



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENDRİGRAFT KAPLI GÜMÜŞ SÜLFÜR
KUANTUM NOKTALARININ
HAZIRLANMASI VE TERANOSTİK
POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ**

HATİCE TURAN PESTEL

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ ALTAY SAVALAN**

**BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
AĞUSTOS/2022**

İTHAF

“Hocam Dr. Öğr. Üyesi Altay SAVALAN’a ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ve yüksek lisans sürecimde bana en büyük desteği sağlayan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Altay SAVALAN'a en içten duygularıyla teşekkür ediyorum. Özgüvenli bir bilim insanı olmam için destekledi. Düşüncelerime ve yorumlarıma her zaman önem verdi. Yapamayacağımı, başaramayacağımı düşündüğüm her anda kendime inanmamı sağladı ve bana potansiyelimi gösterdi. Hem bir öğrenci hem de bir insan yetiştirdi bunun için ona çok minnettarım.

Tez çalışmalarımın deneysel kısmının yürütülmesi için alt yapı sağlayan DETUAM Validebağ Araştırma Parkına ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilim Araştırma Merkezine teşekkürü borç bilirim.

Gerek ders döneminde gerekse tez dönemimde desteklerini esirgemeyen Biyoteknoloji ABD hocalarım; Doç. Dr. Mehmet KARAKUŞ, Dr. Öğr. Üyesi Arif MERMER, Dr. Öğr. Üyesi Seda KELEŞTEMUR ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet KATI'ya içtenlikle teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirirken kendi bilgi birikimini, deneyimlerini sıkılmadan ve yorulmadan benimle paylaşan Tuğba Muhlise OKYAY'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın hücre kısmının yürütülmesinde yardımını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Ayyup EBRAHİMİ hocama ve sevgili yüksek lisans öğrencisi Beyza YILMAZ'a içtenlikle teşekkür ederim. Laboratuvarında bulunduğum süre içinde manevi desteklerini esirgemeyen Elif BALIKÇI, İrem ALTUNTAŞ, Erdal SERİN ve Hülya Serap MOĞUL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Beni akademik hayatımın en başından beri destekleyen canım aileme, bana bu fırsatı verdikleri için çok teşekkür ederim. Maddi sıkıntıları düşündürmeden yüksek lisans yapmama imkan veren babam Ahmet TURAN'a, bu süreç boyunca verdiği emekler için annem Selviye TURAN'a, bu süreç boyu sevgileriyle beni destekleyen kardeşlerim Tuğba TURAN ve Melike Nur TURAN'a teşekkür ediyorum.

Tüm sıkıntılı süreçlerimde desteğini esirgemeyen; çalışmalarımı, yaptığım işleri büyük bir gururla taşıyan eşim Emre PESTEL'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. KUANTUM NOKTALARI	2
2.1.1. Boyuta Bağlı Enerji Bandı Boşluğu ve Kuantum Sınırlaması	3
2.1.2. Floresans Spektroskopisi	3
2.1.3. Kuantum Noktalarının Sentezi	5
2.1.4. Yakın Kızılötesi Emisyonlu Kuantum Noktaları ve Biyogörüntüleme.....	6
2.1.5. Gümüş Sülfür Kuantum Noktaları.....	8
2.2. KAPLAMA AJANI OLARAK DENDRİGRAFT	10
2.3. KONTROLLÜ İLAÇ TAŞINIMI VE HEDEFLEME	12
2.3.1. Nanoparçacıkların Biyolojik Uygulamalar İçin Hazır Hale Getirilmesi	13
2.3.2. Glukoz Etiketli Hedefleme	13
2.4. GLİOBLASTOMA VE NANOPARÇACIKLARIN GLİOBLASTOMA ÜZERİNE TERANOSTİK ETKİNLİĞİ.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARININ HAZIRLANMASI.....	18
3.1.1. Gereçler	18
3.1.2. Gümüş Sülfürün Sentezi.....	18
3.1.3. Ag ₂ S@2MPA Karakterizasyon Uygulamaları	18
3.2. DENDRİGRAFT KAPLI GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARININ HAZIRLANMASI	19
3.2.1. Gereçler	19
3.2.2. Dendrigrift Kaplı Gümüş Sülfür Kuantum Noktalarının Sentezi	19
3.2.3 Ag ₂ S@2MPA/DGL ₃ Karakterizasyon Uygulamaları	20

3.3. DENDRİGRAFT KAPLI GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARININ GLİKOZLA ETİKETLENMESİ	20
3.3.1. Gereçler	20
3.3.2. Dendrigrift Kaplı Gümüş Sülfür Kuantum Noktaları ile PEG-Glu Sentezi	20
3.3.3. Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu Karakterizasyon Uygulamaları	20
3.4. GLİKOZ ETİKETLİ DENDRİGRAFT KAPLI GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARA DOKSORUBİSİN YÜKLENMESİ	21
3.4.1. Gereçler	21
3.4.2. Glikoz Etiketli Dendrigrift Kaplı Gümüş Sülfür Kuantum Noktalarına Yüklenecek Doksorubisin İlaç Oranının Belirlenmesi ve İlacın Parçacıklara Yüklenmesi	21
3.4.3 Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu/Dok Karakterizasyon Uygulamaları	21
3.5. Ag ₂ S@2MPA, Ag ₂ S@2MPA/DGL3, Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU VE Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU/DOK YAPILARININ SİTOTOKSİSİTE UYGULAMALARI	22
3.6. Ag ₂ S@2MPA/DGL3/DOK, Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU/DOK, Ag ₂ S@2MPA/DGL3 ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU YAPILARININ HÜCRE İÇİ ALINIM ANALİZ UYGULAMALARI	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Ag ₂ S@2MPA KUANTUM NOKTALARI	24
4.1.1. Ag ₂ S@2MPA Kuantum Noktalarının Konsantrasyona Bağlı Işımasının Optimize Edilmesi.....	30
4.1.2. Ag ₂ S@2MPA Kuantum Noktalarının Termogravimetrik Analizi	31
4.1.3. Ag ₂ S@2MPA Kuantum Noktalarının Taramalı Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Görüntüleme Analizi.....	32
4.2. Ag ₂ S@2MPA/DGL3 KUANTUM NOKTALARI.....	33
4.2.1. Ag ₂ S@2MPA/DGL3 Kuantum Noktalarının pH Değişikliği	36
4.3. Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU KUANTUM NOKTALARI	37
4.4. Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU/DOK KUANTUM NOKTALARI.....	39
4.5. Ag ₂ S@2MPA, Ag ₂ S@2MPA/DGL3, Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU/DOK YAPILARININ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ANALİZ EDİLMESİ	41
4.6. Ag ₂ S@2MPA/DGL3/DOK ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-GLU/DOK YAPILARININ HÜCRE İÇİ ALINIM ANALİZİ	44
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR	54

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Test edilmiş DGL jenerasyonların fizikokimyasal özellikleri.....	10
Tablo 4.1: Ag ₂ S@2MPA kuantum noktalarının sentez optimizasyonu	24
Tablo 5.1: Literatüre ait bazı Ag ₂ S kuantum parçacıkları	49



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Elektromanyetik spektrum, yakın ultraviyole lambanın uyarımı CdSe KN'lerin boyuta bağlı lüminesans renkleri ve bu CdSe KN'lerden bazılarının fotolüminesans spektralları.....	2
Şekil 2.2: Absorpsiyon, floresans ve fosforesans için Jablonski diyagramı	4
Şekil 2.3: CdSe kuantum noktalarının <i>in vitro</i> sitotoksitesi.....	7
Şekil 2.4: KN'lerle konjuge hedeflenmiş multimodel immünolipozomların etkileri	8
Şekil 2.5: a) FA ile etiketlenmiş ve doksorubisin yüklü Ag ₂ S-PEG KN'larının şematik gösterimi, b-ç) control HeLa hücrelerinin ters floresans mikroskop görüntüleri, d-f) KN-Dok (10 µg Ag/ml; 0,672 mg KN/ml) ile 6 saat inkübasyon sonrası HeLA hücreleri, g-h) KN-FA-Dok (10 µg Ag/ml; 0,836 mg KN/ml)	9
Şekil 2.6: a) Anjiyo-DOK-DGL-JNP'nin şematik illüstrasyonu, b) Meme kanseri hücrelerinde Anjiyo-DOK-DGL-JNP'nin verilmesinin şematik illüstrasyonu.....	11
Şekil 2.7: Antikanser ilacı yüklenen nanotaşıyıcıların pasif doku hedeflemesi ve aktif hücresel hedeflemesi, a) sitotoksik içeriklerini kanser hücrelerinin yanında serbest bırakılması, b) kanser hücrelerin zarına bağlanması, c) hücresel içselleştirilme.....	12
Şekil 2.8: 2-DG kaplamalı veya 2-DG kaplamasız SPDON'ların hücresel alımının TEM görüntüleri.....	14
Şekil 2.9: Manyetik ilaç teslimatının şematik gösterimi	16
Şekil 2.10: 2-deoksi-D-glikoz fonksiyonelleştirilmiş biyobozunur polimer nanopartiküllerin glioma tedavisi için çift hedefli ilaç dağıtım sistemi olarak glikoz taşıyıcı ile tasarımı.....	17
Şekil 4.1: R1 reaksiyonun 5 saat boyunca 15 dakika aralıklı FL grafiği	25
Şekil 4.2: R1 reaksiyonun 20. saatten sonra 8 saat süreli FL grafiği	25
Şekil 4.3: R2 reaksiyonun a) ilk 6 saat ve b) 21-44 saat süre aralıklı FL grafiği	26
Şekil 4.4: R3 reaksiyonun 2 saat ve 7 saat 30 dakika süre aralıklı FL grafiği	27
Şekil 4.5: R4 reaksiyonun 2-18 saat süre aralıklı FL grafiği.....	27
Şekil 4.6: R5 reaksiyonun 2-6 saat süre aralıklı FL grafiği.....	28

Şekil 4.7: Ag ₂ S@2MPA kuantum noktaları için tasarlanan R6 reaksiyonu sonu FL değeri grafiği.....	28
Şekil 4.8: Ag ₂ S@2MPA kuantum parçacıkların a) boyut ve b) zeta potansiyel ölçüm sonuçlarını, stabilizasyonu sağlanan Ag ₂ S@2MPA kuantum parçacıkların a) boyut ve b) zeta potansiyel ölçüm sonuçlarını.....	29
Şekil 4.9: Ag ₂ S@2MPA ve stabilize Ag ₂ S@2MPA kuantum noktalarının kızılötesi spektralleri.....	30
Şekil 4.10: Stok numunenin değişik konsantrasyonlarının a) absorbans ve b) FL grafiği..	31
Şekil 4.11: a) Ag ₂ S@2MPA ve b) stabilizasyonu sağlanan Ag ₂ S@2MPA KN'lerin 50-1150°C arasındaki termogravimetrik analiz grafiği.....	32
Şekil 4.12: a ve b) Ag ₂ S@2MPA, c ve d) stabilize Ag ₂ S@2MPA KN'lerin STEM görüntüleri.....	33
Şekil 4.13: Ag ₂ S@2MPA kuantum noktalarına 75 mg, 50 mg, 25 mg ve 12,5 mg DGL3 yüklenmiş yapılarının hidrodinamik yoğunluk boyut grafiği	34
Şekil 4.14: Ag ₂ S@2MPA/DGL3 kuantum parçacıkların a) boyut ve b) zeta potansiyel ölçüm sonuçlarını.....	35
Şekil 4.15: Ag ₂ S@2MPA/DGL3 ve DGL3'ün kızılötesi spektralleri.....	35
Şekil 4.16: Ag ₂ S@2MPA, Stabilize Ag ₂ S@2-MPA, Ag ₂ S@2MPA/DGL3 kuantum noktaları ve DGL3'ün her adımdaki kızılötesi spektralleri	36
Şekil 4.17: Ag ₂ S@2MPA/DGL3 için absorbans kalibrasyonu sağlanmış pH değişimine bağlı FL pikleri	36
Şekil 4.18: Ag ₂ S@2MPA/DGL3 ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu kuantum noktalarının fotoluminesans değerleri.....	37
Şekil 4.19: Ag ₂ S@2MPA/DGL3 ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu kuantum noktaları için yoğunluk boyut dağılım grafiği	38
Şekil 4.20: Sentezlenen Ag ₂ S@2MPA, Stabilize Ag ₂ S@2MPA, Ag ₂ S@2MPA/DGL3 ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3/Glu kuantum noktaları kızılötesi spektralleri	39
Şekil 4.21: Konsantrasyonu belirlenmiş doksorubisin ilaçlarının FL grafiği	39

Şekil 4.22: Konsantrasyonları belirlenen Ag ₂ S@2MPA kuantum noktalarının absorbanş grafiği.....	40
Şekil 4.23: Ag ₂ S@2MPA, Stabilize Ag ₂ S@2MPA, Ag ₂ S@2MPA/DGL3, Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu kuantum noktaları ile muamele edilen LN18 hücre hattının yüksek ve düşük glukozlu ortamlardaki MTT hücre toksisite analiz sonuçları	42
Şekil 4.24: Ag ₂ S@2MPA, Stabilize Ag ₂ S@2MPA, Ag ₂ S@2MPA/DGL3, Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu kuantum noktaları ile muamele edilen U87 hücre hattının yüksek ve düşük glukozlu ortamlardaki MTT hücre toksisite analiz sonuçları.....	42
Şekil 4.25: a) Dok ilacının LN18 hücrelerinin canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisinin sonuçları, b) Dok konsantrasyonları 6,25-400 ng/ml belirlenen Ag ₂ S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'lerle muamele edilen LN18 hücrelerin canlılığı.....	43
Şekil 4.26: Dok konsantrasyonları 6,25-400 ng/ml belirlenen Ag ₂ S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'lerle muamele edilen U87 hücrelerin canlılığı	44
Şekil 4.27: Dok konsantrasyonları 6,25-400 ng/ml belirlenen Ag ₂ S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'lerle muamele edilen MCF7 hücrelerin canlılığı.....	44
Şekil 4.28: Ag ₂ S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu/Dok kuantum noktalarının U87 hücrelerine uygulaması sonrası 24 saat sonundaki floresans mikroskop görüntüleri.....	45
Şekil 4.29: Ag ₂ S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu/Dok kuantum noktalarının MCF7 hücrelerine uygulaması sonrası 24 saat sonundaki floresans mikroskop görüntüleri.....	46
Şekil 4.30: Ag ₂ S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag ₂ S@2MPA/DGL3-Glu/Dok kuantum noktalarının MCF7 hücrelerine uygulaması sonrası 24 saat sonundaki floresans mikroskop görüntüleri.....	47
Şekil 5.1: Ag ₂ S@2MPA kuantum noktalarının 4°C ve 25°C'li ortamdaki FL grafiği	48
Şekil 5.2: Fosfor ışıması olan moleküldeki enerji seviyesi. a) absorpsiyon, b) floresans ışıması, c) ortakararlı seviyeye geçiş, d) termal uyarılma, e) ve f) fosfor ışıması, g) çok küçük geçiş olasılıklı absorsiyon	49

Şekil 5.3: Sırası ile $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Dok}$ ve $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Glu-Dok}$ kuantum noktaları ile muamele edilen LN18 hücrelerinin Dok alınının floresans mikroskop görüntüleri.....51

Şekil 5.4: Sırası ile $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Dok}$ ve $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Glu-Dok}$ kuantum noktaları ile muamele edilen MCF7 hücrelerinin Dok alınının floresans mikroskop görüntüleri.....52

Şekil 5.5: Sırası ile $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Dok}$ ve $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Glu-Dok}$ kuantum noktaları ile muamele edilen U87 hücrelerinin Dok alınının floresans mikroskop görüntüleri52



SİMGELER VE KISALTMALAR

1-TGL	: 1-tiyogliserol
2-DG	: 2-deoksi-D-glukoz
2MPA	: 2-mercaptopropionik asit
3MPA	: 3-mercaptopropionik asit
A	: Absorbans
a.u.	: Arbitrary units/ görelî birim
Ag	: Gümüş
Ag₂S	: Gümüş sülfür
Ag₂S@2MPA	: 2-merkaptopropiyonik asit kaplı gümüş sülfür
Ag₂S@2MPA/DGL3	: Dendrîgraft poli L-lizin kaplı 2-merkaptopropiyonik asit kaplı gümüş sülfür
Ag₂S@2MPA/DGL3-Dok	: Doksorubisin yüklü glukoz etiketli dendrîgraft poli L-lizin kaplı 2-merkaptopropiyonik asit kaplı gümüş sülfür
Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu	: Glukoz etiketli dendrîgraft poli L-lizin kaplı 2-merkaptopropiyonik asit kaplı gümüş sülfür
Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok	: Doksorubisin yüklü glukoz etiketli dendrîgraft poli L-lizin kaplı 2-merkaptopropiyonik asit kaplı gümüş sülfür
AgInS₂	: Gümüş indiyum sülfat
AgNO₃	: Gümüş nitrat
APTS	: 3-aminopropil tritoksisilan
Ar	: Argon
C	: Karbon

c	: Çözelti konsantrasyonu
Cd	: Kadmiyum
CdHgTe	: Kadmiyum cıva tellürid
CdSe	: Kadmiyum selenür
CH₃COOH	: Asetik asit
CuInS₂	: Bakır indiyum sülfat
Cy5.5	: Siyanin5.5
Cy7.5	: Siyanin7.5
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorit
DGL	: Dendrigaft poli L-lizin
DGL3	: Dendrigaft poli L-lizin jenerasyon 3
dH₂O	: Damıtılmış su
DLS	: Dynamic light scattering/dinamik ışık saçılımı
DMSA	: Meso-2,3-dimerkaptosüksinik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
Dok/Dox	: Doksorubisin/doxorubicin
EDA	: Etilendiamin
EDC	: N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
EO	: Etilen oksit
F	: Floresan yoğunluğu
FA	: Folik asit
FBS	: Fetal bovine serum/ fetal sığır serumu
FL	: Fotolüminesans
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
Glu	: Glukoz

Glut	: Glukoz taşıyıcı/glucose transporter
HeLa	: Rahim ağzı kanseri
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2
IL	: İmmünolipozom
In	: İndiyum
InAs	: İndiyum arsenit
IUdR	: 5-iyodo-2-deoksiüridin
JNP	: Jelatin nanoparçacık
KBB/BBB	: Kan beyin bariyeri/blood brain barrier
kDa	: Kilo Dalton
KE	: Kapsüllenme etkinliği
k_e	: S ₁ 'den belirli ışık emisyon oranını
k_i	: S ₁ azalan tüm radyatif-olmayan süreçlerin oranlarının toplamı
KN/QDs	: Kuantum noktaları/quantum dots
KV	: Kuantum verimi
ℓ	: Işığın çözeltide katettiği yol
LN18	: İnsan beyin glioblastoma hücre hattı
M	: Orta kararlı seviye
MA	: Moleküler ağırlık
mAb	: Monoklonal antibadi
MCF7	: İnsan meme kanseri hücre hattı
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolyum
Na₂S	: Sodyum sülfür
NaOH	: Sodyum hidroksit

NH₂	: Amin grubu
NHS	: N-hidroksisüksinimid
NIH/3T3	: Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
NIR	: Near-infrared/yakın kızıl ötesi
OH	: Hidroksil grup
Pb	: Kurşun
PbS	: Kurşun sülfür
PBS	: Phosphate buffered saline/fosfat tamponlu salin
PEG	: Polietilen gliko
PEGDA	: Polietilen glikol diakrilat
PEI	: Polietilenimin
R1, R2, R3, R4, R5, R6	: Reaksiyon 1, 2, 3, 4, 5, 6
S₀	: Temel hal enerji seviyesi
S₁	: 1. tekli (singlet) enerji seviyesi
S₂	: 2. tekli (singlet) enerji seviyesi
scFv	: Tek zincirli bir değişken fragman
Si	: Silikon
SPDON	: Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacık
STEM	: Taramalı elektron mikroskobu
T₁	: 1. üçlü (triple) enerji seviyesi
TEM	: Geçirimli electron mikroskobu
TGA	: Tiyoglikolik asit/termogravimetrik analiz
U251	: İnsan glioblastoma hücre hattı
U87	: İnsan glioblastoma hücre hattı
V_t	: Toplam hacim

YE	: Y¼klenme etkinliği
ZnS	: iko s¼lfit
E	: Molar absorpsiyon sayısı
τ	: Floresan ¼mr¼
Φ_f	: Kuantum verimi



DENDRİGRAFT KAPLI GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARININ HAZIRLANMASI VE TERANOSTİK POTANSİYELLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Glioblastom tüm beyin tümörleri içerisinde prognozu en zor ve en ölümcül olanlardandır. Günümüzde kullanılan başarılı tedavi stratejilerine rağmen glioblastom prognozunda hala büyük bir zorluk yaşanmaktadır. Yakın kızılötesinde özellikle medikal görüntüleme penceresi olarak bilinen 700-900 nm aralığında kuvvetli ışımaya sahip olan, biyouyumlu gümüş sülfür kuantum noktacıkları nanoteranostik ajanlar için mükemmel bir bileşendir. Kuantum noktacıkları yüzeyleri fonksiyonelleştirmeye uygundur dolayısıyla hedefli yönlendirme için de uygun bir platformdur. Glukoz taşıyıcı 1 ve Glukoz taşıyıcı 3 reseptörleri glioma hücrelerinde çok eksprese edilmektedir. Bu nedenle glukoz ile etiketlenen teranostik parçacıklar glioblastomun ve kan beyin bariyerinin hedeflemesine yardımcı olmaktadır.

Gereç ve Yöntem: Biyouyumluluğu yüksek 2-merkaptopropiyonik asit kaplı, yakın kızılötesinde ışılan Ag_2S kuantum noktacıkları sentezlenip biyobozunur, immünojenik olmayan dendrigraft ile kaplandı. Daha sonra yüzeyi dendronize, ultra küçük bu parçacıkların uçları glukoz ile dekore edildi. Nihai ürüne etkili antikanser ilaç olan Doksorubisin (Dok) yüklenerek gliom hücrelerinde kompleksin terapötik ve teşhise yönelik etkileri incelendi.

Bulgular: Glioblastoma hücrelerinin terapötik yaklaşımı hücre kültüründe incelenip glukoz ile etiketlenen kuantum noktaların toksik olmayan dozunda ilaç yüklemesi yapılarak hücre içi alınımları ve hücre canlılığı belirlendi.

Sonuç: Elde edilen yaklaşımlarla, sentezlenen teranostik kuantum parçacıklarının *in vivo* uygulamalarda glukoz reseptörleri sayesinde glioblastoma hücrelerine ulaşarak tedavi ajanının tümöre ulaşması sağlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Dendrigraft, Glukoz Etiketleme, Gümüş Sülfür, Teranostik Kuantum Noktaları

PREPARATION OF DENDRIGRAFT COATED SILVER SULFIDE QUANTUM DOTS AND STUDY OF THEIR THERANOSTIC POTENTIALS

ABSTRACT

Aim: Glioblastoma is one of the most difficult and deadly to prognosticate of all brain tumors. Today glioblastoma prognosis still has a great difficulty despite the successful treatment strategies are used. Biocompatible silver sulfur quantum dots, which have strong excitation in the 700-900 nm range in near infrared especially known as medical imaging windows, are an excellent component for nanotheranostic agents. Quantum dots are suitable for functionalizing surfaces that is a suitable platform for targeting. Glucose transporter 1 and Glucose transporter 3 receptors are overexpressed in glioma cell and glioma stem cell membrane. Therefore, theranostic particles labeled with glucose to help targeting glioblastoma and blood brain barrier.

Materials and Methods: Biocompatible 2-mercaptopropionic acid coated and nearby infrared emitting Ag₂S quantum dots (Ag₂S@2MPA) were synthesized and coated with biodegradable and non-immunogenic dendrigraft. The surface was dendronized and the ends of these ultra-small particles were decorated with glucose. Then an effective anticancer drug doxorubicin (Dox) was loaded into the final product to examine the therapeutic and treatment effects of the complex for glioma cells.

Results: Non-toxic doses of glucose labeled quantum dots were loaded with drugs in order to examine the therapeutic approach of glioblastoma in cell culture and cellular uptake and cell vitality were determined.

Conclusion: By the obtaining approaches, synthesized theranostic quantum dots may reach glioblastoma cells thanks to glucose receptors and help to *in vivo* study in order to reach the treatment agents to tumor.

Key Words: Dendrigraft, Glucose Tagged, Silver Sulfate, Theranostic Quantum Dots

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tıbbi pencerede yayılan Ag_2S KN'leri (700-900 nm) hem parlak fotoluminesans hem de yüksek biyouyumluluk içeren floresan ışıması verir, bu da onları bu tür teranostik nanoyapılar için mükemmel bir bileşen haline getirir. Herhangi bir ağır metal içermezler ve yakın kızılötesi görüntüleme yöntemi olarak kullanılabilirler. Ag_2S optik görüntüleme yöntemine eş zamanlı olarak glioma ve beyin kök hücre için kargo senkronik hedeflemesine yardımcı olarak; zaman, maliyet ve kolaylık gibi avantajlar vadeder.

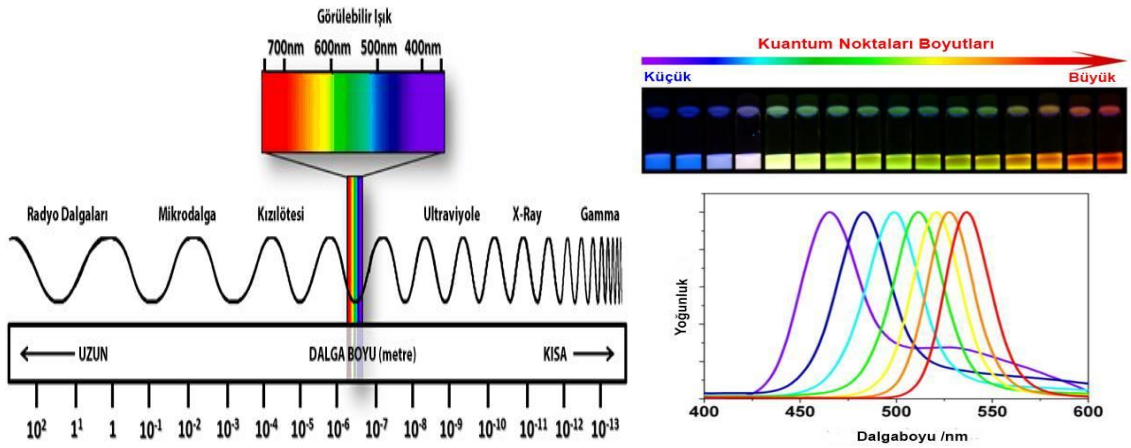
Doksorubisin beyin tümörü de dahil olmak üzere katı tümörlerin farklı tedavi için kullanılabilecek çok küçük ve önemli bir kemoterapötik ilaçtır. Ancak kötü huylu beyin tümörlerine; kan beyin bariyeri ve gliom hücreleri membran yoluyla bu ilacın taşınması için uygun dağıtım sisteminin araştırılması büyük bir sorundur. Bu sorun, gliom hücrelerindeki GLUT transferlerinin anlatımının fazlalığı temeline dayanarak nanoparçacıkların glukoz ile etiketlenmesi ve taşınmasıyla çözülmeye çalışılmıştır. Kuantum noktalarının ilaç dağıtım sisteminde uygulanabilmesi için biyolojik olarak parçalanabilir katyonik kaplamaya ihtiyacı vardır. Ag_2S KN'lerin yüzeyinde toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilir ve son derece biyouyumlu doğal kaplama katyonik L-lizin dendron ile kaplanması hedeflenmektedir. Teranostik ultra küçük $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}$ ilaç ile bileştirilmiş salınım uygulamaları için uygun olan yüzeyin elde edilmesini sağlar. Kanser hücrelerinde kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcısının (GLUT1 ve GLUT3) aşırı ekspresyonuna dayanarak Ag_2S kuantum noktaları dendronize edildikten sonra 2-deoksi-D-glukoz ($\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}\text{-Glu}$) ile etiketlenir ve böylelikle salınım için biyobozunur, son derece biyouyumlu hedefli teranostik nanotaşıyıcı geliştirilir. Böyle bir birleştirici tedavi ile kesin olarak kanserli hücrelere tedavinin erişimi sağlanır. Kanser hücrelerinde kemoterapötik ilaç birikimi artırılır ve normal vücut hücrelerinde meydana gelen toksisite azaltılmış olur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KUANTUM NOKTALARI

Yarı iletken nanokristaller olarak da bilinen kuantum noktaları (KN), III-V veya II-VI elementlerinden oluşan son derece küçük boyutlu (10 nm' den az) nanomalzemelerdir (1, 2). Bu yapılar, toplu ve moleküler formlar arasında bulunan bir ara yapıdadır (3). Genel olarak KN'ler çok yönlü biyokonjugasyon ligand ve yüzey modifikasyonuna sahip kristal çekirdek ve kabuktan oluşur (1). Çekirdek malzemeye göre kabaca gümüş (Ag), indiyum (In) bazlı metal KN'ler; karbon (C), silikon (Si) bazlı metalik olmayan KN'lerin yanı sıra kompozit KN'ler ve diğerleri olarak sınıflandırılabilirler (4). Diğer tasarlanmış nanomalzemelerin aksine, yüksek düzey floresan, fosfor ve elektro-kemilüminesans özellikleri vardır (5).

