, Balaban Hanoglu S, Durmus C, Zihnioglu F et al. Dye-Loaded Polymersome-Based Lateral Flow Assay: Rational Design of a COVID-19 Testing Platform by Repurposing SARS-CoV-2 Antibody Cocktail and Antigens Obtained from Positive Human Samples. ACS Sensors. 2021. doi: 10.1021/acssensors.1c00854
3. Ghorbanizamani F, **Moulaoum H**, Zihnioglu F, Evran S, Cicek C, Sertoz R et al. Quantitative paper-based dot blot assay for spike protein detection using

fuchsin dye-loaded polymersomes. *Biosensors & Bioelectronics*. 2021. doi: 10.1016/j.bios.2021.113484

4. Demir B, **Moulaoum H**, Ghorbanizamani F et al. Carbon dots and curcumin-loaded CD44-Targeted liposomes for imaging and tracking cancer chemotherapy: A multi-purpose tool for theranostics. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2021;62:102363. doi:10.1016/j.jddst.2021.102363
5. **Moulaoum H**, Ghorbanizamani F, Zihnioglu F, Timur S. Tracking and Treating: Molecularly Imprinted Polymer-Based Nanoprobes Application in Theranostics. *Molecular Imprinting for Nanosensors and Other Sensing Applications*. 2021:45-68. doi:10.1016/b978-0-12-822117-4.00003-4
6. Ghorbanizamani F, **Moulaoum H**, Zihnioglu F, Timur S. Self-assembled block copolymers in ionic liquids: Recent advances and practical applications. *J Mol Liq*. 2021;323:115076. doi:10.1016/j.molliq.2020.115076
7. Sanli S, **Moulaoum H**, Ghorbanizamani F, Gumus Z, Timur S. On_Site Testosterone Biosensing for Doping Detection: Electrochemical Immunosensing via Functionalized Magnetic Nanoparticles and Screen_Printed Electrodes. *ChemistrySelect*. 2020;5(47):14911-14916. doi:10.1002/slct.202004204
8. **Moulaoum H**, Ghorbanizamani F, Timur S, Zihnioglu F. Zinc enhances carnosine inhibitory effect against structural and functional age-related protein alterations in an albumin glycoxidation model. *BioMetals*. 2020;33(6):353-364. doi:10.1007/s10534-020-00254-0
9. Tok K, **Moulaoum H**, Kocadag Kocazorbaz E, Zihnioglu F. Bioactive peptides with multiple activities extracted from Barley (*Hordeum vulgare* L.) grain protein hydrolysates: Biochemical analysis and computational identification. *J Food Process Preserv*. 2020;45(1). doi:10.1111/jfpp.15024

10. Ghorbanizamani F, **Moulahoum H**, Sanli S, Bayir E, Zihnioglu F, Timur S. pH-bioresponsive poly(ϵ -caprolactone)-based polymersome for effective drug delivery in cancer and protein glycooxidation prevention. *Arch Biochem Biophys*. 2020;695:108643. doi:10.1016/j.abb.2020.108643

11. Sanli S, **Moulahoum H**, Ghorbanizamani F, Celik E, Timur S. Ultrasensitive covalently-linked Aptasensor for cocaine detection based on electrolytes-induced repulsion/attraction of colloids. *Biomed Microdevices*. 2020;22(3). doi:10.1007/s10544-020-00507-2

12. **Moulahoum H**, Ghorbanizamani F, Zihnioglu F, Turhan K, Timur S. How should diagnostic kits development adapt quickly in COVID 19-like pandemic models? Pros and cons of sensory platforms used in COVID-19 sensing. *Talanta*. 2021;222:121534. doi:10.1016/j.talanta.2020.121534

13. GhorbaniZamani F, **Moulahoum H**, Zihnioglu F, Timur S. Nanohybrid Carriers: The Ying Yang Equilibrium between Natural and Synthetic in Biomedicine. *Biomater. Sci*. 2020. doi:10.1039/D0BM00401D

14. Sanli S, **Moulahoum H**, Ugurlu O, Ghorbanizamani F, Gumus Z.P, Evran S, Coskunol H, Timur S. Screen printed electrode-based biosensor functionalized with magnetic cobalt/single-chain antibody fragments for cocaine biosensing in different matrices. *Talanta*. 2020. 217:121111. doi:10.1016/j.talanta.2020.121111