KN' ler ayarlanabilir, dar fotolüminesans (FL) bantları; geniş, sürekli uyarım spektraları; yüksek floresan kuantum verimi (KV), uzun lüminesans ömrü ve foto-ağartmaya karşı üstün kararlılığı gibi fotofiziksel özellikleri bünyesinde barındırır (6).



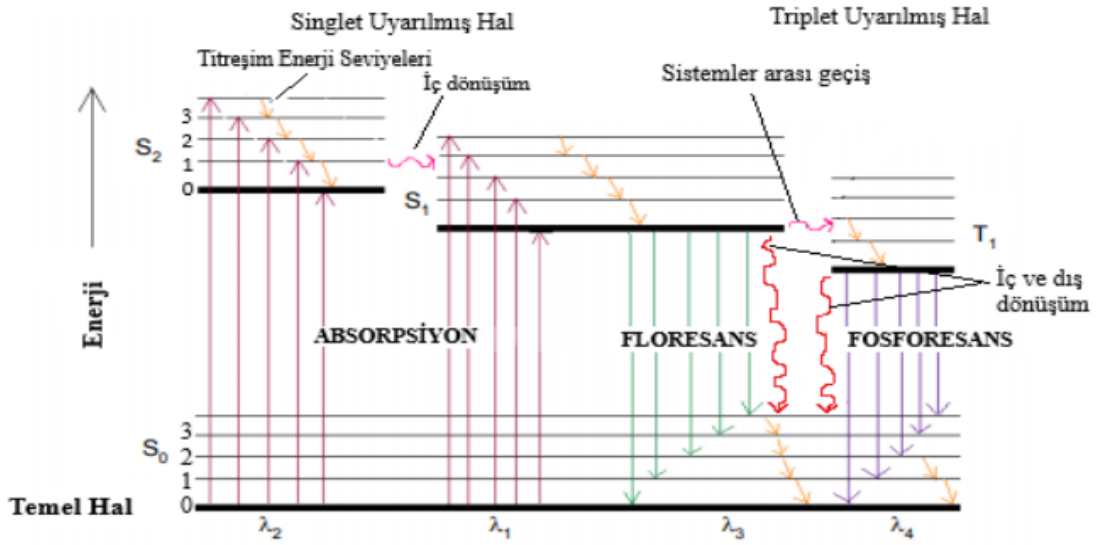
Şekil 2.1: Elektromanyetik spektrum (solda), yakın ultraviyole lambanın (sağ üstte) uyarımı (altında) CdSe KN'lerin boyuta bağlı lüminesans renkleri ve bu CdSe KN'lerden bazılarının fotolüminesans spektraları (7, 8).

2.1.1. Boyuta Bağı Enerji Bandı Boşluğu ve Kuantum Sınırlaması

Her atom ayrı enerji seviyelerinde sınırlı elektronlara sahiptir. Çok sayıda atom bir araya geldiğinde, her atomun ayrı enerji seviyeleri sürekliliği olan bir enerji bandı oluşturur. Tamamen elektronlarla dolu en yüksek elektron enerji aralığına valans bandı denir. Valans bandının üzerinde, valant elektronik durumların en düşük aralığı olan bir iletim bandı vardır. İkisinin ayrılması bant boşluğudur. Gerilim, ısı veya foton akışı gibi harici bir uyarı uygulandığında, valans bandının elektronları iletim bandına atlar. Bu bant boşluğu, malzemelerin tipinin iletken, yarı iletken veya yalıtkan olarak belirlenmesinde önemli bir role sahiptir. İletim ve valans bandı arasında boşluk yoksa ve ikisi üst üste biniyorsa malzeme metal olarak kabul edilir. Bant boşluğu nispeten küçükse, uyarılan elektronlar geride pozitif bir delik bırakarak iletim bandına ulaşabilir ve malzeme yarı iletken olarak kabul edilir. Bant boşluğu nispeten büyükse, malzeme yalıtkandır (9).

2.1.2. Floresans Spektroskopisi

Bir molekül bir üst tekli (singlet) enerji seviyesine (S_2) uyarıldığında, ışık emisyonu yapmadan hızla ($< 10^{-10}$ saniye zaman içinde) bir düşük uyarılma durumuna (S_1) döner. Molekül, S_1 seviyeden S_0 seviyesine dönerken, dönme ve titreşim düzeylerinden herhangi birine gidebilir. Böylelikle molekül, foton emisyonu (floresan), iç dönüşüm (radyatif-olmayan süreç) ya da üçlü (triplet) enerji seviyesine (T_1) geçiş yapabilir. Üçlü enerji seviyesinde elektron çiftleri, tekli enerji seviyesinde olduğu gibi eşleşmiş olarak bulunmaz. T_1 'den molekül, radyatif (fosforesans) veya radyatif-olmayan süreçler ile S_0 'a geri dönebilir (Şekil 2.2). Uygun koşullar altında S_1 ve T_1 'de uyarım enerjilerini diğer moleküllere aktarabilir. S_1 'deki bir molekülün ömrü kromofora bağlı olarak on ila yüz nanosaniye arasında değişebilir. T_1 , hem kromofora hem de sıcaklığa bağlı olarak (mikrosaniyeden saniyeye kadar) nispeten uzun bir ömre sahiptir.



Şekil 2.2: Absorpsiyon, floresans ve fosforesans için Jablonski diyagramı (10)

Floresan spektroskopisini ilgilendiren en önemli etken floresan S₁ seviyesine ait süreçlerdir. Belirli bir kromofor için bu süreçler deneysel olarak floresan spektrumu, kuantum verimi, ömrü ve floresan polarizasyonu ile karakterize edilir. Floresan spektrumu, farklı dalga boylarındaki floresan yoğunluğunu temsil eder. Floresan kuantum verimi (Φ_f), ışık yayan ve eşitliğin kinetik parametreleri ile ilişkili olarak uyarılan moleküllerin fraksiyonudur. Kuantum verimi denklemi:

$$\Phi_f = \frac{k_e}{k_e + k_i}$$

Eşitlikte k_e , S₁'den belirli ışık emisyon oranını temsil eder ve k_i , S₁ azalan tüm radyatif-olmayan süreçlerin oranlarının toplamıdır. Floresan ömrü denklemi anlık bir ışık darbesi ile uyarılan bir kromoforun floresan yoğunluğunun düşüşünü açıklar. Floresan yoğunluğu (F) ile açıklanan floresan ömrü denklemi:

$$F(t) = F_0 e^{-t/\tau}$$

τ , yoğunluğun (F), F₀ başlangıç değerini e⁻¹'den düşmesi için gereken zamandır. τ denklemsel olarak k_e , k_i ve Φ_f ile ilgilidir. Bu denklemler, k_e ile k_i 'nin τ ve Φ_f için

deneysel olarak belirlenmiş değerlerinden hesaplanır (11). Floresan ömrü (τ) ve kuantum veriminin (Φ_f) k_e ile k_i arasındaki denklemsel ilişkisi:

$$\frac{1}{\tau} = k_e + k_i$$

$$\Phi_f = k_e \tau$$

Çoğu araştırma ve klinik laboratuvar spektrofotometreye veya floresan plaka okuyucuya erişebilir. KN'ler ile yaygın olarak kullanılan, oldukça güvenilir bu araçlar; basit floresan yoğunluğu ölçümlerine dayanan *in vitro* biyoanalizleri için kullanılabilir. Geleneksel organik boyalarla karşılaştırıldığında KN'lerin geniş emilimi ve dar emisyonu çok daha avantajlıdır (12).

2.1.3. Kuantum Noktalarının Sentezi

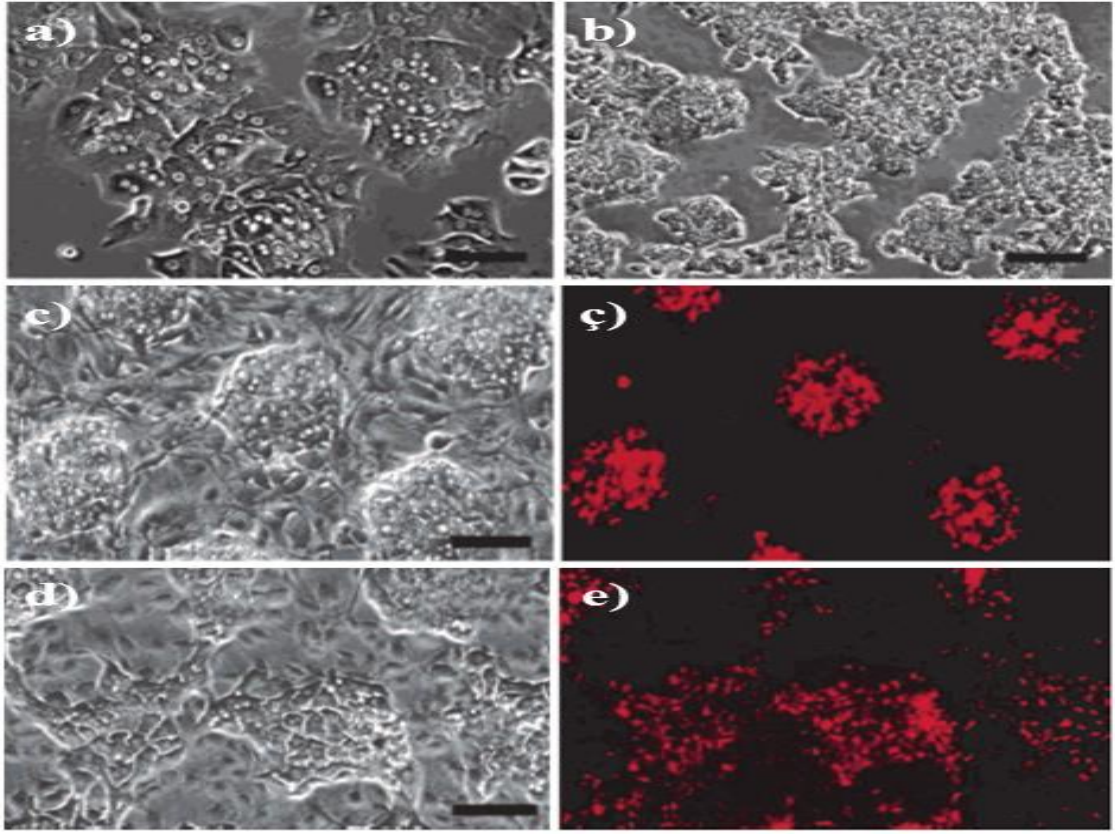
KN'ler, boyutsal emisyonundan sorumlu inorganik yarı iletken çekirdekten ve çekirdeğin yüzeyine bağlı organik bir kaplamadan oluşur. Ligand olarak da adlandırılabilen bu organik kaplama, büyüyen kristal yüzeyi etkisizleştirerek sentez sırasında kristal büyümeyi kontrol eder. Çekirdeği çevreleyen ortamdan korur ve reaktivitesini azaltır. Oksidasyonu önleyerek, çözücü etkileşimi ve dolayısıyla kolloidal kararlılığı sağlar. Ayrıca topaklanmayı (aglomerasyonu) önler ve yüzeyi işlevselleştirir. Kaplama malzemeleri KN'lerin istenilen uygulamalarına göre seçilebilir (13). Farklı kompozisyonlara ve özelliklere sahip KN'leri sentezlemek için çeşitli teknikler vardır. En sık kullanılan yaklaşımlar: organik çözücülerde yüksek sıcaklık sentezi ve KN'lerin sulu (aqueous) sentezidir. Organometalik öncüller aracılığıyla organik çözücülerde KN sentezi üç ana bileşenden oluşur; öncüller, organik yüzey aktif madde ve çözücüler. Yüzey aktif madde bazı durumlarda çözücü olarak da görev alabilir (14). KN'ler ayrıca uygun reaktifler ve kaplama maddeleri kullanılarak doğrudan suda sentezlenebilir: tiyoglikolik asit (TGA), 3-mercaptopropionik asit (3MPA), 2-merkaptopropionik asit (2MPA) gibi ve tiyolated moleküller, l-sistein, glutatyon, mezo-2,3-dimerkaptosüksinik asit (DMSA), 1-tiyogliserol (1-TGL) (15–17), peptitler, suda çözünen polimerler; polietilenglikol (PEG), polietilenimin (PEI), poli(akrilik asit) vb. (18). Bunlar kristal yüzeyi etkisizleştirmek ve suda kolloidal çözümler sağlamak için kullanılan kaplama ajanlarından bazılarıdır (3).

2.1.4. Yakın Kızılötesi Emisyonlu Kuantum Noktaları ve Biyogörüntüleme

KN'ler emisyon dalga boylarına göre iki gruba ayrılır: Görünür bölgedeki lüminesanslı KN'ler (400–700 nm); yakın kızılötesinde lüminesanslı KN'leri (NIR) bölgesi I (700–900 nm) ve II (1000–1300 nm) (19). Görünür (400-650 nm) ve ilk yakın kızılötesi bölge (NIR-I) (650-950 nm) floresan proplarının bazıları şunlardır: floresan protein (örneğin: yeşil veya kırmızı floresan protein), siyanin boyaları (örneğin: Cy5.5 ve Cy7.5), kuantum noktaları (örneğin: CdSe ve CdSe/ZnS) (20, 21).

Yakın kızılötesi (NIR) floresan görüntüleme; yüksek çözünürlük, hassasiyet ve hızlı görüntüleme sağlar ayrıca düşük maliyetlidir (22). NIR organik boyalar biyogörüntülemelerde kullanılır ama hızlı fotodegradasyon, düşük floresan kuantum verimi, geniş emisyon ve dar uyarılma spektrumu gibi sınırlandırılmaları nedeniyle uygulamaların genişliğini engeller (23). KN'leri yüksek fotolüminesans emisyon, kuantum verimleri, dar spektral bantları ve boyut ayarlanabilir emisyon profilleri sayesinde biyogörüntülemelerde kullanılabilecek iyi adaylardır (24, 25). NIR KN'leri vücuttaki derin penetrasyonu nedeniyle de *in vivo* görüntülemelerde tercih edilmektedir. Ayrıca vücuttaki hemoglobin ve suyun NIR KN'lerine göre zayıf absorpsiyon vermeleri, KN'lerin nanoteranostikler olarak kullanılmasını daha avantajlı hale getirmektedir (26, 27). Böylelikle NIR KN'ler, otofluoresans sorununu çözmede umut vadeder (28).

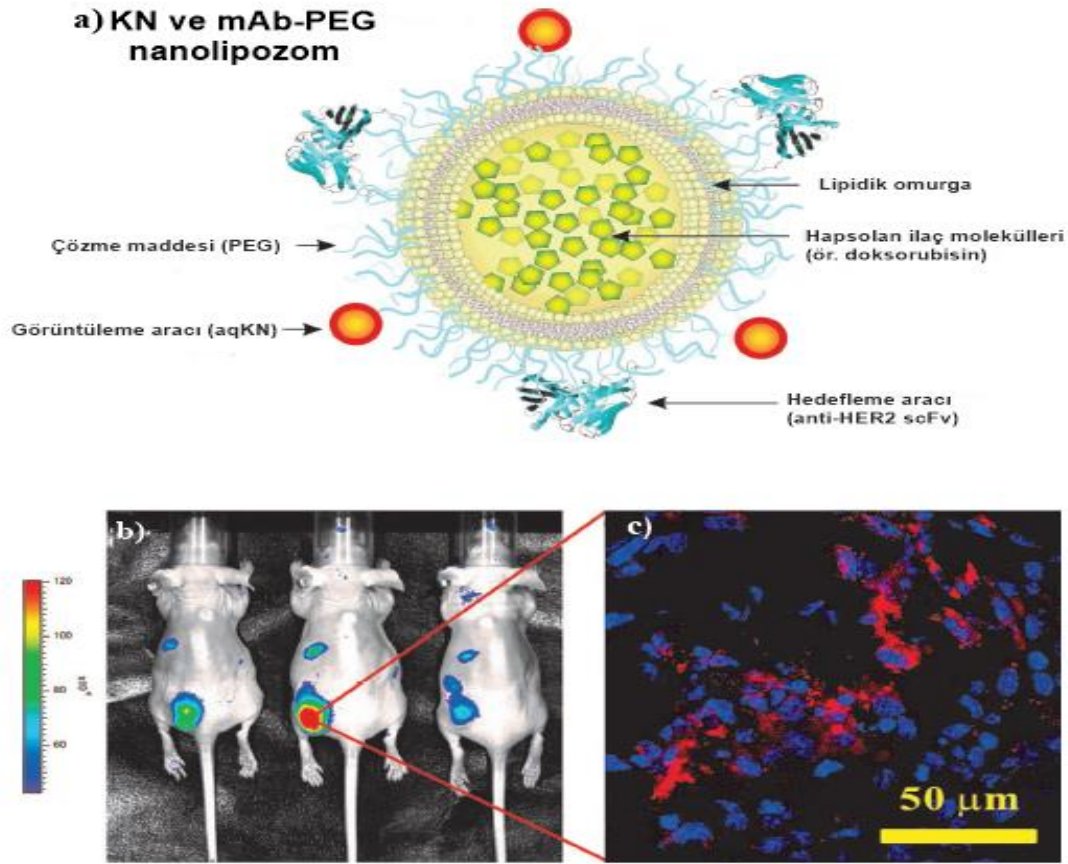
Bugüne kadar CdHgTe (26), CdHgTe/ZnS (29), InAs (30), PbS (31) ve CdSe (32) gibi çeşitli NIR KN'leri başarıyla *in vitro* ve *in vivo* biyomedikal uygulamalar için sentezlenmiştir (Şekil 2.3). Ancak kadmiyum, cıva, kurşun, tellurium ve selenyum da dahil olmak üzere kimyasal bileşenlerin potansiyel salınımı, bu NIR KN'lerin akut ve kronik toksisitelere yol açmasına neden olmaktadır (33, 34). Örneğin: Cd'nin desorpsiyonu ve serbest radikalın oluşturulması hücre içi bileşenlerle kasıtsız olarak etkileşime girebilir. KN'lerin oksidasyonu sonucu indirgenmiş Cd salınımının, sıçanlardan izole edilen birincil hepatositler içinde hücre ölümüne yol açabileceği bildirilmiştir. Lakin bunun büyük ölçüde üretim koşullarına ve KN'lerin dozuna da bağlı olduğu öne sürülmüştür (32).



Şekil 2.3: CdSe kuantum noktalarının *in vitro* sitotoksitesi.

Kontrol hepatosit kültürlerinin, faz kontrast mikroskobu ile tanımlanmış a ve b panelleri sırasıyla a) İyi tanımlanmış hücreler arası sınırları ve çekirdekleri b) Sitotoksik KN'lere maruz kalan canlı olmayan kültürlerin granül sitoplazması ve tanımlanmayan iç hücreli sınırlarını temsil eder, c) Fibroblastlarla çevrili hepatosit kolonilerinin ortak kültürünü gösteren; faz kontrast 1.gün görüntüsü, ç) KN etiketli hepatositlerin floresan görüntüsü, d) Hepatosit kolonilerinin yeniden düzenlenmesinin faz kontrast mikrofotografisi, e) 7 günlük ortak kültürden sonra KN etiketli hepatositlerin floresan görüntüsü (32, 35).

Üçlü I-III-VI NIR KN'ler (Cu-In-Se, CuInS₂, AgInS₂) içsel toksisiteye sebep olmadığı yakın zamanda bildirilmiş olsa da, optik özelliklerini kontrol ederken kimyasal bileşimlerini ayarlamak zordur (36-38). Yani *in vivo* koşullarda kompleks içinde KN'lerin bozulması meydana gelebilir. Bu da oldukça toksik ağır metal iyonlarının salınmasına yol açar. Bu nedenle biyolojik uygulama için düşük toksisiteye ve sudaki çözünürlüğü yüksek NIR KN'ler geliştirmek gerekir (39). Örneğin: Karboksilik asit fonksiyonelleştirilmiş CdSe/ZnS KN'leri ile EDC kimyasını kullanarak lipozomdaki birincil amino grubu ile konjugasyonu sağlanmıştır (Şekil 2.0.1).



Şekil 2.4: KN'lerle konjuge hedeflenmiş multimodel immünolipozomların (IL) etkileri

a) İşlevselleştirilmiş CdSe/ZnS KN'ler ve scFv ile donatılmış immünolipozomların konjugasyonu, b) MCF-7/HER2 ksenograft taşıyan çıplak farelerin floresan görüntüsü, anti-HER2 KN-IL'ler ile intravenöz enjeksiyonundan sonraki 30. saat, c) DAPI (mavi) ve KN-IL'ler (kırmızı) ile boyanmış çekirdekler için iki renkli tarama modu kullanılarak analizi sağlanan 48 saat enjeksiyon sonrasında elde edilen aşırı ifadelili HER2 dokusunun (5 µm) konfokal mikroskopi analizi (35, 40)

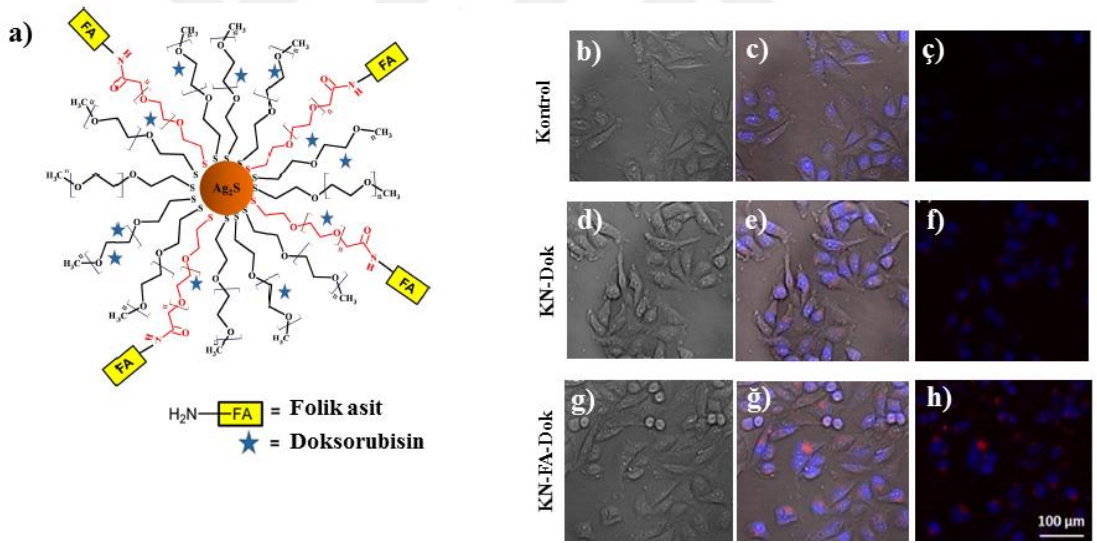
Son zamanlarda, ağır metal içermeyen Ag₂S KN'leri yüksek kuantum verimi, ultra parlak fotoluminesans, düşük toksisite, biyoyumluluk, yüksek foto-kararlılık, emisyon dalga boylarının ayarlanabilirliği gibi üstün yapısal, fizikokimyasal ve biyo-özellikleri nedeniyle biyogörüntüleme ajanı olarak kullanılmaya başlanmıştır (41–44).

2.1.5. Gümüş Sülfür Kuantum Noktaları

Gümüş Sülfür (Ag₂S) KN'leri, geniş absorbands-dar emisyon profili, ayarlanabilir emisyon dalga boyu ve uzun parlaklık ömrü sunar (45). Ayrıca Ag₂S KN'lerin parçacık boyutu ortalama 2,5 nm olarak 0,51–4,98 nm aralığında dağıtılır bu da kaplama için avantaj sağlar (46–48). Bununla beraber Ag₂S KN'leri, düşük sitotoksiklikleri nedeniyle *in vivo* uygulamalar için ideal NIR floresan KN'lerdir (Toksik Cd²⁺ ve Pb²⁺ iyonları bulundurmazlar.) (49–51). Sulu çözeltide yüksek kararlılık (çözünürlük ürün sabiti 6,3 ×

10^{-50} kadar düşüktür (43). Böylelikle Ag^+ iyonlarının biyolojik çevreye salınımı önlenir (52). Ag_2S KN'ler 0,96 eV (53) ideal bir dar enerji bant boşluğuna sahiptir. NIR-I penceresinde (650–950 nm) yayılan ve *in vivo* görüntülemeye kullanılan diğer KN'lerden daha fazla penetrasyon derinliğine (>5 mm) sahiptir ve ayrıca daha yüksek sinyal/gürültü oranı (100 >) verir (54, 55).

Ag_2S KN'lerin yüksek yüzey enerjisi, geri dönüşümsüz olarak toplanma eğilimini yüksek hale getirmiş ve geniş uygulamalarını sınırlandırmıştır (56). Sorunu çözmek için karboksilik asitler (57), tiyoller (58, 59), peptitler (27) ve polimerler (60, 61) ile kararlı hale getirilerek performansı artırılmaya çalışılmıştır (62). Aşık vd. (46), FA (folik asit) ile etiketlenmiş ve ilaç yüklü Ag_2S -PEG KN'leri hedef bölgeye seçici olarak teslimini reseptör aracılı alım ile sağlamıştır. Parçacıklar mükemmel ilaç verimliliği gösterirken kandaki dolaşımı da arttırmıştır ve ayrıca parçacıkların hızlı alımı azaltılmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: a) FA ile etiketlenmiş ve doksorubisin yüklü Ag_2S -PEG KN'lerinin şematik gösterimi, b-ç) kontrol HeLa hücrelerinin ters floresans mikroskop görüntüleri, d-f) KN-Dok (10 µg Ag/ml; 0,672 mg KN/ml) ile 6 saat inkübasyon sonrası HeLA hücreleri, g-h) KN-FA-Dok (10 µg Ag/ml; 0,836 mg KN/ml) (46)

2-Mercaptopropionik asit kaplı gümüş sülfür (2MPA/ Ag_2S) güçlü bir şekilde parlak, anionik, NIR yayan özelliktedir. Bu parçacıklar NIH/3T3 hücreleri tarafından yüksek hücre içi içselleştirme göstermiştir. Ayrıca otofluoresansı baskılayan güçlü hücre içi optik sinyal sağlamıştır. NIH/3T3 hücrelerinin canlılığında 600 µg/ml'ye kadar azalma bildirilmemiştir, bu da PEG'lenmeyen KN'ler için oldukça olağandışıdır. Yüzeydeki

karboksilik asitler, hedef ligandlar veya ilaçlarla eşlenerek üretildiğinden, bu bileşim birçok uygulama ve terapötik nanopartiküller için özel bir öneme sahiptir. Yalnız bu tür parçacıkların daha ayrıntılı toksisite analizine ihtiyaç vardır. Özkanvardar vd. (47) tarafından sunulan veriler; 2MPA/Ag₂S KN'lerin *in vitro* sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkilerini veren ilk verilerdir. Bu verilere göre 2MPA ile kaplanmış Ag₂S KN'ler; düşük toksisiteye ve yüksek biyouyumluluğa sahiptir. Çünkü Ag₂S ağır metal kaynaklı sitotoksikliğe, yarı iletken Ag₂S çekirdekte gözlenmemiştir.

2MPA-Ag₂S KN'ler suda kolloidal kararlıdır. Ayrıca ışımaları yüksektir ve son derecede biyouyumludurlar, bu da bu nanopartikülleri *in vivo* biyo-uygulamalar için gelecek vadeden ilaç taşıyıcıları ve görüntüleme ajanları yapmaktadır.

2.2. KAPLAMA AJANI OLARAK DENDRİGRAFT

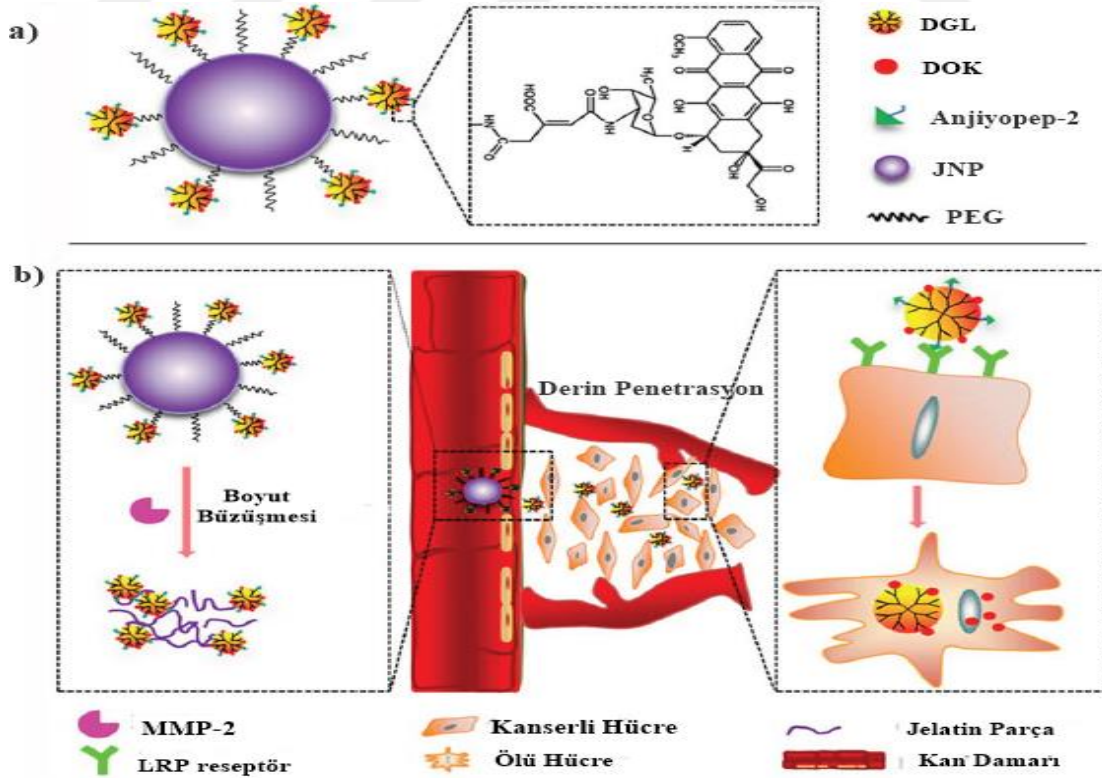
Dendritik polimerler sentetik polimer yapılarının dördüncü ana sınıfı olarak kabul edilmiştir (ilk üç sınıf: doğrusal, çapraz bağlantılı ve dallanmalı). Bu sınıf; çok dallanmalı polimerler, dendrimerler ve dendrigraft polimerlerinden oluşur (63). Tek-dağılımlı bu yapılar, ağaç benzeri simetriye ve yüzeylerinde bol miktarda fonksiyonel gruba sahiptir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Test edilmiş DGL jenerasyonların fizikokimyasal özellikleri (64)

DGL Jenerasyon	G2	G3	G4	G5
Moleküler ağırlık (g/mol)	8.600	22.000	65.300	172.300
Lizin grubu sayısı	48	123	365	963
pH:7'deki çapı (nm)	4,5	7	11	16
Polidisperslik	1,38	1,46	1,36	1,45
Dallanma noktası (%)	81	80	61	65
Serbest hacim (%)	0,766	0,804	0,825	0,791

Dendrigriftlar dendrimerlerden daha büyük ve esnek bir yapıya sahiptir, daha hızlı büyür ve yüzey grupları daha yoğun bir şekilde bulunur (65, 66). Dendritik polimerlerin dış grupları hidrofobik ilaçlar, antikörler veya organa özgü ligandlarla kolayca modifiye edilebilir. Böylece seçici ilaç teslimi ve teşhisinde uygulanabilir fonksiyonel nanotaşıyıcılar olarak kullanılırlar (67–69).

Dendrigrift poli L-lizin (DGL) küçük boyutlu (5–10 nm) ve tümör penetrasyonu için yüksek kapasiteye sahiptir (70, 71). Aynı zamanda hücresel düzeyde hedeflenen tedaviye; kendiliğinden-bağlanan yapısı, küçük boyutu ve çok sayıda yüzey grubunun varlığı nedeniyle büyük bir avantaj sağlar (72). Doksorubisin kanser ilacı DGL’de bulunan bu fonksiyonel gruplarla konjuge olmaktadır. Hu vd. (73) göre lipoprotein reseptör proteini ile hedefleme yapılarak, yüksek tümör tutulumu ve tümör penetrasyonunu artırmak için doksorubisin (DOK) yüklü dendrigrift poli L-lizin (DGL) ile jelatin nanoparçacıklar (JNP) üretilmiştir (Şekil 2.6). Anjiyo-DOK-DGL-JNP, 4T1 meme kanseri taşıyan fare modelindeki tümör büyümesini % 74,1 oranında engellemeyi başarmıştır.

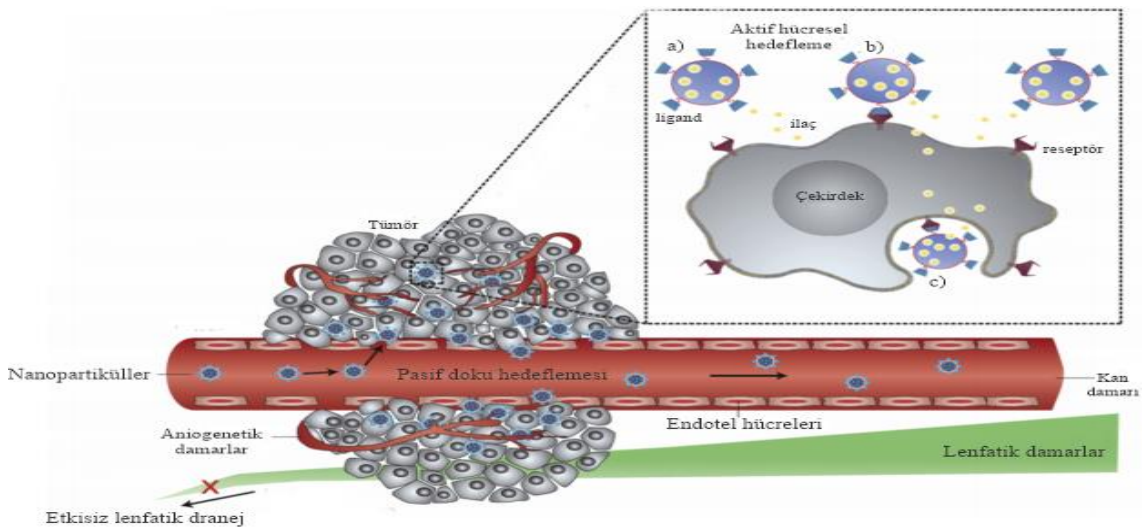


Şekil 2.6: a) Anjiyo-DOK-DGL-JNP'nin şematik illüstrasyonu, b) Meme kanseri hücrelerinde Anjiyo-DOK-DGL-JNP'nin verilmesinin şematik illüstrasyonu (73)

2.3. KONTROLLÜ İLAÇ TAŞINIMI VE HEDEFLEME

İlaç dağıtım sistemlerinin tasarımı son yıllarda dikkat çekmekte ve kontrollü ilaç salınımı için yeni yöntemler geliştirilmektedir. Geleneksel ilaç dağıtımında kandaki ilaç konsantrasyonu hızla artar ve daha sonra azalır. Her ilacın toksik ve etkisiz olduğu bir plazma seviyesi vardır. İdeal bir ilaç dağıtım sisteminin ana amacı, tek bir dozdan sonra istenen terapötik aralıkta ilacı tutmak ve/veya ilacı belirli bir bölgeye sistemik süresini azaltarak ulaştırmaktır (74). Nanosistemler katı tümörlerde ilaçların geçirgenliğini ve tutulumunu arttırabilir (75). Ayrıca kan dolaşım sisteminde uzun süre kalırlar ve belirtilen dozda birleştirilmiş ilaçların salınmasını sağlarlar. Böylece daha az yan etki ile daha az plazma dalgalanmalarına neden olurlar (76).

Nanoboyutlu yapılar doku sistemine nüfuz eder, ilacın hücreler tarafından alınmasını kolaylaştırır, verimli bir ilaç teslimatını ve hedeflenen yere ulaşımını sağlar (77–83). Kanserde anjiogenez yeni kan damarları oluşturur, ancak bu yeni damarların geçirgenliği yüksektir. Tümörlerin zayıf lenfatik drenajı tümöral dokularda nanotaşıyıcıların pasif birikmesine izin verir (84–87). Kemoterapi ilaçları içeren nanotaşıyıcılar; monoklonal antikolar, antikor parçaları, peptitler ve büyüme faktörleri ile yüzey konjugasyonu gerçekleştirebilir böylece aktif bir hedefleme elde edilir. Nanotaşıyıcılar yüksek yüzey alanı/hacim oranı nedeniyle birden fazla hedefleme ligandının birleştirilmesine izin verir (87–89).



Şekil 2.7: Antikanser ilacı yüklenen nanotaşıyıcıların pasif doku hedeflemesi ve aktif hüresel hedeflemesi, a) sitotoksik içeriklerini kanser hücrelerinin yanında serbest bırakılması, b) kanser hücrelerin zarına bağlanması, c) hüresel içselleştirilme (87)

2.3.1. Nanoparçacıkların Biyolojik Uygulamalar İçin Hazır Hale Getirilmesi

Dendrimerler, miseller, lipozomlar da dahil olmak üzere metalik, organik, inorganik ve polimerik nanoyapılar hedefe özgü ilaç dağıtım sistemlerinin tasarımında sıklıkla kullanılır. Özellikle daha az emilime ve zayıf çözünürlüğe sahip ilaçlar; bu nanopartiküllerle birleştirilir (80–83, 90–92). Bununla birlikte bu nanoyapıların ilaç dağıtım aracı olarak etkinliği; boyuta, şekle ve diğer doğal biyofiziksel/kimyasal özelliklere bağlı olarak değişir. Örneğin, çapları 10 ila 1000 nm arasında değişen polimerik nanomalzemeler, verimli bir teslimat aracı için ideal özellikler sergiler (93). Yüksek biyoyumumluluk ve biyobozunurluk özellikleri nedeniyle polivinil alkol, poli-L-laktik asit, polietilen glikol, poli (laktik-ko-glikolik asit) gibi çeşitli sentetik polimerler; aljinat, kitosan gibi doğal polimerler nanopartiküllerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (94–97).

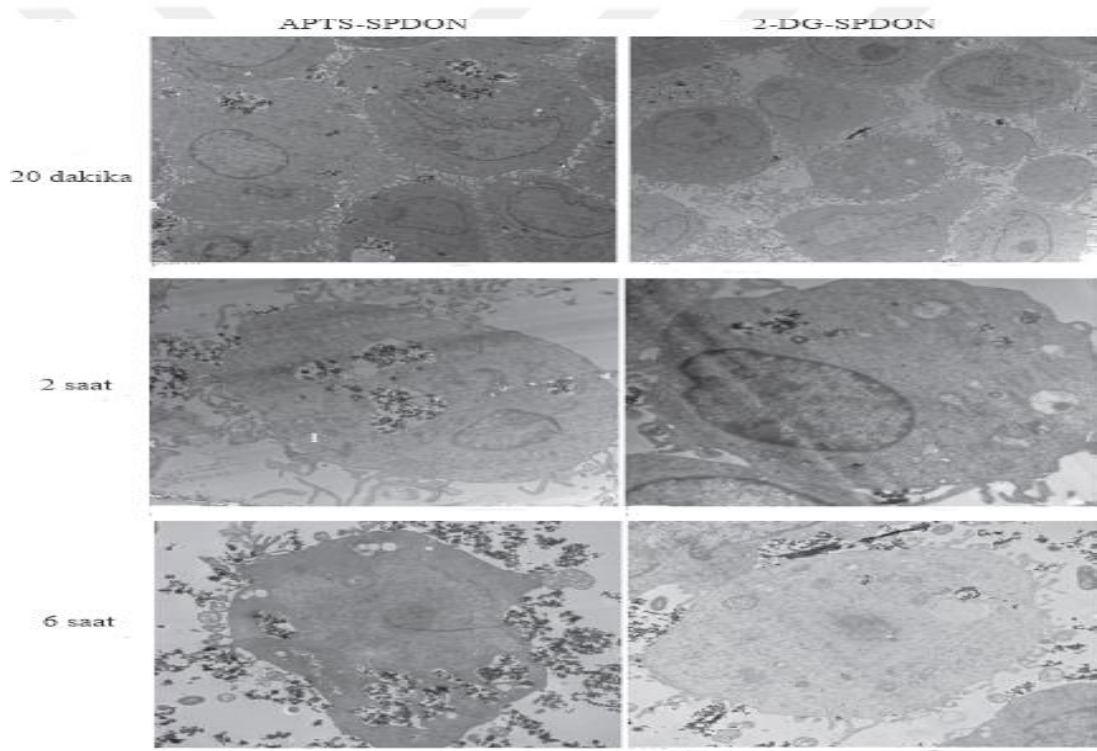
Polietilen glikol (PEG), tekrarlayan etilen glikol birimlerini farklı moleküler kütlelerin doğrusal veya dallı şekilleriyle bağlamasından oluşur (98). PEG; su molekülleri ile birlikte, bağlanmış ilacı enzim bozulmasından, hızlı renal atılımından ve hücre yüzey proteinleriyle etkileşimlerden korumak için bir kalkan görevi görür böylece olumsuz immünolojik etkileri sınırlandırır (99). Polietilenglikol diakrilat (PEGDA), tekrarlanan etilen oksit (EO) üniteleri ile polietilen glikolün (PEG) bir türevidir. PEGDA az toksik, suda çözünür, polimerleşen uç grupları olan esnek zincirli polimerdir (100, 101). Wuelfing vd. (102) yüzeyi PEG ile muamele edilen altın nanoparçacıkların bağlı olduğu PEG zincirlerinin sterik itici etkileri sayesinde sulu ortamdaki çözünürlüğünü (çözünürlüğünü) ve kararlılığını arttırmıştır.

2.3.2. Glukoz Etiketli Hedefleme

Kanser hücrelerinin östrojen reseptörü, folat reseptörü, glukoz reseptörü vb. gibi reseptörler aşırı eksprese edilebilir (103, 104). Bu reseptörler, kemoterapi ajanları veya ilaç taşıyıcıları ile tümör hücrelerine aktif hedefleme sağlayabilmektedir (104, 105).

Kötü huylu ve hızla büyüyen tümör hücrelerinin, glikolitik yola girme oranları normal doku hücrelerine nazaran genellikle 200 kat daha yüksektir. Mikroçevresel koşulları -özellikle hipoksi- ve metabolik aktiviteyi uyaran sinyal yollarındaki kanserle ilintili değişiklikler, kötü huylu tümörlerde glikoliz oranının yükselmesinin ana nedenleridir. Normal hücrelere göre bu tip hücrelerin, hücre yüzeyi glukoz taşıma

proteinlerinin aktivitesi ve ekspresyonu daha yüksektir. Bundan dolayı glukozun, glukoz taşıyıcıları (GLUT'lar, özellikle GLUT1 ve GLUT3) ile alımı tümör hücresinde artar. Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkların (SPDON) yüzeyine 2-deoksi-D-glukoz (2-DG) kaplaması, U-251 insan glioma hücresindeki *in vitro* manyetik rezonans görüntüleme yeteneğini, tip 1 ve 3 (GLUT1 ve GLUT3) glikoz taşıma proteinlerinin ekspresyonu ile önemli ölçüde arttırabilir (106). Ayrıca 3-aminopropil trietoksisilan (APTS) ile kaplanan süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklarına nazaran; 2-deoksi-D-glukoz etiketli nanoparçacıkların, U251 hücrelerinin sitoplazmasında çok daha fazla hücresel olarak içselleştirildiği fark edildi (Şekil 2.8).

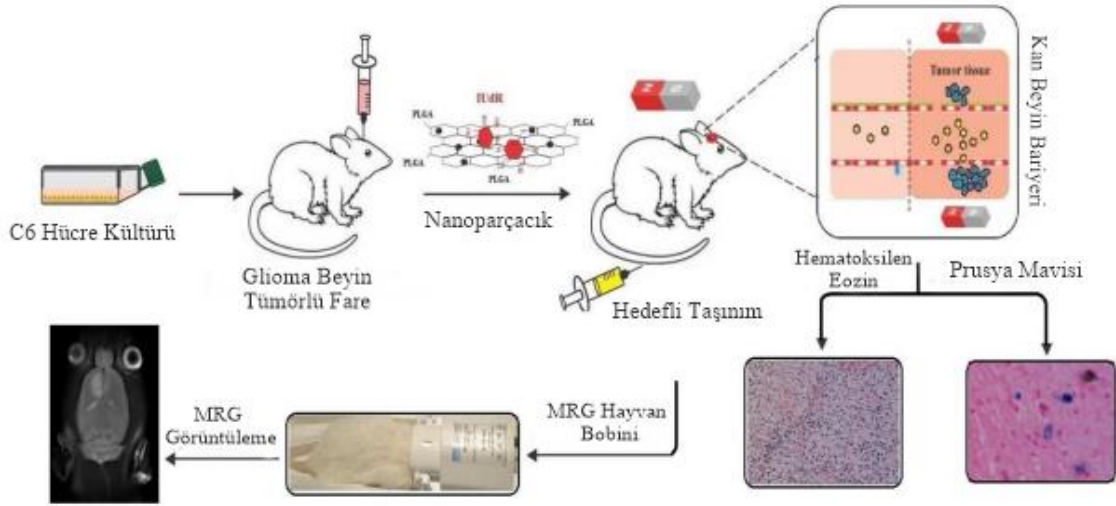


Şekil 2.8: 2-DG kaplamalı veya 2-DG kaplamasız SPDON'ların hücresel alımının TEM görüntüleri (106)

2.4. GLİOBLASTOMA VE NANOPARÇACIKLARIN GLİOBLASTOMA ÜZERİNE TERANOSTİK ETKİNLİĞİ

Glioma, primer beyin tümörlerini tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir ve köken aldığı hücrelere göre sınıflandırılır. Bunlar astrositik tümörler (astrocitoma, anaplastik astrositoma ve glioblastoma), oligodendrogliomalar, endimomalar ve

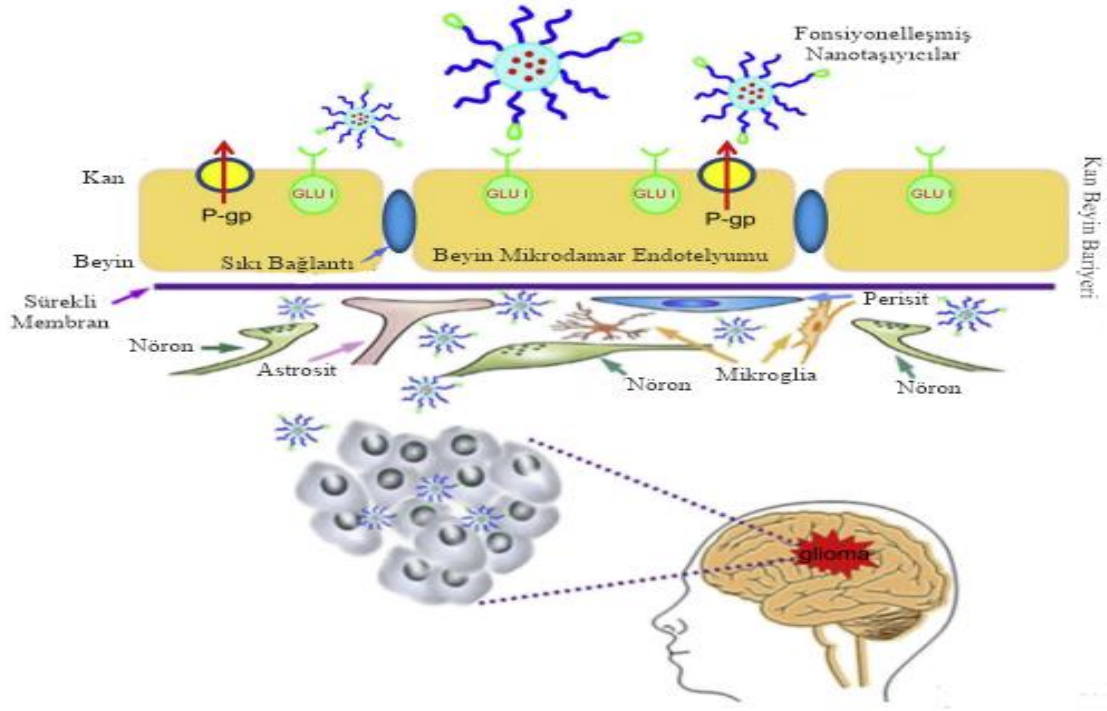
karışık gliomalardır (107, 108). Kötü huylu primer beyin tümörlerinin neredeyse % 80'ini oluşturan merkezi sinir sisteminin en sık görülen tümörleridir (109, 110). Glioblastoma primer kötü huylu beyin tümörlerinin %45,6'sını oluşturan bir hastalıktır (111). Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi mevcut tedavi stratejilerindeki birçok ilerlemeye rağmen glioblastomlu bir hastanın genel prognozu tüm kanser tiplerinde en zorlu konu olarak kalmıştır (112). Yüksek ilaç direnci ve kan beyin bariyeri (KBB) tarafından geçirgenlik kısıtlaması bu durumun iki ana nedenidir (113). Glioblastoma ve primer beyin tümörlerinin ekstrasöral organlarından kaynaklanan tümörlere göre daha az görülmesi nedeniyle; beyin, genotoksik strese yüksek derecede korunmak isteyebilir. Ayrıca KBB'den ATP bağlayıcı kaset ailesi taşıyıcı molekülleri, kimyasal mutajenlerin beyne difüzyonunu kısıtlar (114). Böylece ilaç KBB'den hasarlı bölgeye geçiş sağlayamaz. Ayrıca ilaçların çoğu intravenöz enjeksiyede edildiğinden tümör bölgesinde etkili yoğunluğa ulaşamaz, bundan dolayı ilaçlar terapötik bir rol oynayamaz hale gelir. Şimdiye kadar birçok sentetik ilaç taşıyıcıları kısmen bu kısıtlamanın üstesinden gelebildi ancak uygulama kötü stabilite, bağışıklık aktivasyonu, toksik yan etkileri, vb. gibi birçok kaçınılmaz kusurlar yüzünden sınırlandı (113). Bu sorunun üstesinden gelebilmek için en etkili ve yeni kemoterapötik stratejilerden biri olan biyobozunur, biyoyumlu ve çok fonksiyonlu teranostik nanoparçacıklar kullanılır. Bu tür nanoteranostik sistemler eşzamanlı hastalık görüntüleme/algılama ve ilaç dağıtımına yardımcı olacaktır (115). Shirvalilou vd. (116) 5-iyodo-2-deoksiüridin (IUdR) yüklü manyetik nanopartiküllerin, C6 glioma hücrelerindeki hem *in vitro* hem de *in vivo* yüksek seviyeli özgüllüğünün yanı sıra manyetik rezonans görüntüleme (MRG) için mükemmel bir kontrast geliştirme ajanı olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Şekil 2.9) Kontrol nanopartikül ile yapılan karşılaştırma çalışmalarında tümör birikiminde hedefsizleşme ile dış manyetik alanın hedef alınması arasında derin bir fark olduğunu ve bunun tümör bölgelerinde uzun süreli tutulmasına bağlanabileceği ispatlanmıştır. Bu yenilik, kemoterapi ajanlarının klinik terapötik verimliliğini artırma veya toplam antikanser-ilâç dozunun sistemik toksisiteyi düşürme olasılığını arttırır.