15. Kula E, Kocadag Kocazorbaz E, **Moulahoum H**, Alpat S, Zihnioglu F. Extraction and characterization of novel multifunctional peptides from *Trachinus Draco* (greater weever) myofibrillar proteins with ACE/DPP4 inhibitory, antioxidant, and metal chelating activities. *J Food Biochem*. 2020. 44:e13179. doi:10.1111/jfbc.13179

16. Sanli S, Ghorbani-Zamani F, **Moulahoum H**, Gumus Z.P, Coskunol H, Odaci Demirkol D, Timur S. Application of Biofunctionalized Magnetic

- Nanoparticles Based-Sensing in Abused Drugs Diagnostics. *Anal. Chem.* 2020. 92(1): 1033–1040. doi:10.1021/acs.analchem.9b04025
17. **Moulaoum H**, Sanli S, Timur S, Zihnioglu F. Potential effect of carnosine encapsulated niosomes in bovine serum albumin modifications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. 137: 583-591. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.003
 18. GhorbaniZamani F, **Moulaoum H**, Ak M, Odaci-Demirkol D, Timur S. Current trends in the development of conducting polymers-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2019. 118:264-276. doi:10.1016/j.trac.2019.05.031
 19. **Moulaoum M**, GhorbaniZamani F, Timur S, Zihnioglu F. Metal Binding Antimicrobial Peptides in Nanoparticle Bio-functionalization: New Heights in Drug Delivery and Therapy. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2019. 1-16. doi:10.1007/s12602-019-09546-5
 20. **Moulaoum H**, Zihnioglu F, Timur S, Coskunol H. Novel technologies in detection, treatment and prevention of substance use disorders. *J Food Drug Anal.* 2019 Jan;27(1):22-31. doi:10.1016/j.jfda.2018.09.003
 21. Ferrat M, **Moulaoum H**, Boumaza BMA, Mouzaoui S, Périanin A, Djerdjouri B. Gadolinium chloride attenuates acetic acid-evoked colitis in mice by reducing neutrophil infiltration and pro-oxidative enzyme activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018 Nov 27. doi:10.1007/s00210-018-1592-3
 22. **Moulaoum H**, Boumaza BMA, Ferrat M, Bounaama A, Djerdjouri B. Arsenic trioxide ameliorates murine colon inflammation through inflammatory cell enzymatic modulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018 Nov 10. doi:10.1007/s00210-018-1578-1
 23. **Moulaoum H**, Boumaza BMA, Ferrat M, Nagy AL, Olteanu DE, Bounaama A, Clichici S. Aberrant crypt foci are regionally affected by zinc treatment in a

1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis model. J Trace Elem Med Biol. 2018 May;47:21-30. doi:10.1016/j.jtemb.2018.01.009

24. **Moulahoum H**, Nagy AL, Djerdjouri B, Clichici S. Precancerous ACF induction affects their regional distribution forsaking oxidative stress implication in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis model. Inflammopharmacology. 2018 Apr;26(2):457-468. doi:10.1007/s10787-017-0377-5
25. **Moulahoum H**, Boumaza BMA, Ferrat M, Djerdjouri B. Arsenic trioxide exposure accelerates colon preneoplastic aberrant crypt foci induction regionally through mitochondrial dysfunction. Toxicol Res (Camb). 2017 Sep 27;7(2):182-190. doi:10.1039/c7tx00213k
26. Bounaama A, Enayat S, Ceyhan MS, **Moulahoum H**, Djerdjouri B, Banerjee S. Ethanolic Extract of Bark from *Salix aegyptiaca* Ameliorates 1,2-dimethylhydrazine-induced Colon Carcinogenesis in Mice by Reducing Oxidative Stress. Nutr Cancer. 2016;68(3):495-506. doi:10.1080/01635581.2016.1152379

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Kocadag Kocazorbaz E, Tok K, **Moulahoum H**, Un R.N. Phytochemical And Bioactivity Analysis Of Several Methanolic Extracts Of Nine Bryophytes Species. Sakarya University Journal of Science. 2021. doi: 10.16984/sofenbilder.868944

Yabancı Dil

İngilizce – Fransızca – Arapça – Türkçe

Katılım Sağlanan Bilimsel Aktiviteler

Aralık 2019

Sözlü sunum: UDEF International Science Symposium. Trakya University 6-8 December 2019, Edirne - Turkey.

- Moulahoum H, Ghorbanizamani F, Sanli S, Timur S, Zihnioglu F.. (English language) "Passive targeting therapy for delivery nanocarriers using natural antioxidant Glutathione-loaded niosomes".

Aralık 2019

Poster: 44th FEBS Congress, From Molecules to Living Systems. 6-11 July 2019, Krakow, Poland.