Şekil 2.9: Manyetik ilaç teslimatının şematik gösterimi

Boyama ile doğrulanmıştır, manyetik alan, IUdR ve kontrol nanoparçacıklar MRG kontrast maddesi olarak kullanılmıştır. (116)

Jiang vd. (117) glioma tedavisi için çift hedefli ilaç dağıtım sistemi olarak 2-deoksi-Glikoz (DGlu) NP'yi önermiştir. DGlu-NP'nin glukoz taşıyıcı (GLUT) aracılı transsitoz yoluyla nanopartiküllerin KBB boyunca taşınmasını artırdığı, *in vitro* ortak kültür modeli ve *in vivo* beyin floresanının görüntülenmesi ile GLUT aracılı endositoz yoluyla beyin gliomunun hedeflendiği kanıtlanmıştır. DGlu-NP, RG-2 glioma hücreleri tarafından kaveola ve klattrin aracılı endositoz yoluyla içselleştirilmiş ve kontrol nanopartiküllerden daha yüksek hücre alımı göstermiştir. DGlu-NP/Paklitaksel'in anti-glioblastoma etkinliği Taksol ve NP/Paklitaksel ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde geliştirilmiştir. Ön güvenlik testleri, bir hafta boyunca günde 100 mg/kg kontrol DGlu-NP dozunda intravenöz uygulamadan sonra farelerde hematolojik sistem, karaciğer, böbrek, kalp, akciğer ve dalakta akut toksisite göstermemiştir. Burada 2-deoksi-Glikoz modifiye poli(etilen glikol)-ko-poli (trimetililen karbonat) nanopartiküllerin beyin glioma tedavisi için muhtemel çift hedefli ilaç dağıtım sistemi ajanı olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10: 2-deoksi-D-glikoz ile fonksiyonelleştirilmiş biyobozunur polimer nanopartiküllerin glioma tedavisi için çift hedefli ilaç dağıtım sistemi olarak glikoz taşıyıcı ile tasarımı (117)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARININ HAZIRLANMASI

3.1.1. Gereçler

Kullanılan bütün kimyasallar analitik seviyede ve en yüksek saflıktadır. Gümüş nitrat (AgNO_3) Sigma-Aldrich firmasından, Sodyum sülfür (Na_2S) Alfa-Aesar ve Merck firmalarından temin edildi. Merck firmasından alınan Sodyum hidroksit (NaOH) ve asetik asit (CH_3COOH) pH değerlerin ayarlanması için satın alındı.

3.1.2. Gümüş Sülfürün Sentezi

Tüm reaksiyon Argon (Ar) gazı varlığında gerçekleştirildi. İlk önce 42,5 mg AgNO_3 (0,25 mmol) ve 4,9 mg Na_2S (0,0625 mmol) ayrı iki balonda sırasıyla 75 ml ve 25 ml damıtılmış su (dH_2O) ile (Ar) gazı varlığında çözüldü. Geri soğutucu girişi, kimyasal madde giriş yeri, mekanik karıştırıcı girişi ve Ar gazı girişi bulundurmak üzere dört boyunlu balon joje ile reaksiyon düzeneği kuruldu. Reaksiyon balonuna önce 75 ml AgNO_3 eklendikten sonra 0,0125 mmol 2MPA eklendi. NaOH ve CH_3COOH ile pH: 7,52' ye ayarlandı. Reaksiyon sisteminin tüm girişleri kapatılarak 15 dakika bekletildi. Daha sonrasında 25 ml Na_2S enjeksiyon iğnesiyle, kapatılan kimyasal madde girişi yerinden reaksiyona eklendi. Tüm reaksiyon 35°C 'de ve 500 rpm'de gerçekleşti. Reaksiyon 5 saat boyunca Ar gazı akışıyla sürdü. 5 saat sonunda Ar gazı akışı kesildi, ısıtıcı ve karıştırıcı kapatıldı. Reaksiyon bu şekilde 12-48 saat bekletilmeye bırakıldı. Reaksiyon sonunda oluşan solüsyon, Vivaspin ultrafiltre (3 kDa) ile 4000 rpm' de iki kez yıkandı. Solüsyon $+4^\circ\text{C}$ 'de alüminyum folyo ile kaplanarak saklandı. Sonrasında parçacıkların kararlılığı etilendiamin ile sağlandı.

3.1.3. $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ Karakterizasyon Uygulamaları

Fotoluminesans ölçümleri Edinburgh Spektrofluorometre ile gerçekleştirildi. Ksenon lamba ile 450 nm'de uyarma gerçekleştirildi. Emisyon değeri 840 nm olarak belirlendi. Bant genişlikleri 5.00 ve 5.00 seçildi. Solüsyondan 1:3 (Numune:Su) seyreltme yapılarak ölçüm gerçekleştirildi. Böylelikle standart absorbands sağlandı. Diğer absorbands

ölçümleri ise eksitasyon: 450 nm, emisyon: 840 nm, bant aralığı: 5.00/3.00, 250-800 nm aralığında ve blank (kör) olarak dH₂O kullanılarak ölçüldü. Thermo Nicolet™ iS50 FTIR (fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) ile sentez sonrası ve her kaplama basamağında bağlanan fonksiyonel gruplar tespit edildi.

Parçacıkların boyutlarının analizi için Malvern Zeta Boyut cihazı kullanıldı. Referans olarak su seçilirken kırılma indeksi (1,33) olarak cihazda otomatik olarak bulunan koloidal gümüşler seçeneği seçildi. Ag₂S@2MPA KN'lerin içerisindeki toplam organik madde miktarı Perkin Elmer TGA 8000™ cihazıyla ölçüldü. Bu yöntemde sırasıyla 1 dakika 50°C, 10°C/dk boyunca 50-700°C ısıtma, 1 dakika 700°C, 20°C /dk boyunca 700-900°C ısıtma, 20°C /dk boyunca 900-1100°C ısıtma ve 10°C /dk boyunca 1100-1150°C ısıtma gerçekleştirildi. Sentezlenmiş KN'lerin boyut görüntüsü ve dağılımı analizleri Ultra-High-Resolution Schottky Scanning Electron Microscope SU7000 taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM) ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. DENDRİGRAFT KAPLI GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARININ HAZIRLANMASI

3.2.1. Gereçler

N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) Sigma firmasından ve N-hidroksisüksinimid (NHS) Merck firmasından satın alındı. Dendrigrift poli L-lizin jenerasyon 3 (DGL3) Merck firmasından temin edildi.

3.2.2. Dendrigrift Kaplı Gümüş Sülfür Kuantum Noktalarının Sentezi

Reaksiyon 25°C sıcaklıkta tek boyunlu balonda 300 rpm'de gerçekleşti. Ag₂S@2MPA solüsyonundan %20 oranında numune saklandı. Tek boyunlu balona önce 20 ml MES tampon eklendi daha sonra stabilizasyonu sağlanan Ag₂S@2MPA solüsyonundan 1:10 oranında numune alındı ve reaksiyon balonuna eklendi. Önce 40 mg EDC sonra 50 mg NHS eklendi ve 10 dakika beklendi. Tek bir hamle ile reaksiyon balonuna 100 mg DGL3 eklendi. Bu reaksiyon 16 saat boyunca karışmaya devam etti. Elde edilen solüsyon Vivaspin ultrafiltreden (10 kDA) geçirildi. Solüsyon +4°C'de alüminyum folyo ile kaplanarak saklandı.

3.2.3 Ag₂S@2MPA/DGL₃ Karakterizasyon Uygulamaları

Karakterizasyon uygulamaları için ilk önce fotoluminesans ölçümleri gerçekleştirildi. Ksenon lamba ile 450 nm’de uyarma gerçekleştirildi. Emisyon değeri 840 nm olarak belirlendi. Bant genişlikleri 5.00 ve 5.00 seçildi. Ag₂S@2MPA/DGL₃ solüsyonundan alınan numune Ag₂S@2MPA solüsyonun ile aynı yoğunluğa getirildi. Böylelikle standart absorbans değeri korunmaya çalışıldı. Parçacıkların boyutlarının analizi için Malvern Zeta Boyut cihazı kullanıldı. Referans olarak su seçilirken kırılma indeksi 1,33 olarak belirlendi.

3.3. DENDRİGRAFT KAPLI GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARININ GLİKOZLA ETİKETLENMESİ

3.3.1. Gereçler

Polietilen glikol diakrilat (PEGDA, MA: 575) ve Glikoz monohidrat (Glu) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

3.3.2. Dendrigrift Kaplı Gümüş Sülfür Kuantum Noktaları ile PEG-Glu Sentezi

Tek boyunlu balona toplam hacim 30 ml olacak şekilde dH₂O eklendi. Sonrasında 20,6 µg (0,02 mmol) PEGDA ve 9,4 mg (0,021 mmol) Glu eklendi. Karışmaya devam eden balona 90 mg EDC ve 42 mg NHS eklendi. NaOH ve CH₃COOH ile pH:7’ye ayarlandı. Reaksiyon 25°C’de 1-2 saat boyunca 300 rpm’de karıştı. Vt=30 ml’den 20 ml (%15) ve 10 ml (%5) solüsyonlar ayrıldı. Yeni iki reaksiyon balonuna geçilip her solüsyon için Ag₂S@2MPA/EDA/DGL₃ reaksiyon solüsyonunun hacimsel olarak yarısı eklendi. Yine aynı şekilde pH:7’ye ayarlandı. Aynı koşullarda 16 saat boyunca reaksiyon devam etti. Elde edilen solüsyon Vivaspin ultrafiltreden (30 kDa) geçirildi. Solüsyon +4°C’de alüminyum folyo ile kaplanarak saklandı.

3.3.3. Ag₂S@2MPA/DGL₃-Glu Karakterizasyon Uygulamaları

Karakterizasyon uygulamaları Ksenon lamba ile 450 nm’de gerçekleştirildi. Emisyon değeri 840 nm olarak belirlendi. Bant genişlikleri 5.00 ve 5.00 seçildi. Ag₂S@2MPA/DGL₃-Glu solüsyonundan alınan numune Ag₂S@2MPA/DL₃ solüsyonun ile aynı yoğunluğa getirildi. Böylelikle standart absorbans değeri korunmaya çalışıldı.

Malvern Zeta Boyut cihazı ile boyut analizi sırasında referans olarak su kullanıldı ve kırılma indeksi 1,33 olarak seçildi.

3.4. GLİKOZ ETİKETLİ DENDRİGRAFT KAPLI GÜMÜŞ SÜLFÜR KUANTUM NOKTALARA DOKSORUBİSİN YÜKLENMESİ

3.4.1. Gereçler

Doksorubisin ilacı KOÇAK FARMA firmasından (2 mg/ml) temin edildi.

3.4.2. Glikoz Etiketli Dendrigrift Kaplı Gümüş Sülfür Kuantum Noktalarına Yüklenecek Doksorubisin İlaç Oranının Belirlenmesi ve İlacın Parçacıklara Yüklenmesi

Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu yapısı 2,5 mg/ml yoğunluğuna getirildi ve bu yöntem için 2,5 mg kullanıldı. Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu yapısına 150 µg doksorubisin ilacı yüklendi. Yükleme işlemi PBS tamponda gerçekleştirildi. Bu yöntemde 1 ml parçacık için 1 ml iki kat yoğunluklu (x2) PBS tampon balon joje içerisinde 300 rpm, 25°C’de ve 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya bırakıldı. Böylelikle ilacın parçacığa yüklenmesi PBS tamponunda gerçekleştirildi.

İlaç yüklenmesi ardından Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN’lere hapsolmuş ilaç miktarı belirlemek için diyaliz membranı kullanıldı. Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok diyaliz membran içerisinde, membran da 200 ml PBS solüsyonu içerisinde 300 rpm’de, oda sıcaklığında karıştırılmaya bırakıldı. Bu düzenek ışık görmemesi içinde alüminyum ile kaplandı. Bu solüsyondan yüklemeye katılmaya ilaç konsantrasyonu belirlemek için 12. saatte 2 ml numune alındı ve absorbans değeri ölçülerek Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu KN’lere yüklenen ilaç miktarı hesaplandı.

3.4.3 Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok Karakterizasyon Uygulamaları

Fotoluminesans ölçümleri 450 nm uyarılma ve 585 nm ışınım dalga boyunda bant genişlikleri 5.00/5.00 seçilerek gerçekleştirildi.

3.5. Ag₂S@2MPA, Ag₂S@2MPA/DGL3, Ag₂S@2MPA/DGL3-GLU VE Ag₂S@2MPA/DGL3-GLU/DOK YAPILARININ SİTOTOKSİSİTE UYGULAMALARI

U87MG ve LN18 hücreleri, çoğaltıldıktan sonra her biri 2'şer tane 96-kuyulu plakalara her bir kuyucuğa 10.000 hücre/kuyu yoğunlukta olacak şekilde %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin ile desteklenmiş yüksek glukozlu (4,5 g/L) DMEM besiyeriyle ekildi. 24 saat sonra, her bir hücre için 96-kuyulu plakalardan, ortamı düşük glukozlu besiyeriyle (1 g/L) değiştirildi. Daha sonra, her bir plakadaki hücreler üzerinde farklı konsantrasyonlarda ilk grup üç kısma ayrılıp (Ag₂S@2MPA, Ag₂S@2MPA/DGL3, Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu) KN'ler uygulandı. Her bir plaka için ilk sıradaki hücreler, kontrol grup KN'ler ile muamele edildi. İkinci sıradaki kuyucuklarda bulunan hücreler ise 3,12 µg/ml ve devamındaki sıralarda bulunan hücrelere de sırasıyla 2 katı konsantrasyonda olacak şekilde parçacıklar ekledi. Bu şekilde her bir 96-kuyulu plakanın son sırasındaki hücreler üzerine 200 µg/ml Ag₂S@2MPA KN'ler uygulandı. Bu toksisite çalışması parçacıkların çekirdek Ag₂S@2MPA ağırlığına göre yapılmıştır.

KN'lere ve ilaç yüklü KN'lere ait hücre canlılığı belirlenmesi için ikinci grup tasarlandı ve bu hücrelere de parçacıklar muamele edildi. Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'leri 1 mg/ml konsantrasyonunda yaklaşık 40 µg/ml Dok ilacı bulunmaktadır. İlaç konsantrasyonu için 400 ng/ml'dan başlanarak ½ oranında 7 seri seyreltme yapıldı. İlaç bulunmayan parçacıklar içinde ilaç konsantrasyonu başına düşen KN'lerin konsantrasyonu (10 µg/ml) baz alınarak hesaplama yapıldı. 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübe edildi. 48 saat sonra parçacıkların toksisitesinin analiz edilmesi için MTT testi yapıldı. Bunun için, sarı renkli 5 mg/ml konsantrasyona sahip 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) reaktifi kullanıldı. 10 µl MTT reaktifi hücreler üzerinde uygulandıktan sonra 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı ve 3-4 saat sonunda besiyeri aspire edildi. Hücreler PBS ile yıkandı ardından hücrelerdeki formazan kristallerinin çözülmesi için 100 µl DMSO eklenip 10 dakika boyunca karanlıkta bekletildi. KN'lerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi 570 nm'de Thermo Scientific MultiskanGo cihazıyla ölçüldü.

Doksorubisinin toksisitesinin belirlenmesi için üçüncü grup tasarlandı. İlk önce LN18 hücreleri çoğaltıldı sonra 96-kuyulu plakaya 10.000 hücre/kuyu yoğunlukta olacak şekilde %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin ile desteklenmiş yüksek glukozlu DMEM

besiyeriyle ekildi. Ertesi gün, hücrelere Dok (2 mg/ml) ile muamele edildi. Dok ilacı sırasıyla 320 ng/ml, 160 ng/ml, 80 ng/ml, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml ve 5 ng/ml olacak şekilde hücreler üzerinde uygulandı. 96-kuyulu plakanın ilk sırasındaki hücreler kontrol amaçlı bırakıldı. İlaçlar uygulandıktan sonra hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li inkübatörde 48 saat boyunca inkübe edildi. 48 saat sonra ilaçların hücreler üzerindeki toksik etkisinin analiz edilmesi için MTT testi yapıldı. Bunun için, sarı renkli 5 mg/ml MTT reaktifi kullanıldı ve 10 µl MTT reaktifi hücreler üzerinde uygulandı. Hücreler %5 CO₂’li inkübatörde 37°C’de inkübasyona bırakıldı ve 3-4 saat sonunda besiyeri aspire edildi. Sonrasında hücreler PBS ile yıkandı. Ardından, hücrelerdeki formazan kristallerinin çözülmesi için 100 µl DMSO eklenip 10 dakika boyunca karanlıkta çalkalandı. İlacın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi 570 nm’de Thermo Scientific MultiskanGo cihazıyla ölçüldü.

3.6. Ag₂S@2MPA/DGL3/DOK, Ag₂S@2MPA/DGL3-GLU/DOK, Ag₂S@2MPA/DGL3 ve Ag₂S@2MPA/DGL3-GLU YAPILARININ HÜCRE İÇİ ALINIM ANALİZ UYGULAMALARI

MCF7, U87 ve LN18 hücre hatları çoğaltıldıktan sonra 3 tane 24-kuyulu plakaya 50.000 hücre/kuyu yoğunlukta olacak şekilde %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin ile desteklenmiş yüksek glukozlu DMEM besiyeriyle ekildi. Ertesi gün, hücreler yapıştıktan sonra besiyeri aspire edilip düşük glukozlu (1 g/L) %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin ile desteklenmiş DMEM besiyeriyle değiştirildi. Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN’leri 400 ng/ml Dok içeren konsantrasyonda hücrelere verildi. 24 saat sonunda hücrelerin besiyerleri aspire edildi. PBS (1 ml) ile yıkama yapılarak ardından 500 µl formalin (%10) ile 10-15 dakika boyunca fikse edildi. Tekrar PBS (1 ml) yıkaması yapıldı. PBS (1 ml) solüsyonunda hücreler Leica DMI8 floresan mikroskobu ile gözlemlendi.

4. BULGULAR

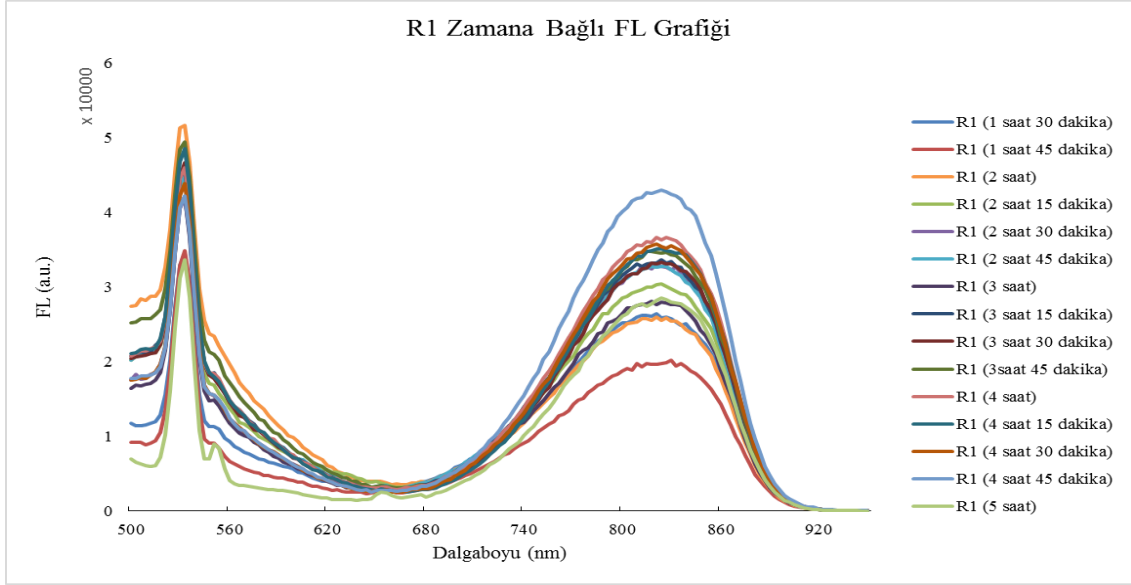
4.1. Ag₂S@2MPA KUANTUM NOKTALARI

Gümüş sülfür kuantum parçacıkların sentezi sırasında her 3 saatte bir 1 ml örnek alınarak fotoluminesans ölçümleri gerçekleştirildi. Sıcaklık ilk başta 25°C'den başlanıp 15°C, 25°C, 35-50°C, 40°C'de tekrarlı reaksiyonlar kuruldu. Sıcaklık artışına bağlı olarak KN'lerin sentez süreleri kısalmaktadır. Ancak KN'lerin 45°C'de maksimum FL değerini hızlı bir şekilde geçerek keskin bir düşüş yapmaktadır. Yapılan sıcaklık-süre çalışmalarında optimum değerin 35°C ve 5 saat olduğu gözlemlendi.

Tablo 4.1: Ag₂S@2MPA kuantum noktalarının sentez optimizasyonu

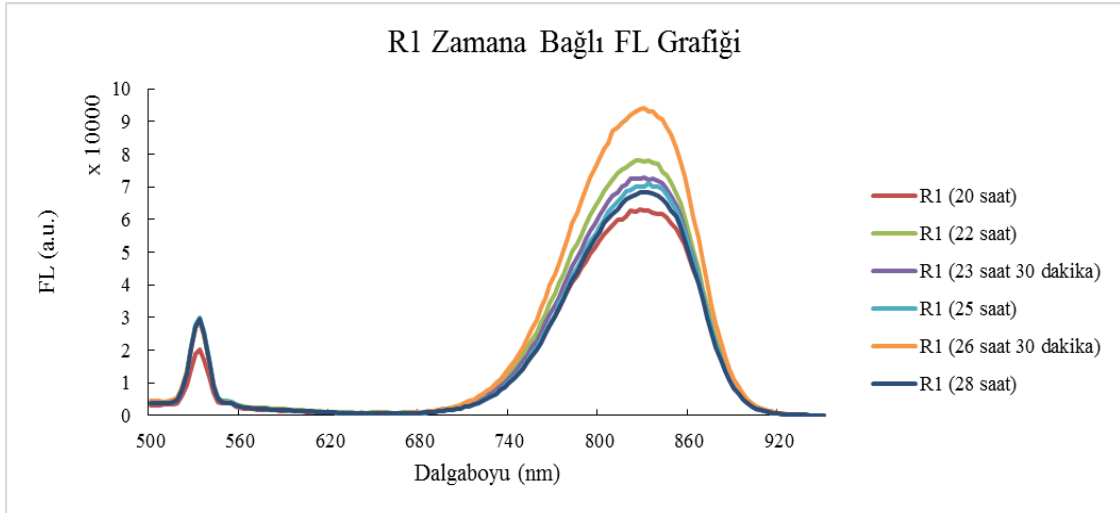
Reaksiyon Numarası	Sıcaklık (°C)	Reaksiyon Süresi (Saat/dakika)
R1	35	28 saat
R2	15	29 saat
R3	25	7 saat 30 dakika
R4	35-50	9 saat
R5	40	6 saat
R6	35	5 saat

R1 reaksiyonu için sentez süresi uzun tutulup her 15 dakika bir reaksiyon balonundan örnek alınarak ışıması kontrol edildi. Bu 15 dakikalık periyotlarda ışıma değerlerinin harmonik artış ve azalışlar yaptığı gözlemlendi. Bu artış ve azalışlar 28 saat boyunca gözlemlendi.



Şekil 4.1: R1 reaksiyonun 5 saat boyunca 15 dakika aralıklı FL grafiği

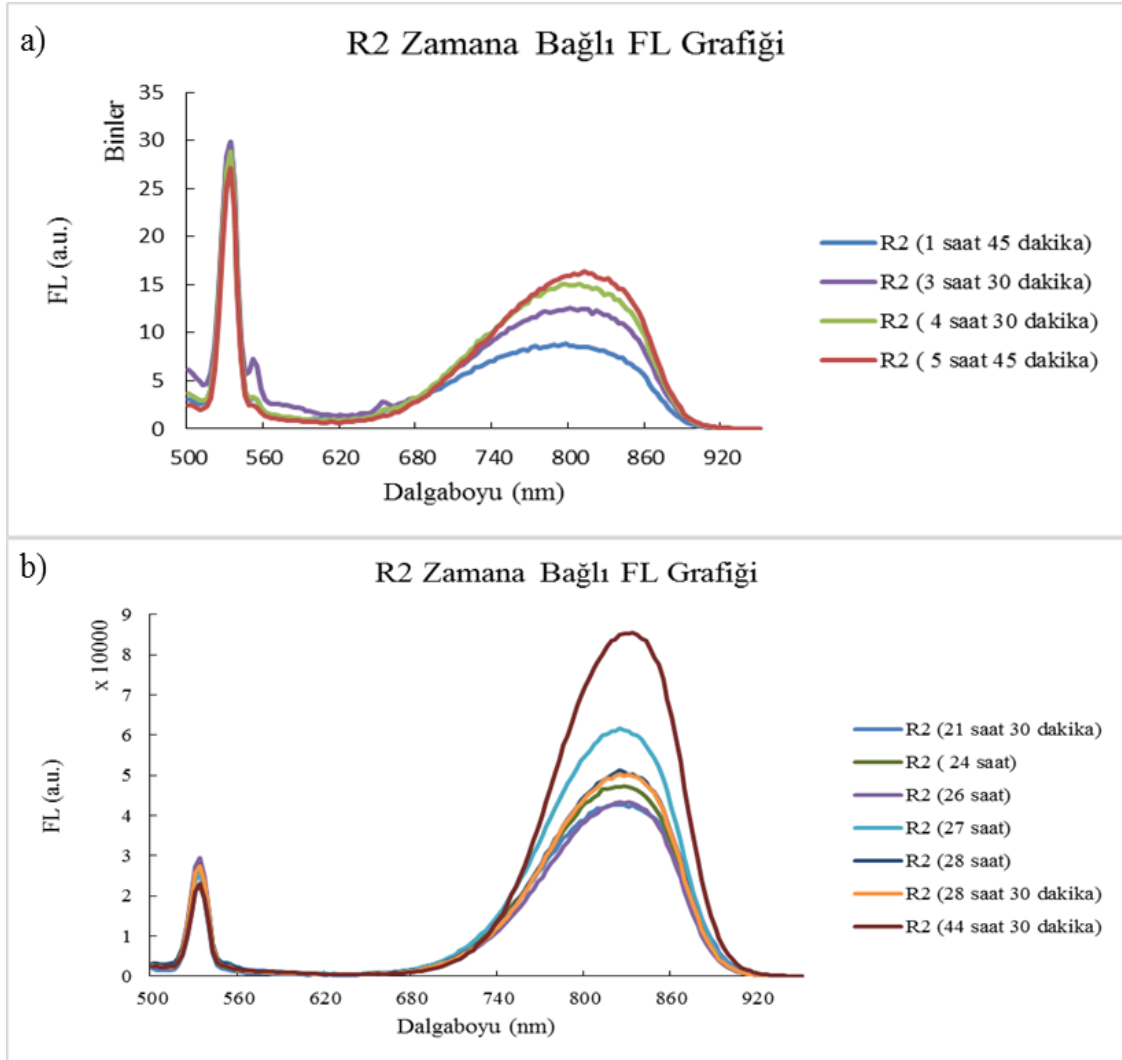
R1 reaksiyonu 4 saat 45 dakika'da en yüksek değerini verip 5. saatte düşüşe geçti. Bu yüzden $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ KN'lerin sentezi için reaksiyon süresi 5 saat olarak belirlendi. Ancak reaksiyon 28 saat boyunca yine de devam etti ve 20. saatten sonra ışıma değerlerinin 5. saatteki değerden daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.2: R1 reaksiyonun 20. saatten sonra 8 saat süreli FL grafiği

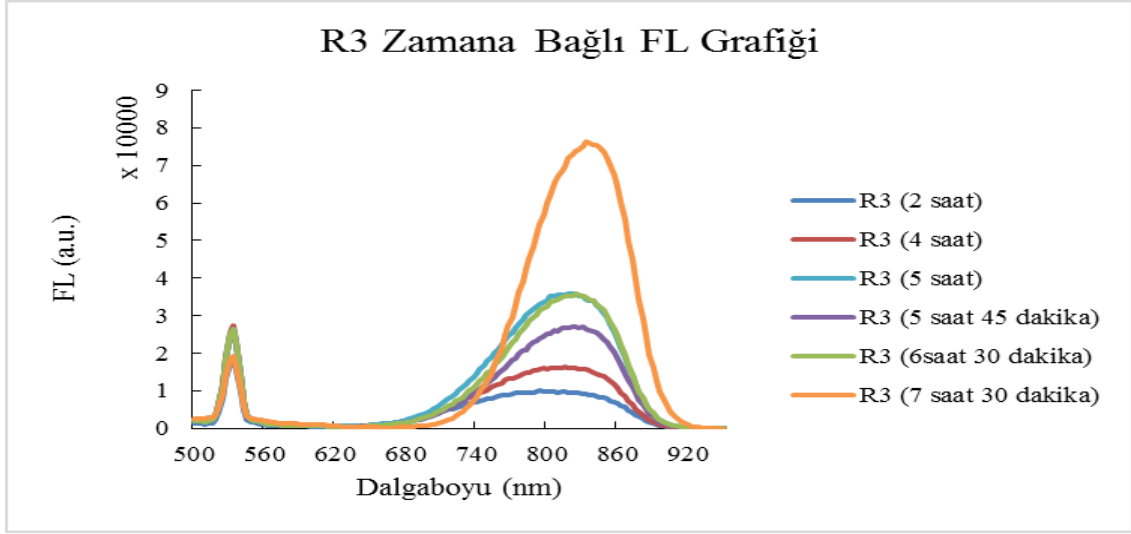
$\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ KN'lerin sentez reaksiyonu sıcaklığa bağlı olup olmadığını araştırmak için R2, R3, R4 ve R5 reaksiyonları tasarlandı. R2 ışıma miktarı yükselişi çok

yavaş seyretmekteydi. Bundan dolayı, 15°C'nin bu sentez reaksiyonu için çok düşük sıcaklık olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.2)



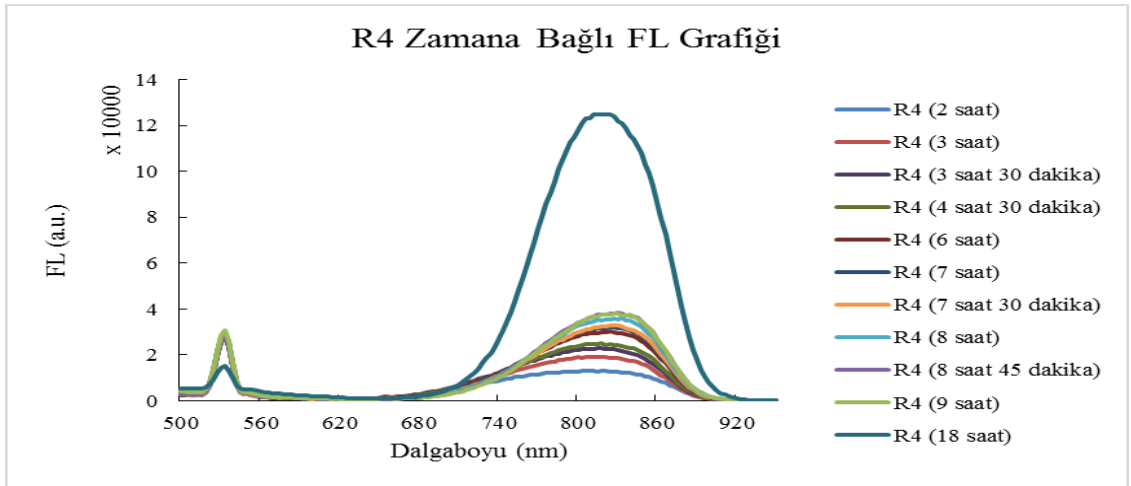
Şekil 4.3: R2 reaksiyonun a) ilk 6 saat ve b) 21-44 saat süre aralıklı FL grafiği

R3 reaksiyonu R2 reaksiyona göre daha hızlı bir yükseliş verir (Şekil 4.3). Ancak R4 ile karşılaştırıldığında FL artış süresi daha uzun sürmektedir. Bu yüzden reaksiyon başlangıç sıcaklığının 35°C olarak belirlemesi uygun görüldü (Şekil 4.4).



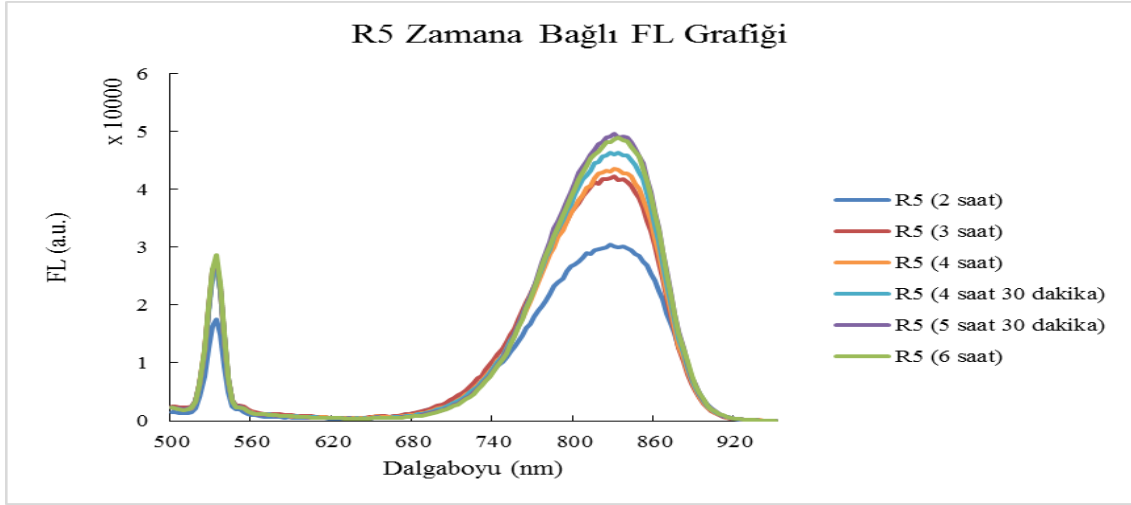
Şekil 4.4: R3 rekasiyonunun 2 saat ve 7 saat 30 dakika süre aralıklı FL grafiği

R4 reaksiyonunun başlangıç sıcaklığı 35°C olup reaksiyon süresi boyunca sıcaklık belirli aralıkta artırıldı. İlk önce 7.saatte sıcaklık 40°C'ye sonrasında 8. saatte 50°C'ye artırılıp son olarak 35°C'ye geri dönüş sağlandı. Işıma miktarı önceki reaksiyonlara göre kısa sürede yükseldi (Şekil 4.5)



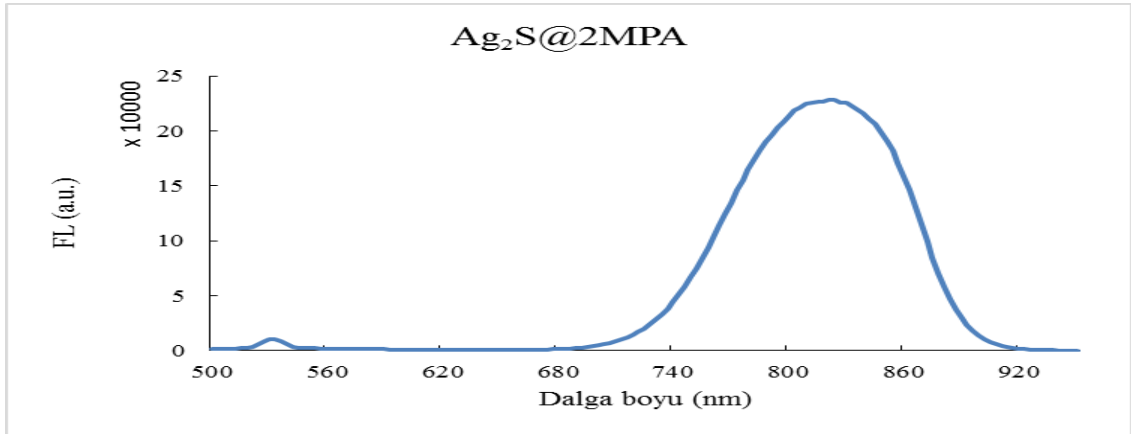
Şekil 4.5: R4 rekasiyonunun 2-18 saat süre aralıklı FL grafiği

Sıcaklık yükselmesiyle seyreden yüksek FL ışıması başlangıç sıcaklığının 40°C'ye yükseltilip yeni bir reaksiyon tasarlamayı gerektirdi. Bu reaksiyon (R5) için maksimum FL gösteren süre 6 saat olarak belirlendi. Işıma miktarı yine aynı seviyede seyretti (Şekil 4.6)



Şekil 4.6: R5 reaksiyonun 2-6 saat süre aralıklı FL grafiği

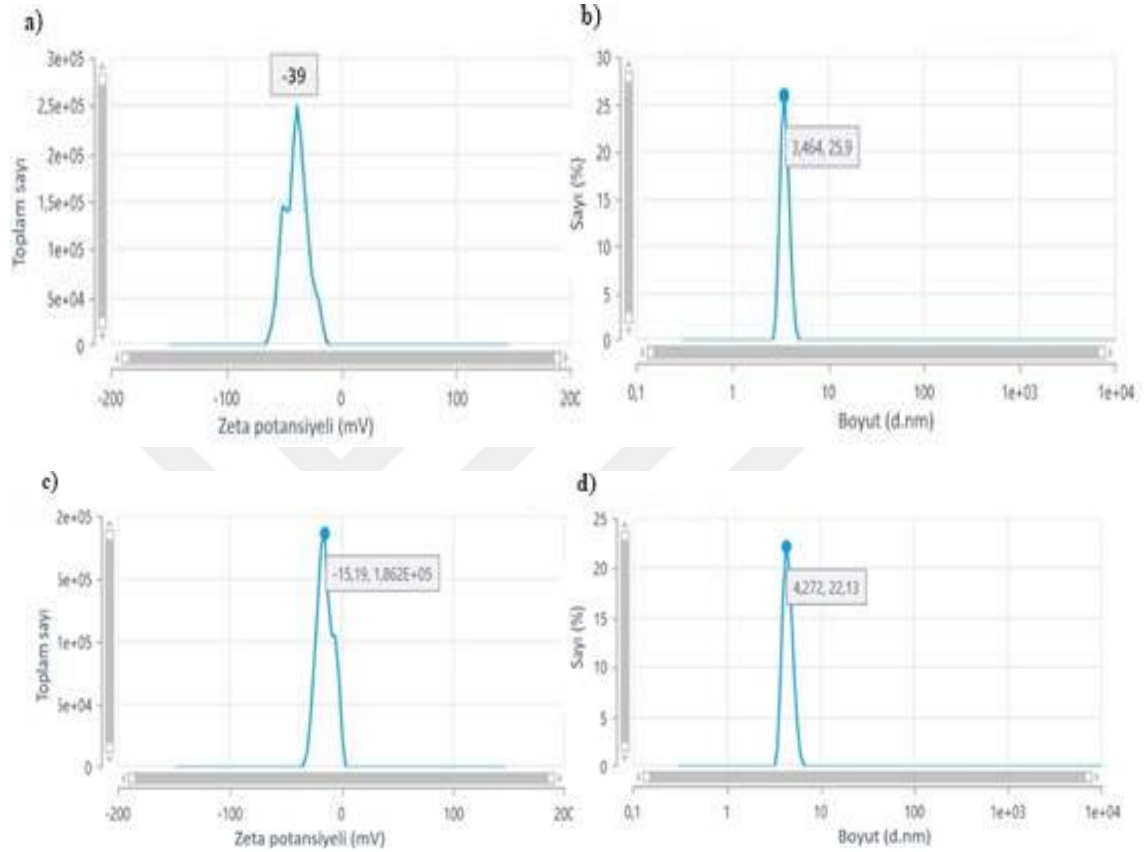
R6 reaksiyonun başlangıç sıcaklığı 35°C olup 2MPa eklendiğinde sıcaklık +2°C yükseltildi. Böylelikle diğer tasarlanan reaksiyonlara göre en yüksek FL değeri elde edildi (Şekil 4.7) Tüm tekrarlı reaksiyonlar bu formülasyonla kuruldu.



Şekil 4.7: Ag₂S@2MPA kuantum noktaları için tasarlanan R6 reaksiyonu sonu FL değer grafiği

Malvern Zetasizer Ultra ile incelemeler sonucuna göre Ag₂S@2MPA KN'leri için parçacık boyutu 3,5 nm ve zeta potansiyeli -39,2 mV olarak elde edildi. Ayrıca Ag₂S@2MPA KN'lerin kristal yapıları yüzeyindeki Ag (I) atomları reaksiyona eğimli olması sebebi ile KN'lerde çekirdeklenme devam ettiği ve boyutun arttığı gözlemlendi.

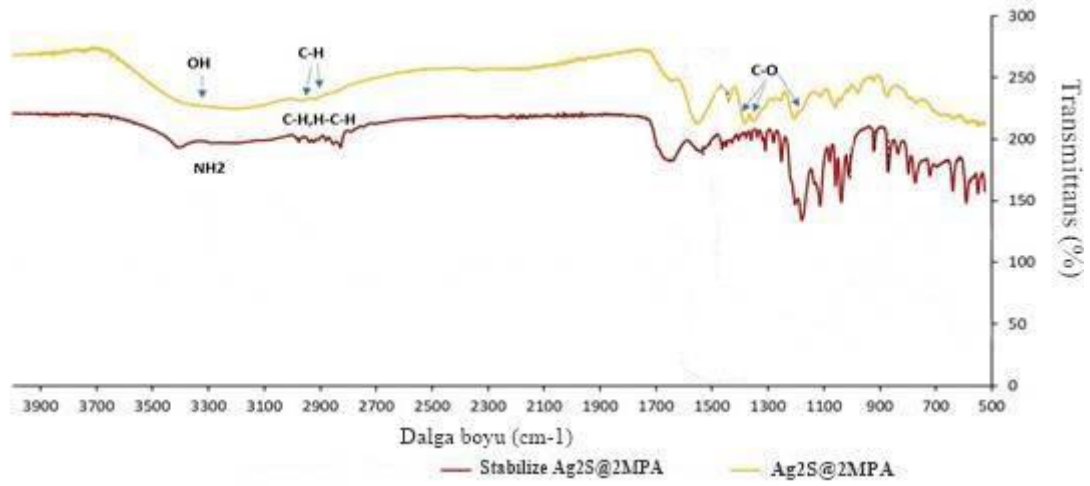
Bu da Ag₂S@2MPA KN'lerin kararlı olmadığını göstermektedir. Stabilizasyon sonrası Ag₂S@2MPA KN'lerin boyutu biraz artarak 4,3 nm olduğu görüldü. Ancak zeta potansiyel -15,2 mV olarak ölçüldü.



Şekil 4.8: Ag₂S@2MPA kuantum parçacıkların a) boyut ve b) zeta potansiyel ölçüm sonuçlarını, stabilizasyonu sağlanan Ag₂S@2MPA kuantum parçacıkların a) boyut ve b) zeta potansiyel ölçüm sonuçlarını

Parçacıkların katı hallerinden fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile spektralleri elde edildi. Kızılötesi spektrumunda 3360-1200 cm⁻¹ arasını kapsayan bölge fonksiyonel grupların bölgesini ifade eder. Ag₂S@2MPA KN'ler için en belirgin 3500 cm⁻¹'de görülen geniş pik, yapıda bir alkol grubu olduğunun göstergesidir. Yapıya ait C-H esnemeleri 2600-2900 cm⁻¹ arasında görülebilir. Karbonil grubunun varlığı 1680 cm⁻¹'de görülen pikle tespit edilebilir. C-O titreşimleri ise 1390 cm⁻¹ civarında varlığını gösterir. Sentezin ikinci aşamasında kararlılığı sağlanan Ag₂S@2MPA KN'ler amin grubuna sahiptir. Primer bir amin olarak iki tane nitrojen atomuna sahiptir.

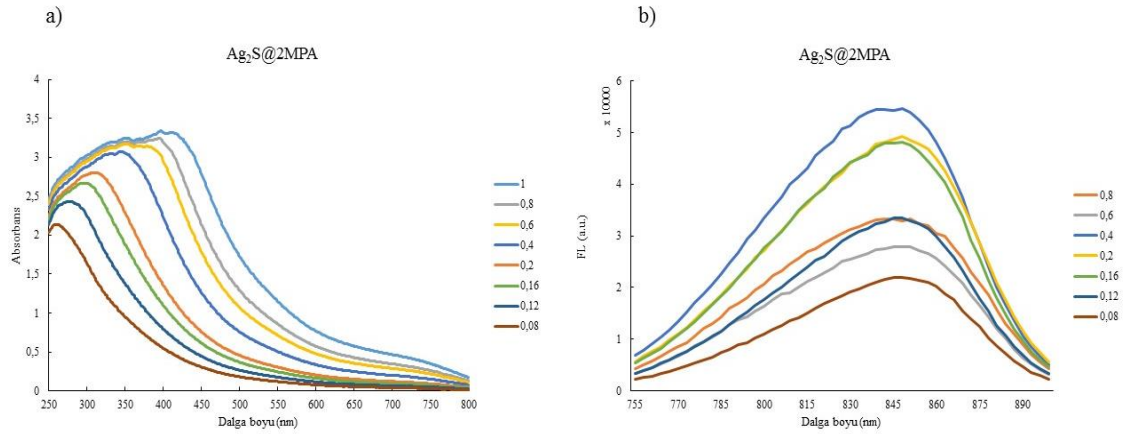
Amin varlığını 33412 cm^{-1} ve 3333 cm^{-1} 'de gözlenen pikler gösterir. Ayrıca $2950\text{--}2785\text{ cm}^{-1}$ -CH_2 gruplarının eğilme titreşimleri yaptığı yerlerdir. Buna birlikte, 1618 cm^{-1} 'de görülen güçlü pik stabilizasyonu sağlayan bileşiğin -NH_2 titreşimleri olarak yorumlanabilir. Muhtemelen H-O-H 'dan gelen bir esnemedir. Buna ek olarak, 1540 cm^{-1} N-C-C-N 'den 1462 cm^{-1} ise -CH_2 'den gelen esnemelerdir. C-H bükülmelerini $1374\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ 'de görülebilir. Primer aminin başlıca C-N esnemelerini sırasıyla 1096 cm^{-1} , 1052 cm^{-1} , 1031 cm^{-1} 'lerde görülür. CH_2 ve NH_2 'den gelen düzlem içi bükülme titreşimleri $877\text{--}870\text{ cm}^{-1}$ 'lerde görülür.



Şekil 4.9: $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ ve stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ kuantum noktalarının kızılötesi spektralleri

4.1.1. $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ Kuantum Noktalarının Konsantrasyona Bağlı Işımasının Optimize Edilmesi

Sentezlenen numunelerden ışınması ve yoğunluğu en yüksek olan numune stok çözelti olarak seçilerek değişik konsantrasyonları hazırlandı. Numunenin kendi konsantrasyonu 1 kabul edilerek 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,16; 0,12; 0,08 oranlarında seyreltme yapıldı. Bu konsantrasyonların FL ölçümleri elde edildi ve en yüksek emisyon dalga boyunun 0,4 ve 0,16 aralığında olduğu gözlemlendi (Şekil 4.10). Elde edilen sonuçlar diğer stokların ölçümü için ölçek (referans) olarak kullanılmış olup Beer Lambert yasasına ($\text{Absorbans} = \epsilon \cdot l \cdot c$) dayanarak her bir numunenin absorbans değerlerinden konsantrasyon tayini yapıldı. Konsantrasyona göre lineer değişkenlik gösteren dalga boyunda (470 nm 'de) her bir numunenin konsantrasyonu eşitlendi.



Şekil 4.10: Stok numunenin değişik konsantrasyonlarının a) absorbands ve b) FL grafiği

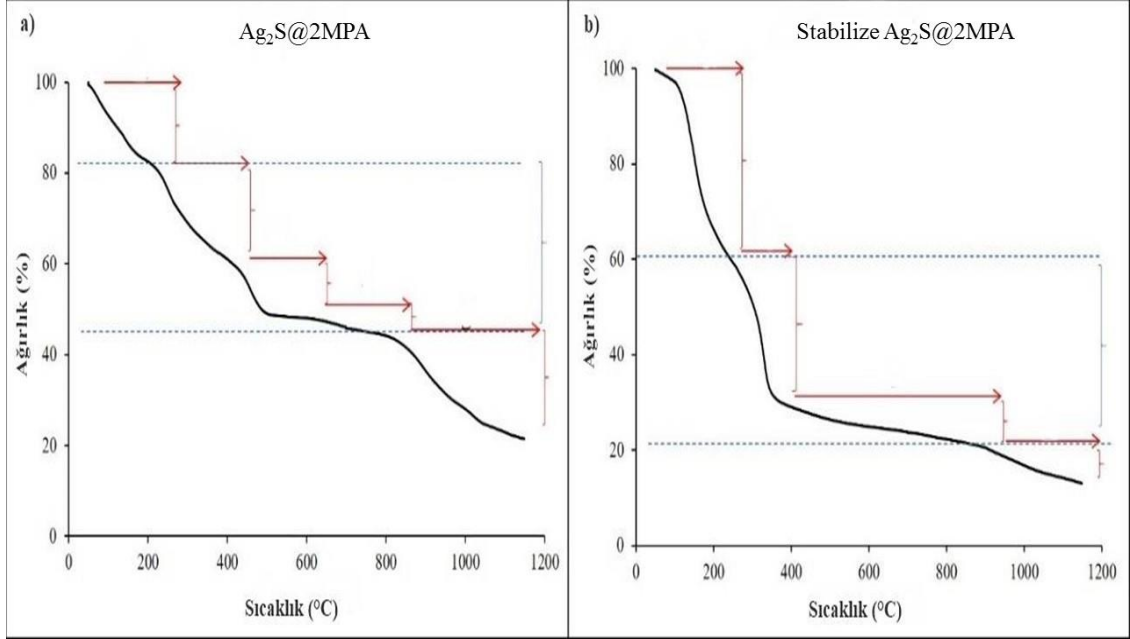
Ag₂S@2MPA KN'lerin 0,4 konsantrasyonunda en iyi ışımaya değerlerini verdiği gözlemlendi. Ag₂S@2MPA KN'leri sentez basamağında reaksiyon balonundan alınan tüm numunlere 1:3 seyreltme yapılarak ölçüldü. Bu da yaklaşık 0,4 konsantrasyonuna denk gelmektedir.

4.1.2. Ag₂S@2MPA Kuantum Noktalarının Termogravimetrik Analizi

Ölçüm için 19,6 mg Ag₂S@2MPA kullanılmıştır. İlk 200°C kadar olan kısımda Ag₂S@2MPA ağırlıklarının yaklaşık %18'ini kaybetti. Bu 200°C'ye kadar olan ilk dilimde ağırlık kaybının nem ve KN'lerin yüzeye emilen diğer uçucu kimyasallar olduğu düşünülmektedir. TGA analiz sonucuna göre Ag₂S@2MPA KN'lerin organik yüzdesi %45 olarak elde edildi. Bu sonuçlar ile DLS'den elde edilen sonuçlar yüzey modifikasyonu ve stabilizasyonda kullanılan EDA molekülünün Ag moleküllerine bağlandığını; böylece KN'lerin stabilizasyonu sağladığı kanıtlamaktadır.

Ag₂S@2MPA sırasıyla 300°C civarında ağırlığının %40'ını, 450°C civarında ağırlığının %55'ini ve 900°C civarında ağırlığının %80'ini kaybetmiştir (Şekil 4.11). Son olarak ise 1150°C ağırlığının yaklaşık tamamını kaybederek saf gümüş parçacıklar ortamda gözlemlendi. Ag₂S@2MPA KN'lerin yüzey organik polimerlerinin çoğu 200°C-450°C aralığında yakılıp 800°C'ye gelindiğinde Ag₂S kristal yapı bozulmaya başlamıştı. Ancak stabilizasyonu sağlanan kuantum parçacıklarının yüzey organik polimerlerinin çoğu 200°C-400°C aralığında yakılıp kaybolmuş olsa da bu parçacıklar

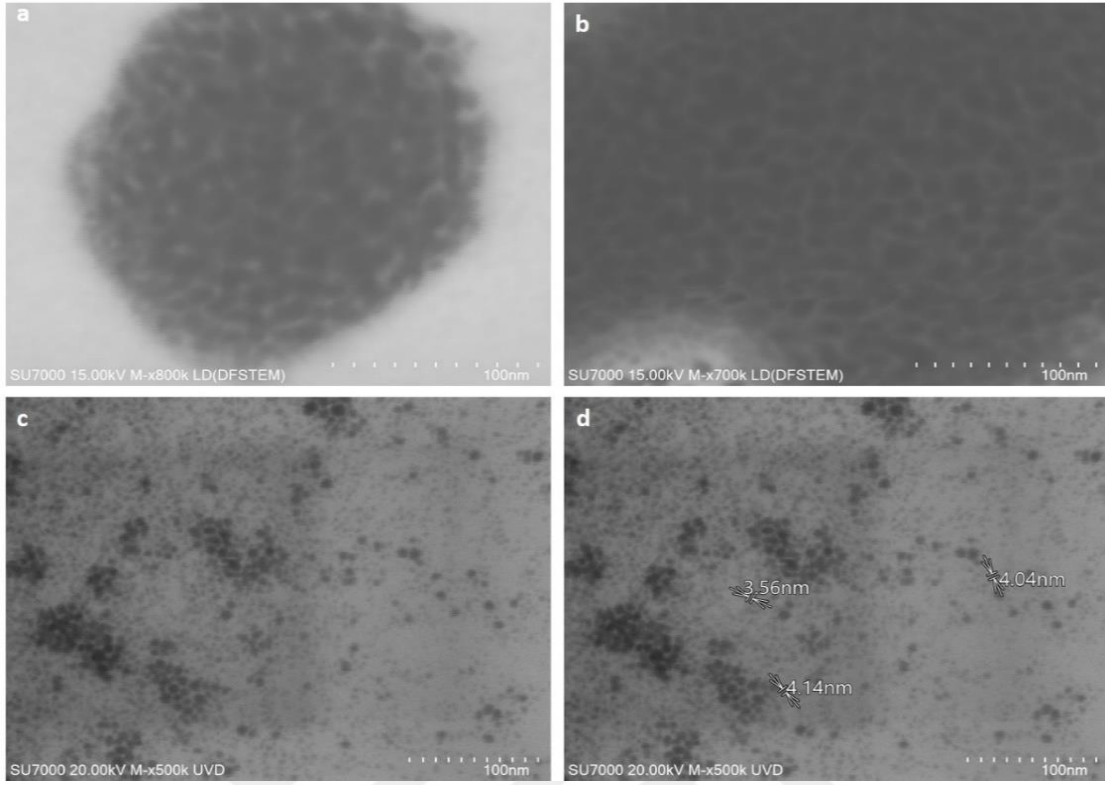
yüksek stabilizasyon gösterip 950°C'ye gelindiğinde kristal yapısında çok az miktarda ağırlık kaybına neden oldu. Kaybedilen %18'lik kısmın nem ve yüzeyde emilen diğer uçucu kimyasallar olduğu düşünülmektedir. Ağırlık kaybı üç farklı tepe noktasında belirgin bir şekilde gözlemlendi.