- Moulahoum H, Ghorbanizamani F, Timur S, Zihnioglu F.. (English language) "Passive targeting therapy for brain delivery nanocarriers using natural dipeptide antioxidant L-carnosine-loaded niosomes".

Mayıs 2017

Sözlü sunum: 1st International Students Science Congress. Katip Celebi University 4-5 May 2017, Izmir - Turkey.

- Moulahoum H., Boumaza BMA., Ferrat M., Bounaama A., Djerdjouri B. (English language) " Arsenic trioxide treatment promotes dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation and oxidative stress in mice: involvement of metallothionein".

Aralık 2015

Poster: 5th International Gastrointestinal Cancer Conference, Grand Hyatt Hotel 4-6 December 2015, Istanbul - Turkey.

- Djerdjouri B., Moulahoum H., Boumaza BMA., Ferrat M., and Bounaama A. (English language) "As₂O₃ promotes 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative stress, metallothioneins and aberrant crypt foci in mice ".

Kasım 2015

Poster: MolBiyoKon 2015 – 4th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, METU University. 27-29 November 2015, Ankara - Turkey.

- Bounaama A., Shabnam E., Muserref SC., Moulahoum H., Banerjee S. and Djerdjouri B. (English language) "Ethanollic Extract of Bark From Salix Aegyptiaca Attenuates Inflammation and Oxidative Stress, and 1,2-Dimethylhydrazine Induced Aberrant Crypt Foci in Mice ".
- Moulahoum H., Boumaza BMA., Shabnam E., Muserref SC., Banerjee S., and Djerdjouri B. (English language) "Arsenic trioxide exerts anti-inflammatory and antioxidant effect in vivo and alters HCT116 cells viability and proliferation by inducing apoptosis in vitro".

Aralık 2014

Poster: XXVI èmes Journées Nationales d'Hépatogastroentérologie et d'Endoscopie Digestive. Société Algérienne d'Hépatogastroentérologie et d'Endoscopie Digestive (SAHGEED), Hilton Hotel 12-14 December 2014, Algiers - Algeria.

- Moulahoum H., Boumaza BMA., Ferrat M., Djerdjouri B. (French language) "Intérêt thérapeutique des éléments en traces dans la prévention d'une inflammation colique chez la souris".
- Ferrat M., Moulahoum H., Boumaza BMA., Djerdjouri B. (English language) "Lithium carbonate reduce inflammation and oxidative stress in an experimental-model of Crohn's disease".

Kasım 2014

Poster: 1st International Congress of Bio-toxicology and Bio-Activity, Oran (Algeria), November 26-27, 2014 Phoenix Hotel.

- Moulahoum H., Boumaza BMA., Ferrat M., Djerdjouri B. (English language)
"Protective effect of low dose arsenic treatment on acetic acid-acute colitis in mice".

Nisan 2014

Poster: 40th anniversary of University of Science and Technology Houari Boumediene (USTHB), Faculty of biological sciences, April 2014, Algiers - Algeria.

- Moulahoum H., Boumaza BMA., Djerdjouri B. (English language)
"Protective effect of metalloid low dose on acetic acid-acute colitis in mice".
- Boudiaf MA., Moulahoum H., Djerdjouri B. (English language)
"Pharmacological modulation of an adverse effect of chemotherapy for colon cancer by a natural antioxidant catechin".
- Boumaza BMA., Moulahoum H. Djerdjouri B. (English language) "Arsenic trioxide improves oxidative stress in chemically-induced acute colitis in mice"

Temmuz 2011 ve 2012

Summer University of Scientific and Technologic Research. Algerian Competences Association (ACA) and the General Directorate for Scientific Research and Technological Development (DG-RSDT):

- University of Abbes Laghrour of Khenchela. July 07 to12, 2012. Khenchela - Algeria.

- University of Aboubekr Belkaïd of Tlemcen. July 09 to 14, 2011. Tlemcen - Algeria.

Nisan 2011

Poster: 37th anniversary of University of Science and Technology Houari Boumediene (USTHB), April 2011, Algiers - Algeria.

- Moulahoum H., Boumaza BMA., Abbadi MC., Raache R. (French language)
"Human immunoglobulin purification and production of immune serum for diagnosis use".

Haziran 2010

Poster: 1st Maghrebin Congress of Immunology; 5th National days of Immunology. Algerian Society of immunology. June 5-6, 2010, Algiers - Algeria.

- Boumaza BMA., Moulahoum H. Raache R., Abbadi MC. (French language)
"Human immunoglobulin purification and production of immune serum".