Şekil 4.11: a) Ag₂S@2MPA ve b) stabilizasyonu sağlanan Ag₂S@2MPA KN'lerin 50-1150°C arasındaki termogravimetrik analiz grafiği

4.1.3. Ag₂S@2MPA Kuantum Noktalarının Taramalı Transmisyon Elektron Mikroskobu ile Görüntüleme Analizi

Ag₂S@2MPA ve stabilizasyonu sağlanan Ag₂S@2MPA KN'lerin TEM görüntüleri küresel yapıdadır. Bu parçacıklar 2-6 nm arasında değişen boyutlara sahip kristallerdir. STEM sonuçlar Ag₂S@2MPA KN'lerin dağılımının iyi olmadığı ve topaklanmaya eğimli olduklarını göstermektedir. Stabilizasyonla bu sorun giderildi. Stabilizasyonu sağlanan Ag₂S@2MPA KN'leri küçük boyutlarının yanı sıra daha iyi dağılıma da sahiptir.

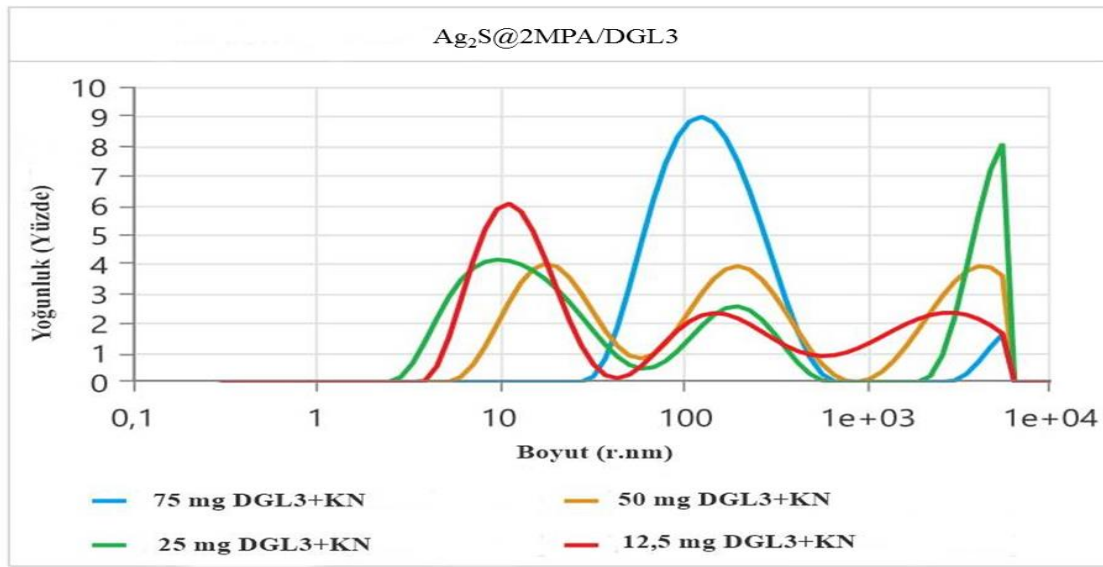


Şekil 4.12: a ve b) $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$, c ve d) stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ KN'lerin STEM görüntüleri

4.2. $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}$ KUANTUM NOKTALARI

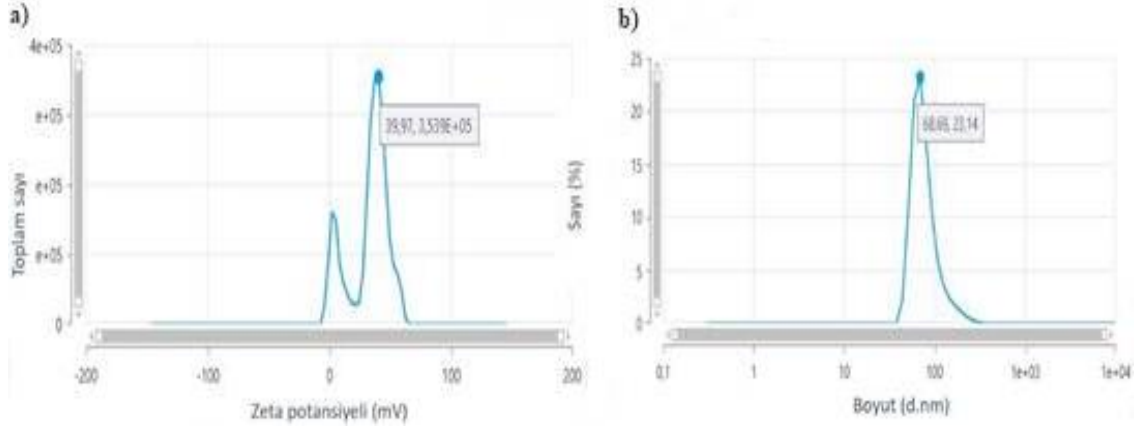
Kuantum noktalarının dendrigraft ile kaplanması için 8 mg stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ ile sırasıyla 100 mg, 75 mg, 50 mg, 25 mg ve 12,5 mg DGL3 içeren reaksiyonlar kurularak yoğunluk grafikleri Malvern Zetasizer Ultra cihazı incelendi (Şekil 4.13). KN'ler içersinde 50 mg DGL3 içeren $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ 100 kDa ve 30 kDa Vivaspın ultrafiltre tüplerden geçirildiğinde filtrasyon tüpünün alt fazında bir takım parçacık (renklenme) gözlemlendi. Bu alt fazın zeta potansiyeli ve boyutu ölçüldüğünde, kısmi kaplanan KN'lerin filtrasyon sisteminden geçtiği görüldü. Zeta potansiyeli +22, boyutu ise 4,5 nm civarında ölçüldü. Detaylı inceleme sonucunda 50 mg, 25 mg ve 12,5 mg DGL3 içeren parçacıkların yoğunluk grafiklerinde 3 tepe noktası görüldü. Bu sonuç ortamda hala tam olarak DGL3 ile kaplanmayan stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ parçacıklarının bulunduğunu göstermektedir. Tam olarak kaplanmayan stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ KN'ler tam kaplanan parçacıklarda bulunan DGL3 ile birleşerek topaklanma oluşturdu. Diğer yandan 75 mg DGL3 içeren parçacıkların yoğunluk grafiklerinde 2 tepe görülmektedir. İlk tepe kesin ve yoğun iken ikinci tepe ise çok küçüktür. Stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ KN'ler

büyük oranda DGL3 ile kaplanmışsa da kaplanmayan KN'ler yine de topaklanma oluşturmaktadır. Bu nedenle parçacığa DGL3'ün yeterli gelmediğini düşündüğü için deneye 100 mg DGL3 ile devam edilmesine ve ayrıca filtrasyon için 10 kDa filtre tüpleri kullanılmasına karar verildi. Ortamda fazla miktarda bulunan DGL3 çalışma için sorun teşkil etmemekte ancak eksikliği stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ KN'lerin hepsinin DGL3 ile kaplanmamasına, kaplanmayan bu parçacıkların $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}$ KN'lerin bağlanmasına ve bu nedenle topaklanma oluşturmaya sebep olmaktadır.



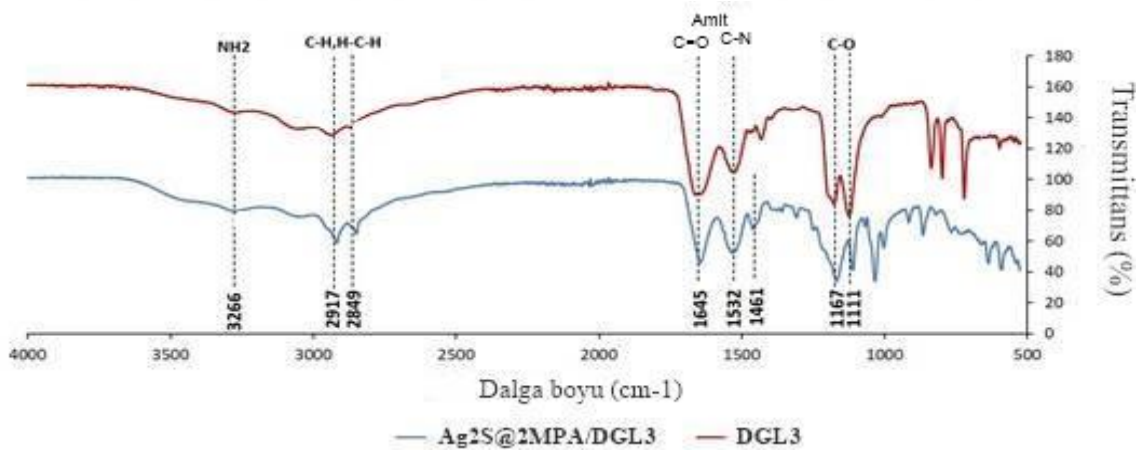
Şekil 4.13: $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ kuantum noktalarına 75 mg, 50 mg, 25 mg ve 12,5 mg DGL3 yüklenmiş yapılarının hidrodinamik yoğunluk boyut grafiği

Stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$ KN'lerin DGL3 ile kaplanması sonrası KN'lerin boyutu kullanılmakta olan DGL3 miktarına bağlı olarak 35 nm ile 68 nm olarak belirlendi. Bilindiği üzere DGL3 parçacıklarının boyutu 7 nm civarındadır. Dolayısıyla KN'lerin DGL3 ile kaplanma sonrası boyutlarının kayda değer bir artış göstereceği beklenilmektedir. $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}$ KN'lerin zeta potansiyeli +39 mV olarak ölçüldü. Bu sonuçlar $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}$ KN'lerin kararlı olduğunu göstermektedir.



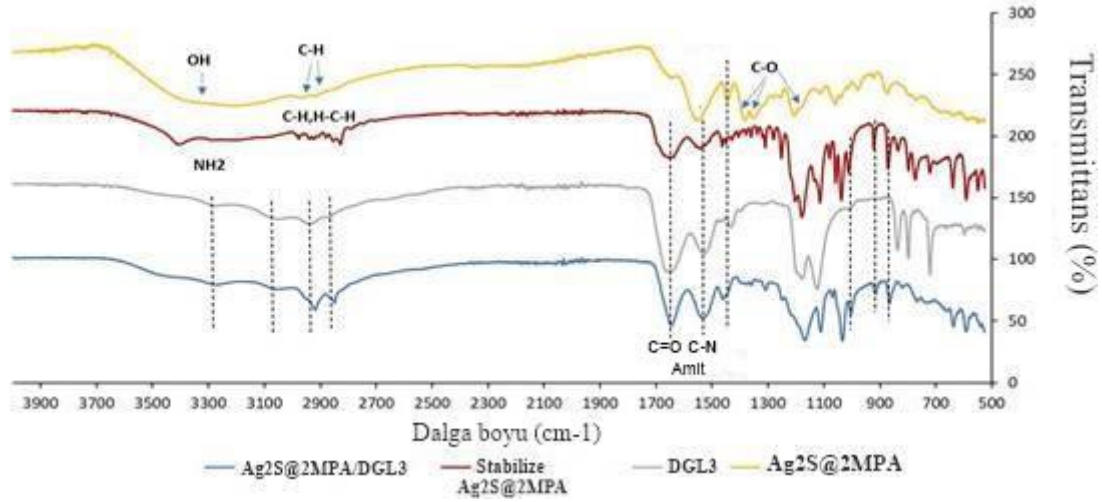
Şekil 4.14: Ag₂S@2MPA/DGL3 kuantum parçacıkların a) boyut ve b) zeta potansiyel ölçüm sonuçlarını

Dendrigrift 3'üncü jenerasyonun tek başına kızılötesi spektrumu ile Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lerin spektrumu örtüştürüldüğünde DGL3'ün en temel pikleri 3266 cm⁻¹'lerde -NH₂, 3266 cm⁻¹'lerde -CH₂, 2849 cm⁻¹'lerde H-C-H ve 1532 cm⁻¹'lerde amit pikleri görülür. Bu da DGL3'ün yapıda olduğunun kanıtıdır.



Şekil 4.15: Ag₂S@2MPA/DGL3 ve DGL3'ün kızılötesi spektraları

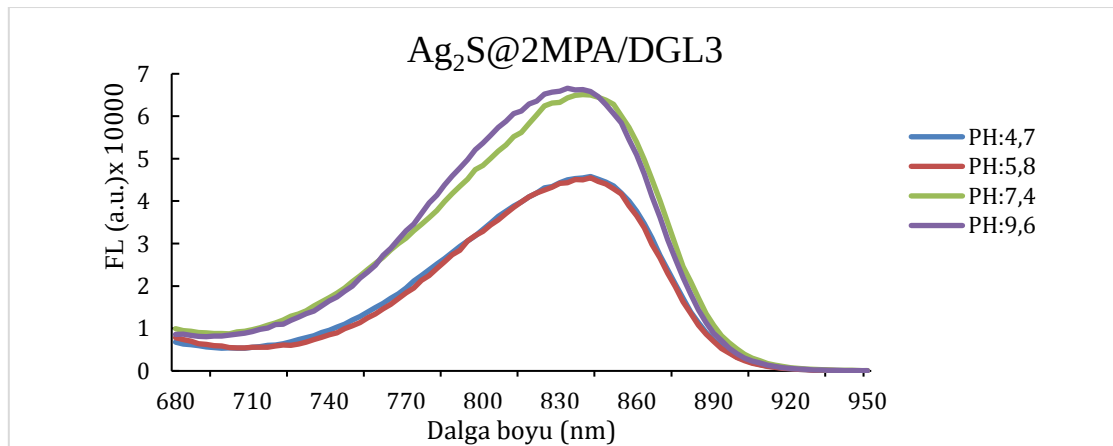
Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'ler 3330 cm⁻¹'lerde belirgin şekilde lizin kaynaklı sekonder aminin -NH₂ esnemeleri görülür. Amit piki daha şiddetli kendini gösterir bu da yapıya lizinin katıldığıının bir kanıtıdır. Karbonil esnemesini 1744 cm⁻¹ civarı görülen pik, amit N-H bükülmesini ise 1689 cm⁻¹'lerde pik gösterir.



Şekil 4.16: Ag₂S@2MPA, Stabilize Ag₂S@2-MPA, Ag₂S@2MPA/DGL3 kuantum noktaları ve DGL3'ün her adımdaki kızılötesi spektralleri

4.2.1. Ag₂S@2MPA/DGL3 Kuantum Noktalarının pH Değişikliği

Sentezlenen Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lerin farklı pH (pH:4,7; pH:5,8; pH:7,4 ve pH:9,7) değerlerindeki ışınması incelendi. Elde edilen sonuçlara göre Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lerin bazik tampondaki ışınma değeri asidik tampondakine göre daha yüksektir (Şekil 4.17). Bilindiği üzere nanoparçacıklar genel olarak endozom yolağı ile hücre içine alınmaktadır. Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'ler benzer FL ışımaya sahip olup en düşük pH'da bile yalnız %30 ışınma kaybına uğramaktadır. Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lerin yüksek ışınması, biyoyumluluğu ve geniş pH aralığındaki stabilitesi gibi özellikleri ile teranostik ajan olarak yüksek potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

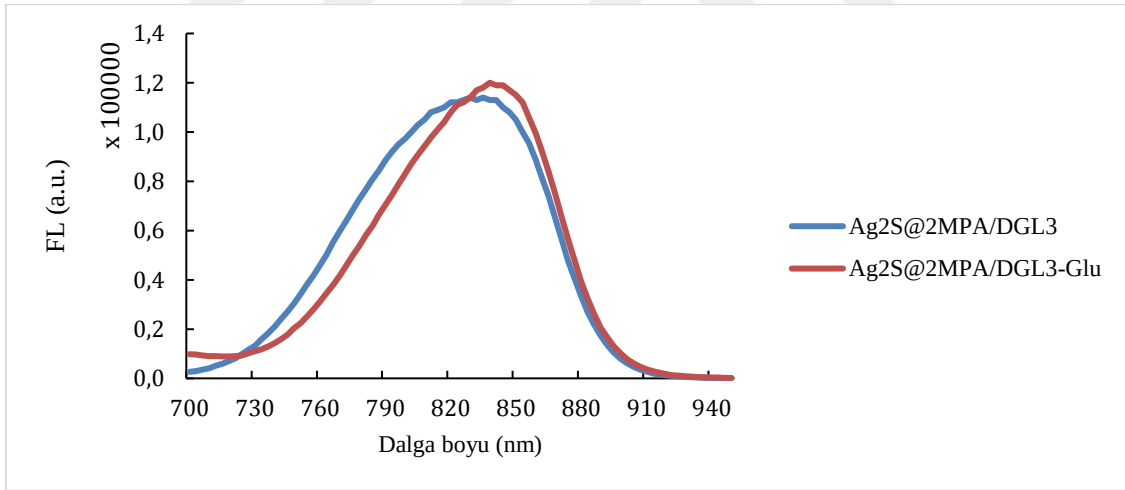


Şekil 4.17: Ag₂S@2MPA/DGL3 için absorbans kalibrasyonu sağlanmış pH değişimine bağlı FL pikleri

Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lerin pH değeri düşürüldüğünde (0,2 M CH₃COOH ile) FL pikinde düşüş gözlemlenirken tekrar baz eklendiğinde (0,2 M NaOH ile) pikte bir yükselme gözlemlendi. Bu da nihai parçacığın kararlı olduğunu ve farklı pH'larda stabilitesini koruduğunu göstermektedir.

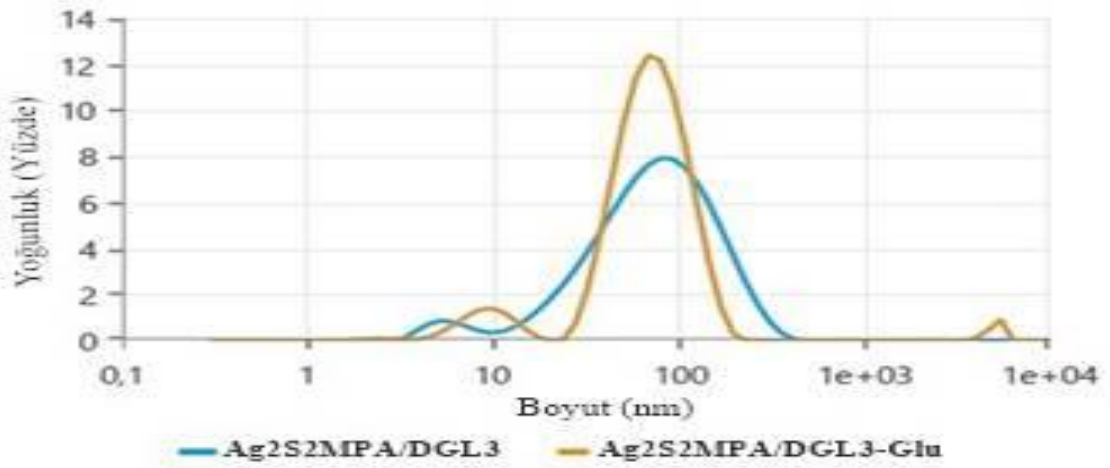
4.3. Ag₂S@2MPA/DGL3-GLU KUANTUM NOKTALARI

Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu ve Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lerin absorbans değerleri eşitlenerek FL ölçümleri gerçekleştirildi. Glikoz etiketlemesi sonucunda ışımasında ciddi bir düşüş görülmeyip aksine bazı reaksiyonlar için hafif bir artış bile gözlemlendi (Şekil 4.18). Artış gözlemlenen reaksiyonlar için reaksiyon yöntemi teoride aynı olup pratikte farklılık gösterebilir. Bu durum pozitif yönde bir etki sunmaktadır. Kaplamanın ışımayı düşürmüyor oluşu biyogörüntüleme çalışmalarının yürütülmesinde büyük bir avantaj sağlayacaktır.



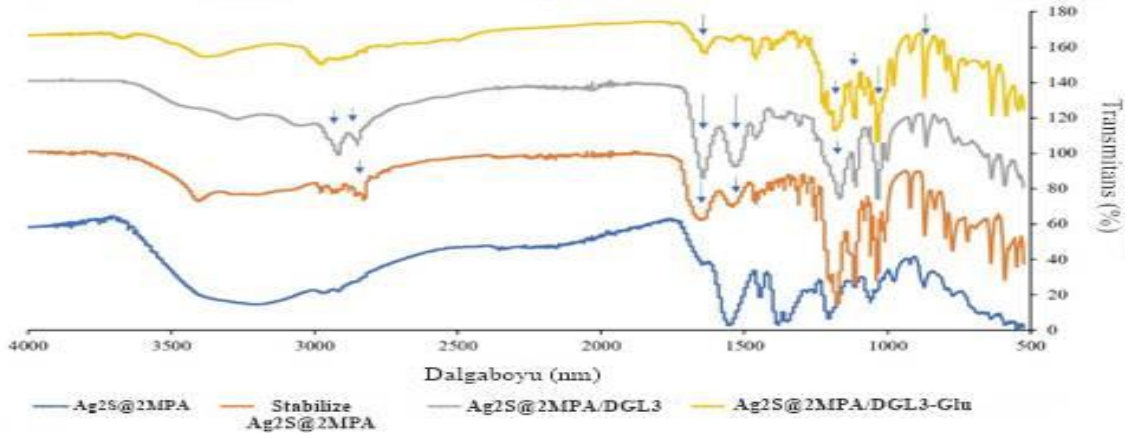
Şekil 4.18: Ag₂S@2MPA/DGL3 ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu kuantum noktalarının fotoluminesans değerleri

Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lerin yoğunluğa bağlı boyutu ~90 nm dir. Glukoz ile etiketlenen Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu parçacık için hidrodinamik boyutu ~80 nm olup ve parçacık boyut dağılımı daha dar olarak elde edildi (Şekil 4.19). Glukoz etiketleme sonrası zeta potansiyeli +22 mV olarak ölçüldü.



Şekil 4.19: Ag₂S@2MPA/DGL3 ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu kuantum noktaları için yoğunluk boyut dağılım grafiği

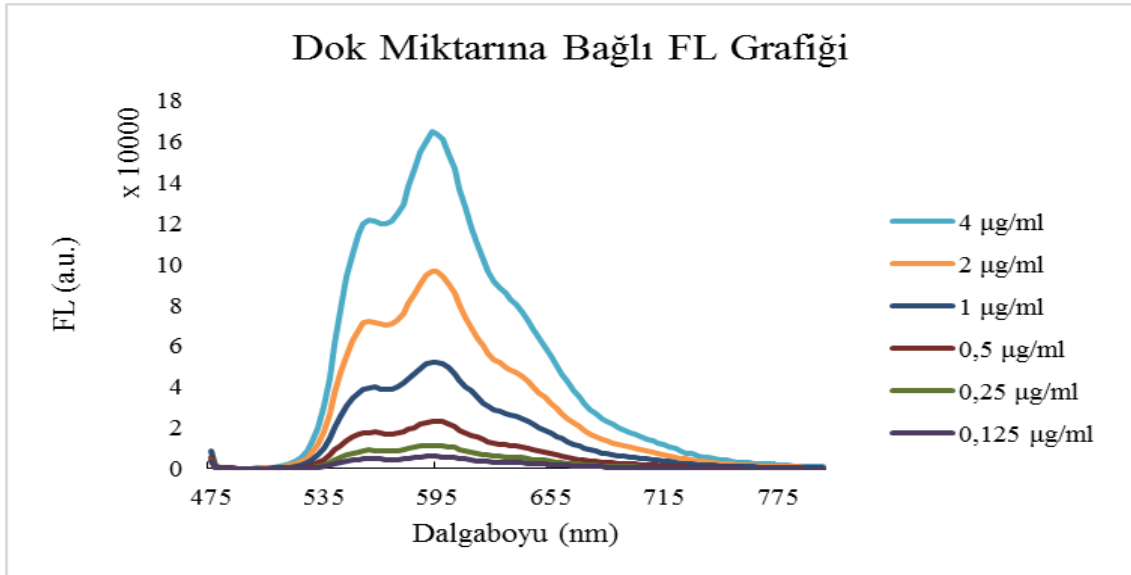
Parçacıklara PEGDA-Glu grubunun eklenmesini kanıtlamak için FTIR kullanıldı. Ag₂S@2MPA KN'ler için en belirgin pik 3500 cm⁻¹'de görülen geniş pik, yapıda karboksil grubuna ait -OH grubunun bulunduğu göstergesidir. Yapıya katman olarak her bir adımda yeni grupların eklenmesiyle bu pik etkinliğini kaybetti. Yapıya ait 2600-2900 cm⁻¹ arasındaki C-H esnemeleri, Ag₂S@2MPA/DGL3/PEGDA-Glu KN'de kısmen varlığını sürdürmektedir. 1680 cm⁻¹'de görülen karbonil grubunun (C = O) varlığı PEGDA-Glu yapısına gidildikçe kızılötesi spektrum üzerinde mavi kayma gösterdi. Sentezin ikinci aşamasında oluşan stabilize Ag₂S@2MPA KN'lerinde stabilizasyon kaynaklı amin grubunun 33412 cm⁻¹ ve 3333 cm⁻¹'lerde gözlenen pikleri ve üçüncü aşamadaki Ag₂S@2MPA-EDA/DGL3 parçacığın 3330 cm⁻¹'lerde belirgin şekilde lizin kaynaklı sekonder aminin -NH₂ esnemeleri etkinliğini kaybetti. Bu ise PEGDA-Glu grubunun yapıya çoğunlukla başarılı bir şekilde eklendiğini gösterir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Sentezlenen $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$, Stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$, $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}$ ve $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Glu}$ kuantum noktaları kızılötesi spektralleri

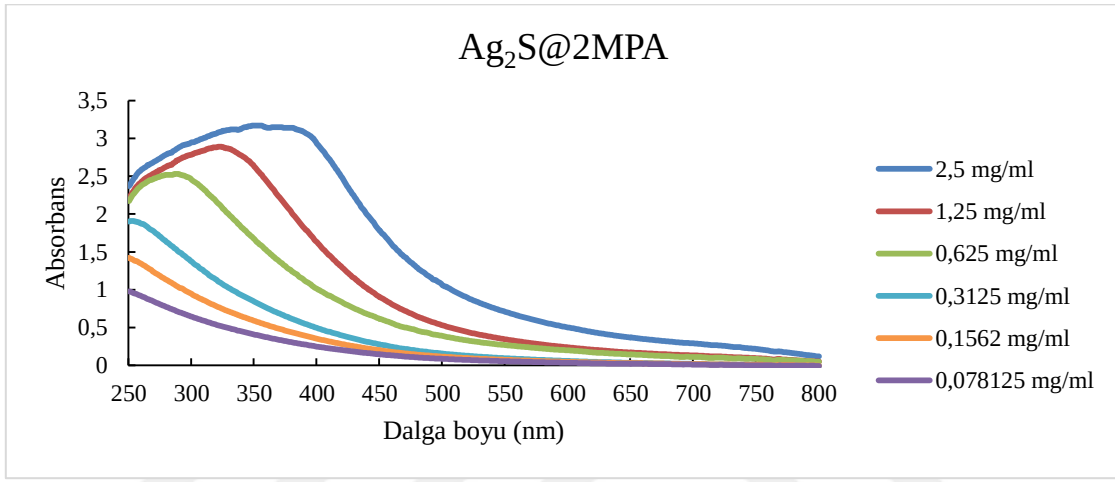
4.4. $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}-\text{GLU}/\text{DOK}$ KUANTUM NOKTALARI

Doksorubisin FL ışması veren bir antikanser ilacıdır. Yüklenen ilaç miktarını kontrolü için 4-0,125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aralıklı seri seyreltme yapılarak FL değeri kontrol edildi. Yükleme sonrası yüklenmeyen ilaç miktarının bulunduğu solüsyonun emisyon değeri ölçülerek miktarı bu ölçek yardımıyla belirlendi.



Şekil 4.21: Konsantrasyonu belirlenmiş doksorubisin ilaçlarının FL grafiği

Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu KN'lerin konsantrasyonu çekirdek parçacığa (Ag₂S@2MPA) göre 2,5 mg/ml olarak belirlendi. Bu miktar konsantrasyona bağlı olarak oluşturulan absorbans ölçeğiyle belirlendi (Şekil 4.22). Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu KN'lerin gerçek konsantrasyon değeri çekirdeğe göre belirlenen konsantrasyon değerinden 11 kat daha fazlaydı. Bu da Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu KN'lerin gerçek konsantrasyonunu yaklaşık 27,5 mg/ml olduğunu gösterir.



Şekil 4.22: Konsantrasyonları belirlenen Ag₂S@2MPA kuantum noktalarının absorbans grafiği

İlk önce doksorubisin 250 µg olarak 2,5 mg/ml (gerçek miktar/kurutulmuş ağırlık) Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu (%15'lik PEGDA-Glu) yapısına yüklendi. Kapsüllenme Etkinliği (%KE) eşitliği yardımıyla %60 olarak hesaplandı. İkinci kez %5'lik PEGDA-Glu için bu deney tekrarlandı. Kapsüllenme Etkinliği %28 olarak hesaplandı. Bu doğrultuda ilerleyen çalışmalara ilaç yüklenme oranı fazlalığı nedeniyle %15'lik PEGDA-Glu yapısı ile devam edildi.

$$\%KE = \frac{\text{Yüklenen ilaç miktarı}}{\text{Yüklemeye bırakılan ilaç miktarı}} \times 100$$

Doksorubisin 250 µg ve 150 µg olarak 2,5 mg/ml Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu KN'lere eklendi her seferinde 116 µg ilacın KN'lere yüklendiği gözlemlendi. Kapsüllenme etkinlikleri sırasıyla %46,4 ve %77,3 olarak hesaplandı. Yaklaşık ilaç

kapsüllenme etkinliği %66 olarak kabul edildi. Yükleme Etkinliği (%YE) eşitliği yardımıyla %4,6 olarak hesaplandı.

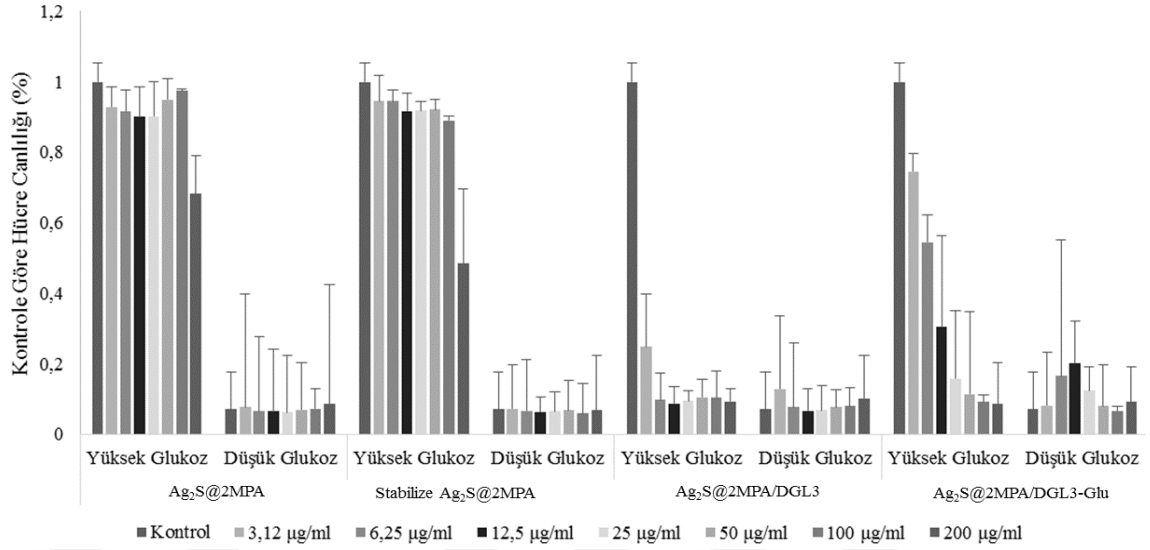
$$\%YE = \frac{\text{Yüklenen ilaç miktarı}}{\text{İlaç yüklenen KN miktarı}} \times 100$$

4.5. Ag₂S@2MPA, Ag₂S@2MPA/DGL3, Ag₂S@2MPA/DGL3-GLU ve Ag₂S@2MPA/DGL3-GLU/DOK YAPILARININ SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ANALİZ EDİLMESİ

MTT sitotoksikite sonuçları hem yüksek glukozlu hem de düşük glukozlu ortamda denendi. Yüksek glukozlu ortamda yeterli glukoz bulunmadığından hücrelerin ölümüne gitme potansiyeli KN'lerin toksisite sonuçları için yanıltıcı olabilir. Ayrıca ortam bulunan fazla glukoz ise glukoz etiketli KN'lerin alınmamasına yol açabilir. Bundan dolayı iki farklı besiyer kullanıldı.

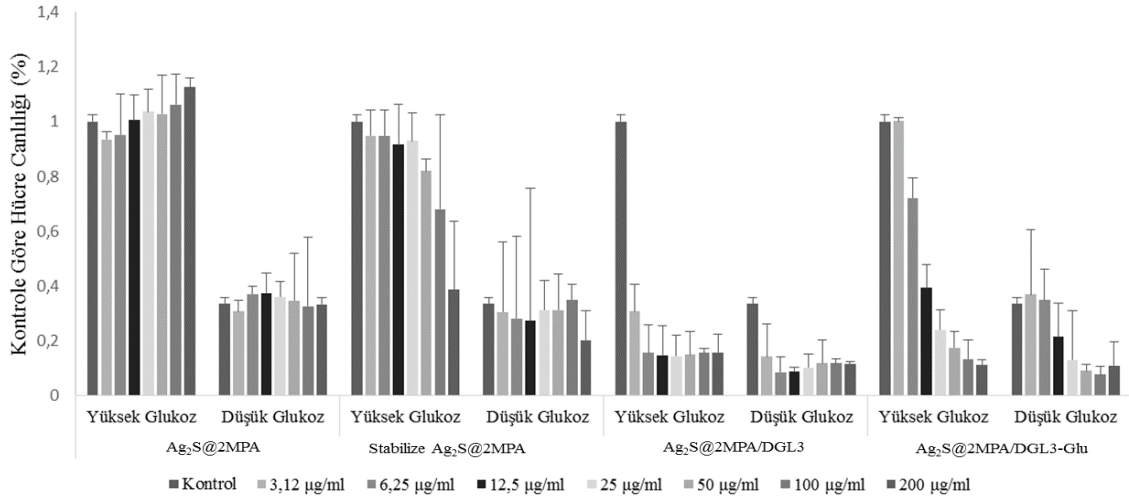
Tüm KN'ler LN18 hücrelerde U87'ye kıyasla daha toksiktir. KN'ler arasında en yüksek biyouyumluluğa sahip olan Ag₂S@2MPA KN'ler görülmektedir. Diğer gruplarda Ag₂S@2MPA çekirdek üzerine farklı oranda sırası ile EDA, DGL3 ve DGL3/PEGDA-Glu polimerleri de içermektedir. Bu parçacıklar arasında Ag₂S@2MPA/DGL3 en yüksek toksisiteye sahip olup ve bu parçacıkların tüm dozlarında toksisite görüldü. Ancak glukoz ile etiketleme sonrası bu parçacıkların biyouyumluluğu yüksek miktarda arttı. Hatta Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu KN'leri düşük glukoz ortamda büyütülmekte olan hücrelere uygulandığı zaman bu hücrelerin proliferasyonuna sebep olmaktadır. (Şekil 4.23 ve 4.24)

LN18



Şekil 4.23: $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$, Stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$, $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}$, $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3-Glu}$ kuantum noktaları ile muamele edilen LN18 hücre hattının yüksek ve düşük glukozlu ortamlardaki MTT hücre toksisite analiz sonuçları

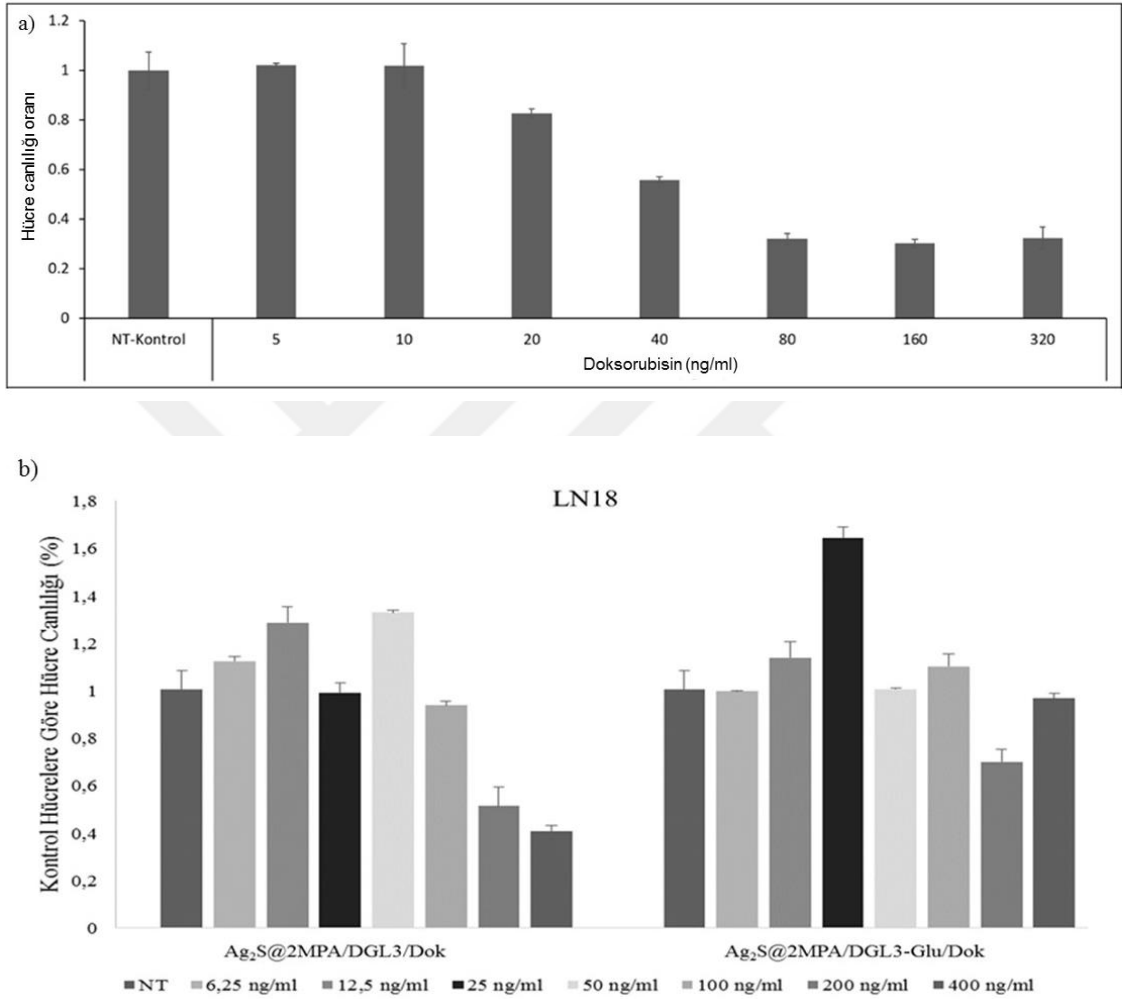
U87



Şekil 4.24: $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$, Stabilize $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}$, $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}$, $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3-Glu}$ kuantum noktaları ile muamele edilen U87 hücre hattının yüksek ve düşük glukozlu ortamlardaki MTT hücre toksisite analiz sonuçları

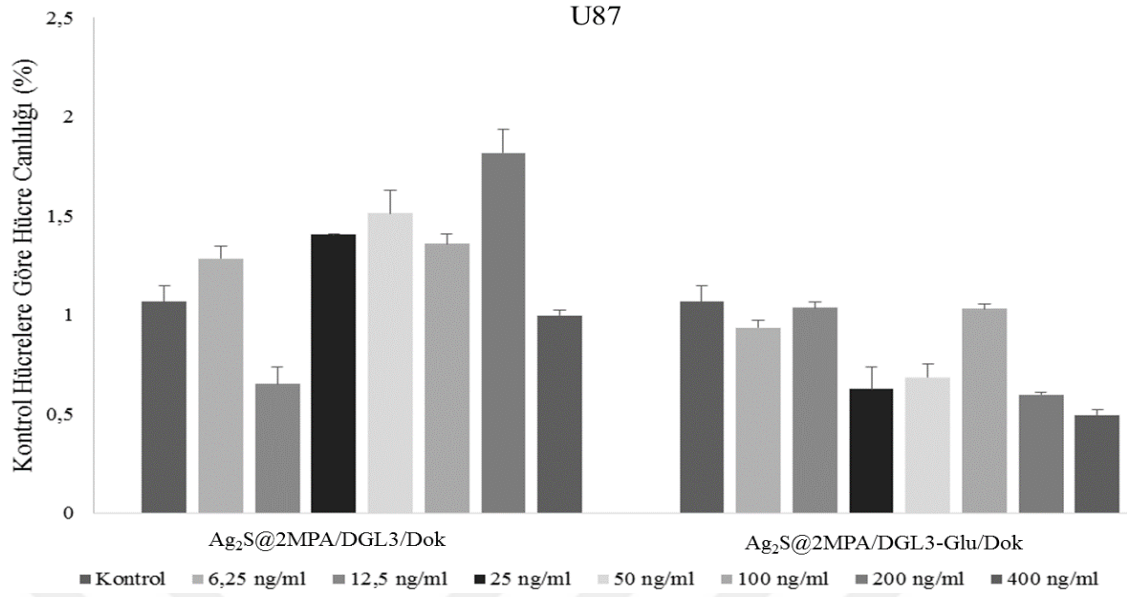
Doksorubisin miktarları sırasıyla 320 ng/ml, 160 ng/ml, 80 ng/ml, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml ve 5 ng/ml olarak belirtildi (**Şekil 34**). Bu dozlar LN18 Glioblastoma Multiforma hücre hattında üzerinde denendi. LN18 hücre hattında Dok ilacının toksisite çalışması yapıldı. Bu çalışmaya göre 80 ng/ml Dok hücrelerin yarısından fazlasının

canlılığını kaybetmesine sebep olmaktadır. Dok konsantrasyonu 6,25 ng/ml'ye sahip olan Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'lerle muamele edilen hücrelerin canlılığı kontrole nazaran aynı seyrederek. Son doz olan 400 ng/ml'e sahip KN'ler için hücre canlılığı azalmaktadır. Ancak hücre canlılığı doz oranını paralel şekilde dereceli olarak azaldığı gözlemlenemedi.

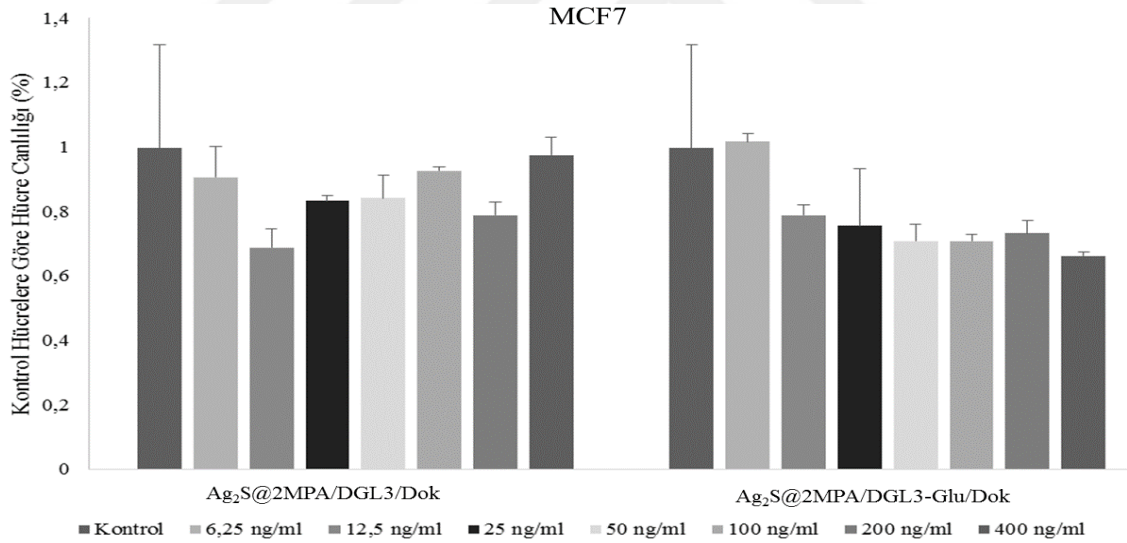


Şekil 4.25: a) Dok ilacının LN18 hücrelerinin canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisinin sonuçları, b) Dok konsantrasyonları 6,25-400 ng/ml belirlenen Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'lerle muamele edilen LN18 hücrelerin canlılığı

Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'ler ile muamele edildiğinde, LN18 hücre hattına göre U87 hücre hattı daha fazla toksik etkiye sahiptir. Glioblastoma hücre hatları (LN18 ve U87) haricinde farklı bir hücre hattı olan insan meme kanseri hücreleri MCF7'da aynı çalışma denendi.



Şekil 4.26: Dok konsantrasyonları 6,25-400 ng/ml belirlenen Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'lerle muamele edilen U87 hücrelerin canlılığı

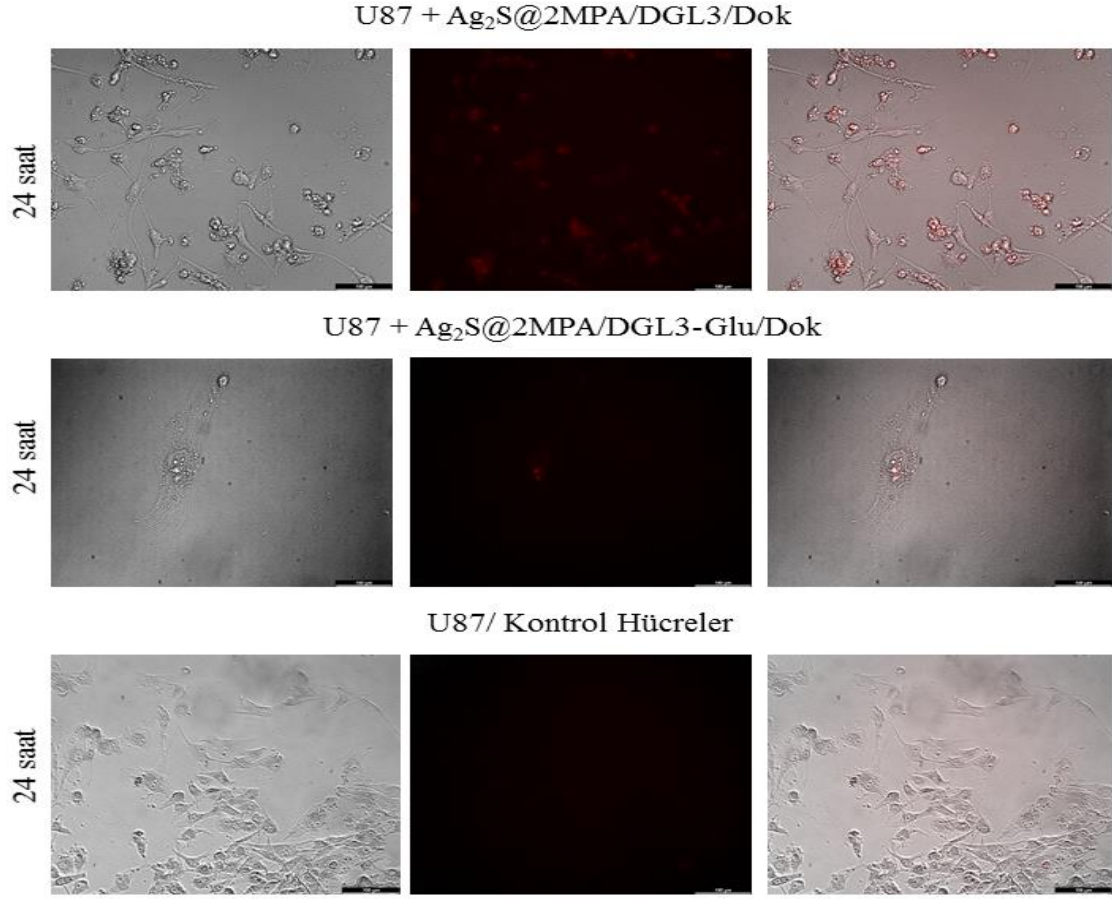


Şekil 4.27: Dok konsantrasyonları 6,25-400 ng/ml belirlenen Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'lerle muamele edilen MCF7 hücrelerin canlılığı

4.6. Ag₂S@2MPA/DGL3/DOK ve Ag₂S@2MPA/DGL3-GLU/DOK YAPILARININ HÜCRE İÇİ ALINIM ANALİZİ

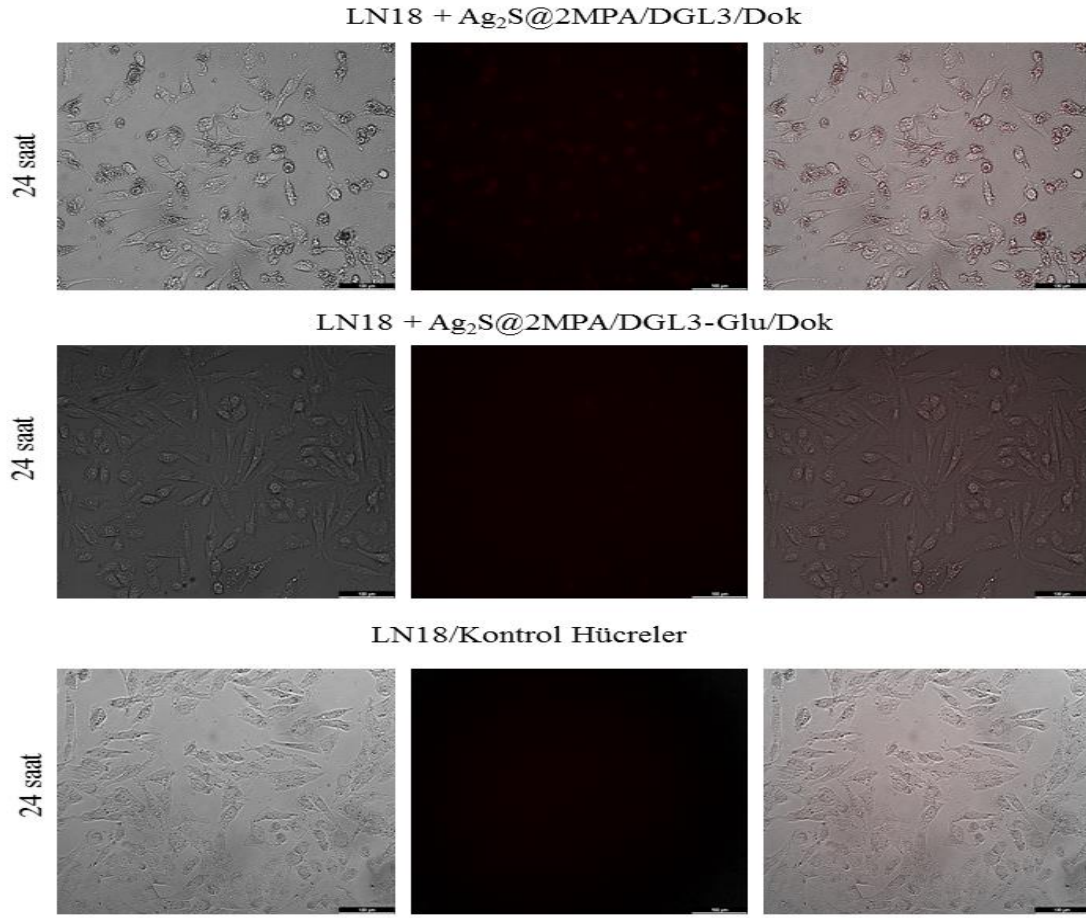
Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok yapılarının üç ayrı hücre hattında (U87, LN18 ve MCF7) hücre içi alım çalışmaları yapıldı. Bu hücre hatlarını için belirlenen kontrol hücrelerde Dok ilacından kaynaklanan bir ışıma

görülmedi. Ancak diğer tüm hücre hatlarında, Dok ilacı, hücre içerisine başarıyla giriş yaptı. Dok daha çok hücre çekirdeği çevresinde olacak şekilde sitoplazmada gözlemlendi.



Şekil 4.28: Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok kuantum noktalarının U87 hücrelerine uygulaması sonrası 24 saat sonundaki floresans mikroskop görüntüleri

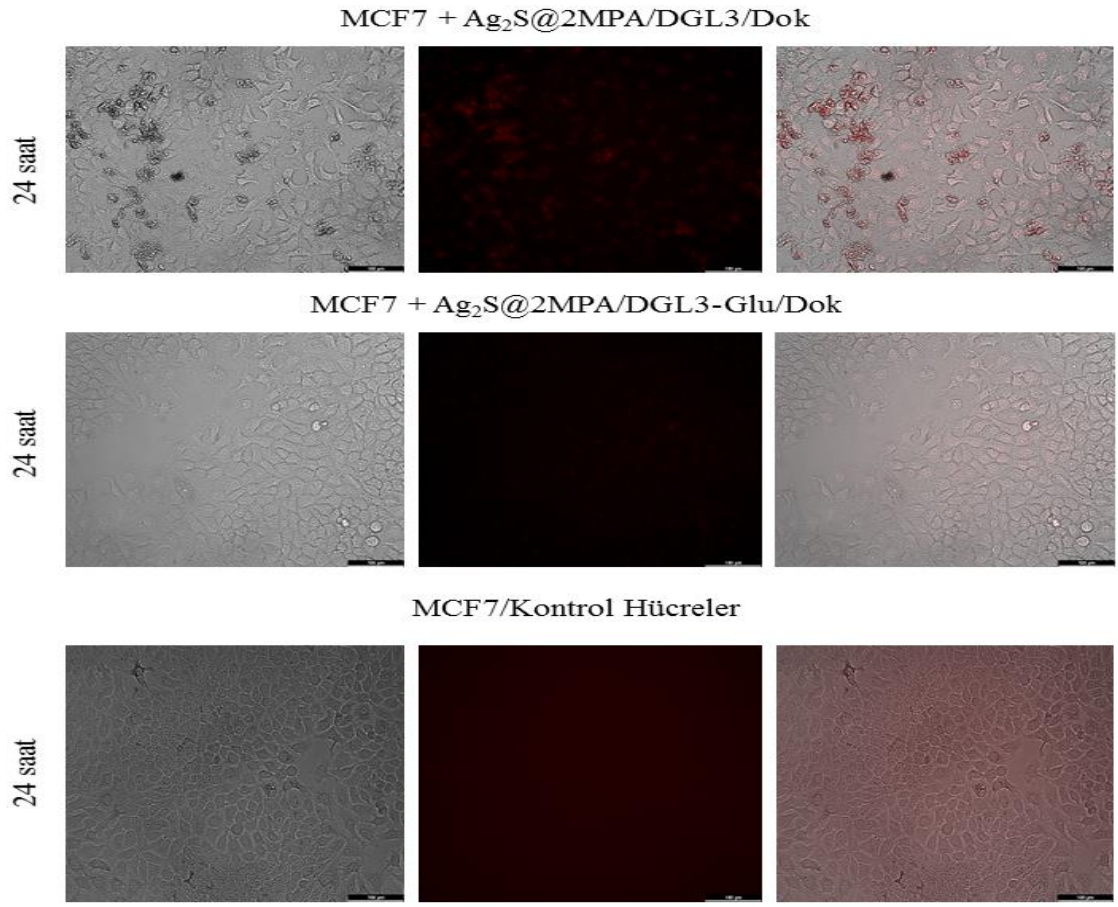
*Sırasıyla satırlar; 100 µm, 40 µm ve 100 µm



Şekil 4.29: Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok kuantum noktalarının MCF7 hücrelerine uygulaması sonrası 24 saat sonundaki floresans mikroskop görüntüleri

*100 μm

Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok yapısındaki DGL3 pozitif yüklüdür bu pozitif yük sayesinde hücre içine aşırı derece alınma neden olmaktadır. PEG hücre içi alınma engel olurken glukoz alınımı artırır. Böylelikle Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok yapısı ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok yapısına nazaran daha görünürdür yani üstünlük Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok yapısındadır. KN'ler *in vitro* çalışmalarında hücrelerin parçacıkları içselleştirmesi olağandır. Ancak PEGDA-Glu yapısı *in vivo* çalışmada büyük bir avantajla hedeflemeyi sağlayacaktır.

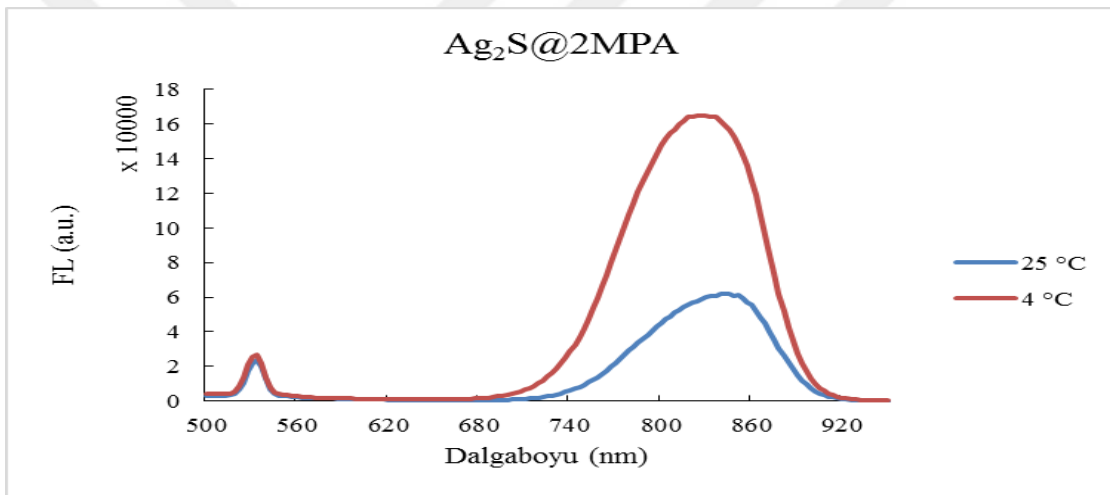


Şekil 4.30: Ag₂S@2MPA/DGL3/Dok ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok kuantum noktalarının MCF7 hücrelerine uygulaması sonrası 24 saat sonundaki floresans mikroskop görüntüleri

*100 µm

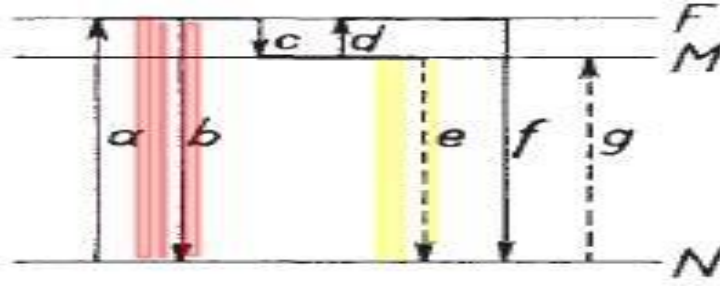
5. TARTIŞMA

Sentezlenen $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPa}$ farklı yoğunluğundaki ışımaları ölçüldüğünde, KN'lerin belirli bir aralıkta optimize ışıma değerine sahip oldukları saptandı. Aynı zamanda sentez reaksiyonu sonrası 24-48 saat süreli Argon gazı varlığında bekletilmesi ışımayı arttırdığı gözlemlendi. Işımayı etkileyen bir diğer faktör ise parçacığın sıcaklığıdır. Soğuk ölçülen ($+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'den çıkartılıp) numuneler oda sıcaklığında bulunan numunelerden yaklaşık iki kat daha yüksek FL değeri vermektedir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPa}$ kuantum noktalarının 4°C ve 25°C 'li ortamdaki solüsyonların FL grafiği

Jablonski'ye (118) göre elektron uyarılmış en üst seviyesinden (F) en alt seviyeye (N) yeterli yüksek sıcaklıkla geçebilmektedir. Böylelikle floresans ışıması gerçekleşir. Lakin düşük sıcaklıklarda orta kararlı seviyeden (M) en alt seviyeye geçişi (N) gerçekleşir yani fosfor ışıması gerçekleştirir. Düşük sıcaklıkta fosfor ışıma süresi bir hayli yükselir. Elektron fazla enerjiye maruz kaldığında (ki bu yüksek sıcaklıklarda gerçekleşecektir) daha fazla uyarılır ve daha üst enerji seviyesine yükselir. Daha üst enerji seviyesine çıkan elektronun, temel hal seviyesine inmesi daha zor ve uzun sürelidir. Diğer yandan düşük sıcaklıkta elektronun uyarılması ve temel hal seviyesine inmesi daha da kolaylaşır. Böylelikle daha fazla ışıma detektöre çarpar. Işıma miktarı sıcak örneğe göre soğuk örneklerde daha yüksektir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2: Fosfor ışıması olan moleküldeki enerji seviyesi. a) absorpsiyon (kırmızı), b) floresans ışıması (kırmızı), c) ortakararlı seviyeye geçiş, d) termal uyarılma, e (sarı) ve f) fosfor ışıması, g) çok küçük geçiş olasılıklı absorpsiyon (118)

Ag₂S@2MPA KN'leri sentezi pH: 7,52'de ve 35°C'de gerçekleşti. Reaksiyon süresi 5 saattir. Ag₂S@2MPA KN'ler 810 nm civarında dar bir pik vermekte ve yaklaşık 2,5-4,5 nm boyuta sahiptirler. Stabilizasyon sonrası ve öncesi KN'lerin ışıma değerleri diğer çalışmalara göre de yüksektir. Bu çalışmalara ait dalga boyu ve boyut analizlerine Tablo 5.1 'de yer verildi.

Tablo 5.1: Literatüre ait bazı Ag₂S kuantum parçacıkları

Kuantum Noktaları	Dalga boyu (nm)	Reaksiyon Süresi (dk)	pH	Sıcaklık (°C)	Boyut (r.nm)*	Kaynak
Ag ₂ S@2MPA-PEI ^a	770	180	10,5	25	41,7 ± 3,0	Duman vd. (3)
Ag ₂ S@2MPA	837	-	7,5	30	2,61	Duman vd. (59)
Ag ₂ S@3MPA	800	300	7,5	90	65	Chen vd. (55)
Ag ₂ S@2MPA	727	180	7,5	25	2,38	Hocaoğlu vd. (119)

* Hidrodinamik boyutu (r: yarıçap) dinamik ışık saçılım tekniği ile sayı-bazlı ortalama ile hesaplandı.

^a Polietilenimin kaplı Ag₂S@2MPA

Ag₂S KN'lerin yüzeyine metal ve tiyol arasındaki yakınlık ile MPA tutulur. MPA karboksil grubu EDC/sulfo-NHS ile aktive edilir (120). Bununla birlikte; iyonik güç, pH ve yük gibi faktörler nokta nanoprob ve biyomoleküller arasındaki elektrostatik

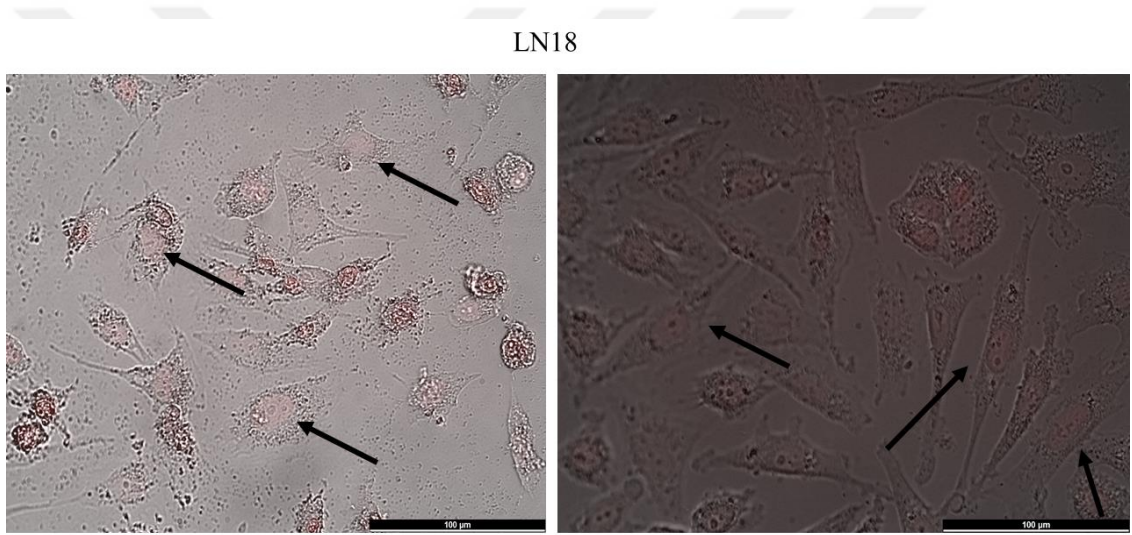
etkileşimde önemli bir role sahiptir. Bu sentetik yaklaşım, aktif Ag₂S KN'ler ve biyomoleküller arasındaki amit bağı gibi kovalent bağların oluşumunu içerir. Kovalent konjugasyon için en yaygın yöntem karbodiimid (EDC-NHS) kenetleme kimyasıdır. KN'lerin yüzeyindeki karbodiimid aktif karboksilik asit gruplarının biyomoleküllerin birincil aminleri ile birleşme eğilimindedir. Bu reaksiyonun en önemli avantajı, kısa amit bağı ve Ag₂S KN'lerin boyutunu en aza indirmesidir. Amit bağları oluşturmak için EDC birlikte daha kararlı ester ve sülfonat ester (Sulfo-NHS) kullanılır. Ayrıca 2MPA kaplamalı Ag₂S KN'ler daha önce yayınlanan verilere dayanarak, beklendiği gibi yüksek toksisiteye sahip değillerdir (59, 119)

DGL3, bol miktarda yüzey amino grubuna sahip bir dendritik polimerdir. Biyoyumlu ve immünojenik değildir (121). Ancak polikatyon karakteri, hücre zarı ile elektrostatik çekimi yüzünden yüksek toksisitelere neden olabilir (122). Bu sorunu çözmek için EDC ve NHS katalizinde, PEGDA-Glu yapısının karboksil grupları Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu kompozitlerini elde etmek için DGL3'ün amino grupları ile eşleştirildi. İlaç dağıtım nanopartikülleri; kan dolaşımı süresini iyileştirmek, tümör bölgelerinde yüksek birikim elde etmek ve ilaçların hücresel alımını teşvik etmek için tercih edilir (123, 124). PEG polimeri; su molekülleri ile etkileşimi kuvvetlidir (99). Bundan dolayı Ag₂S@2MPA/DGL3 yapısının hidrodinamik boyutu Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu yapısının hidrodinamik boyutuna göre büyüktür. Ayrıca Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu KN'leri, Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lere göre daha az toksiktir bu da onları vücut için uyumlu (biyoyumlu) hale getirmektedir.

Duman vd. (45) %73,4 ilaç kapsüllenme verimliliği, 67,5 nmol Dok/mg nanopartikül bileşimi ve %3,7 yüklenme etkinliği elde edildi. Bu çalışmada ortalama %66 ilaç kapsüllenme verimliliği, %4,6 yüklenme etkinliği ve 85,4 nmol Dok/mg nanopartikül bileşimi elde edildi. Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok KN'lerin yükleme kapasitesinin diğer birçok polimer bazlı ilaç dağıtım sisteminden daha üstün olduğu açıktır (125, 126). Bu, esas olarak DGL'nin yüksek dendritik çerçevesinden kaynaklanmaktadır (127, 128).

Doksorubisin yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. Enterkalasyon ile DNA'ya bağlanır ve kanser hücrelerinde apoptoza neden olur (129). Bununla birlikte, ilacın doğrudan kullanımı vücutta hem kötü huylu hem de kötü huylu olmayan hücrelerde birikmesine neden olur ve istenmeyen yan etkileri nedeniyle hastaların yaşam kalitesini

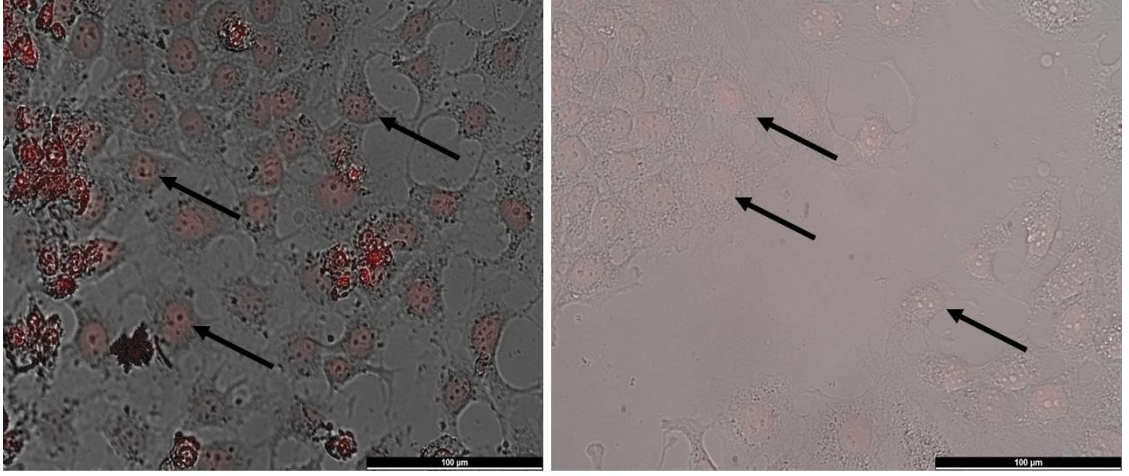
düşürür (130). Bu nedenle, ilacın seçici olarak kanserli dokulara teslimi acil bir taleptir. Bu, hemen hemen tüm kemoterapi ilaçlarının ortak bir ihtiyacıdır (131, 132). Bunda dolayı $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}\text{-Glu}$ hedefleme yapabilen biyogörüntüleme ajanı KN'lere antikanser ilacı yüklendi. Böylelikle hedefli bir şekilde ilacın tümörlü dokulara geçişi sağlanabilir. KN'ler esas olarak sitoplazmada dağılır, bu da hücre yüzeyine yapışmadığını hücresel içselleştirildiğini gösterir (3). KN'lere Dok yüklemesi bu farkı daha belirgin hale getirir. $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Dok}$ ve $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}\text{-Glu}\text{-Dok}$ KN'lerin ise hücresel olarak içselleştirildikten 24 saat sonra ilacın çekirdeğe ulaşımı gerçekleşti (Şekil 5.3).



Şekil 5.3: Sırası ile $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Dok}$ ve $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}\text{-Glu}\text{-Dok}$ kuantum noktaları ile muamele edilen LN18 hücrelerinin Dok alımının floresans mikroskop görüntüleri

*40x büyültme yapılarak 100 µm ölçekli çekildi.

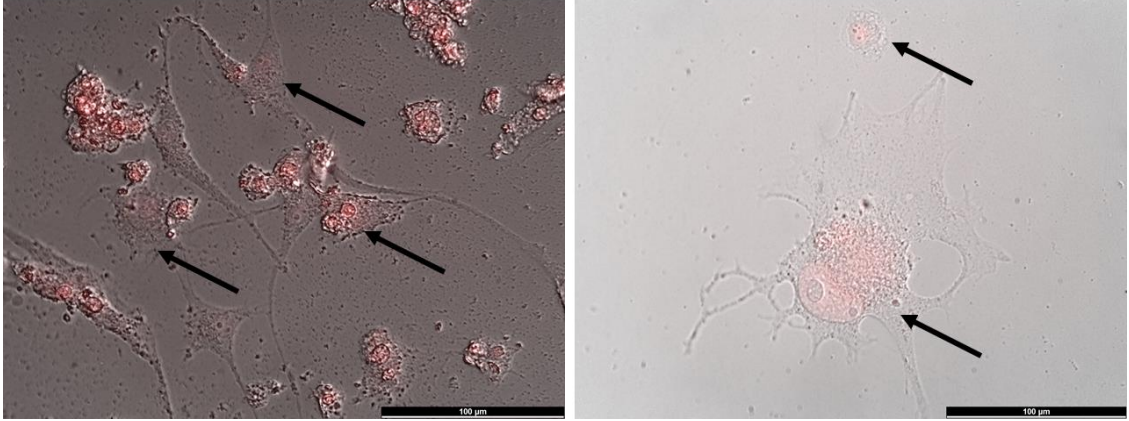
MCF7



Şekil 5.4: Sırası ile $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Dok}$ ve $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Glu-Dok}$ kuantum noktaları ile muamele edilen MCF7 hücrelerinin Dok alınının floresans mikroskop görüntüleri

*40x büyültme yapılarak 100 μm ölçekli çekildi.

U87



Şekil 5.5: Sırası ile $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Dok}$ ve $\text{Ag}_2\text{S}@2\text{MPA}/\text{DGL3}/\text{Glu-Dok}$ kuantum noktaları ile muamele edilen U87 hücrelerinin Dok alınının floresans mikroskobu görüntüleri

*40x büyültme yapılarak 100 μm ölçekli çekildi.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yeni bir sistem olarak Ag₂S@2MPA gelişimi ve bu kuantum noktaların yüzeyinin poli L-lizin dendron ile kaplanarak yakın kızılötesi güçlü emisyonunda küçük, son derecede biyobozunur ve biyouyumlu dendronize KN'ler (Ag₂S@2MPA/DGL3) elde edildi. Ag₂S@2MPA lüminesans yoğunluğunda önemli bir azalma ve agregasyon olmadan Ag₂S@2MPA/DGL3 KN'lerin yüzeylerinin hedefleme için glukoz molekülleriyle modifikasyonu sağlandı. Hücre canlılığını yüksek miktarda korunması temel alınarak Ag₂S@2MPA/DGL3 ve Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu KN'lerin biyouyumluluk ve toksisitesi formülasyonu belirlendi. Böylece *in vitro* hedefleme verimliliği, terapötik etkinlik ve geliştirilmiş bu kuantum noktalarının kanser hücre kültürü üzerinde yakın kızılötesi biyogörüntüleme potansiyeli değerlendirildi. Ag₂S@2MPA/DGL3-Glu/Dok yapısının *in vivo* hedefleme çalışmaları ve buna ek olarak biyogörüntüleme çalışmaları için umut vadettiği sonucuna varıldı. Bu sayede yeni geliştirilen bu teranostik kuantum noktalarının hem tedavi hem de tanıda kullanılabilirliği kanıtlandı.

KAYNAKLAR

1. Wegner KD, Hildebrandt N. 2015. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. *Chem. Soc. Rev.* 44(14):4792–4834
2. Iga AM, Robertson JHP, Winslet MC, Seifalian AM. 2007. Clinical potential of quantum dots. *J. Biomed. Biotechnol.* 2007(10):76087
3. Demir Duman F, Acar H. 2017. *Development of Near Infrared Emitting Cationic Ag₂S Quantum Dots as Drug-Gene Delivery and Optical Imaging Agents*
4. Xu X, Ray R, Gu Y, Ploehn HJ, Gearheart L, et al. 2004. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *J. Am. Chem. Soc.* 126(40):12736–37
5. Namdari P, Negahdari B, Eatemadi A. 2017. Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 87:209–22
6. Peng X, Manna L, Yang W, Wickham J, Scher E, et al. 2000. Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature.* 404(6773):59–61
7. *Termal Kamera ve Kullanım Alanları.* 2021. Best Endüstriyel. www.bestendustriyel.com/index.php?route=information
8. Bera D, Qian L, Tseng T-K, Holloway PH. 2010. Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review. *Materials.* 3(4):2260–2345
9. Bachmann J, Nielsch K. 2008. Nanotechnology. Understanding Small Systems. By Ben Rogers, Sumita Pennathur, and Jesse Adams. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47(26):4778–79
10. Oğuzcan E. 2020. PSİKO-UYARICI MODAFİNİL İLE NÜKLEİK ASİTLERİN ETKİLEŞİM MEKANİZMASININ FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ İLE İNCELENMESİ. , p. 60
11. Yguerabide J. 1972. [24] Nanosecond fluorescence spectroscopy of macromolecules. In *Methods in Enzymology.* 26:498–578. Elsevier
12. Petryayeva E, Algar WR, Medintz IL. 2013. Quantum Dots in Bioanalysis: A Review of Applications across Various Platforms for Fluorescence Spectroscopy and Imaging. *Appl. Spectrosc.* 67(3):215–52
13. Jin S, Hu Y, Gu Z, Liu L, Wu H-C. 2011. Application of Quantum Dots in Biological Imaging. *J. Nanomater.* 2011:e834139
14. Mussa Farkhani S, Valizadeh A. 2014. Review: three synthesis methods of CdX (X = Se, S or Te) quantum dots. *IET Nanobiotechnol.* 8(2):59–76
15. Hocaoglu I, Demir F, Birer O, Kiraz A, Sevrin C, et al. 2014. Emission tunable, cyto/hemocompatible, near-IR-emitting Ag₂S quantum dots by aqueous decomposition of DMSA. *Nanoscale.* 6(20):11921–31
16. Aldana J, Wang YA, Peng X. 2001. Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 123(36):8844–50
17. Wang J-H, Wang H-Q, Li Y-Q, Zhang H-L, Li X-Q, et al. 2008. Modification of CdTe quantum dots as temperature-insensitive bioprobes. *Talanta.* 74(4):724–29
18. Acar HY, Kas R, Yurtsever E, Ozen C, Lieberwirth I. 2009. Emergence of 2MPA as an Effective Coating for Highly Stable and Luminescent Quantum Dots. *J. Phys. Chem. C.* 113(23):10005–12
19. Javidi J, Haeri A, Nowroozi F, Dadashzadeh S. 2019. Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Excretion of Ag₂S Quantum Dots in Mice and Rats: the Effects of Injection Dose, Particle Size and Surface Charge. *Pharm. Res.* 36(3):46
20. Awasthi P, An X, Xiang J, Kalva N, Shen Y, Li C. 2020. Facile synthesis of noncytotoxic PEGylated dendrimer encapsulated silver sulfide quantum dots for NIR-II biological imaging. *Nanoscale.* 12(9):5678–84
21. Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(12):906–18
22. Zhao J, Zhong D, Zhou S. 2018. NIR-I-to-NIR-II fluorescent nanomaterials for biomedical imaging and cancer therapy. *J. Mater. Chem. B.* 6(3):349–65
23. Alivisatos AP. 1996. Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science.* 271(5251):933–37
24. Murray CB, Norris DJ, Bawendi MG. 1993. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* 115(19):8706–15

25. Zhou H, Fan Z, Li PY, Deng J, Arhontoulis DC, et al. 2018. Dense and Dynamic Polyethylene Glycol Shells Cloak Nanoparticles from Uptake by Liver Endothelial Cells for Long Blood Circulation. *ACS Nano*. 12(10):10130–41
26. Chen H, Li L, Cui S, Mahounga D, Zhang J, Gu Y. 2010. Folate Conjugated CdHgTe Quantum Dots with High Targeting Affinity and Sensitivity for In vivo Early Tumor Diagnosis. *J. Fluoresc.* 21:793–801
27. Chen H, Li B, Zhang M, Sun K, Wang Y, et al. 2014. Characterization of tumor-targeting Ag₂S quantum dots for cancer imaging and therapy in vivo. *Nanoscale*. 6(21):12580–90
28. Aswathy RG, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. 2010. Near-infrared quantum dots for deep tissue imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 397(4):1417–35
29. Tsay JM, Pflughoeft M, Bentolila LA, Weiss S. 2004. Hybrid Approach to the Synthesis of Highly Luminescent CdTe/ZnS and CdHgTe/ZnS Nanocrystals. *ChemInform*. 35(18):
30. Rivas D, Muñoz-Matutano G, Canet-Ferrer J, García-Calzada R, Trevisi G, et al. 2014. Two-Color Single-Photon Emission from InAs Quantum Dots: Toward Logic Information Management Using Quantum Light. *Nano Lett.* 14(2):456–63
31. Zhang J, Gao J, Miller EM, Luther JM, Beard MC. 2014. Diffusion-Controlled Synthesis of PbS and PbSe Quantum Dots with *in Situ* Halide Passivation for Quantum Dot Solar Cells. *ACS Nano*. 8(1):614–22
32. Derfus AM, Chan WCW, Bhatia SN. 2004. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.* 4(1):11–18
33. Marchan R, Reif R, Hengstler JG. 2012. Toxicology of magnetic nanoparticles: disturbed body iron homeostasis? *Arch. Toxicol.* 86(5):683–84
34. Wu X, Tian F, Zhao JX, Wu M. 2013. Evaluating pharmacokinetics and toxicity of luminescent quantum dots. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9(10):1265–77
35. Mashinchian O, Johari-Ahar M, Ghaemi B, Rashidi M, Barar J, Omid Y. 2014. Impacts of quantum dots in molecular detection and bioimaging of cancer. *BioImpacts BI*. 4(3):149–66
36. Aj W, Dj W, Dj W, Ji C, Ja H. 2009. Solution-liquid-solid growth of ternary Cu-In-Se semiconductor nanowires from multiple- and single-source precursors. *J. Am. Chem. Soc.* 131(44):16177–88
37. Liu L, Hu R, Roy I, Lin G, Ye L, et al. 2013. Synthesis of Luminescent Near-Infrared AgInS₂ Nanocrystals as Optical Probes for In Vivo Applications. *Theranostics*. 3(2):109–15
38. Luo J, Wei H, Huang Q, Hu X, Zhao H, et al. 2013. Highly efficient core-shell CuInS₂-Mn doped CdS quantum dot sensitized solar cells. *Chem. Commun.* 49(37):3881–83
39. Kezuka T, Konishi M, Isobe T, Senna M. 2000. Preparation and properties of nanocrystalline ZnS:Mn-polymer composite films. *J. Lumin.* 87–89:418–20
40. Weng KC, Noble CO, Papahadjopoulos-Sternberg B, Chen FF, Drummond DC, et al. 2008. Targeted Tumor Cell Internalization and Imaging of Multifunctional Quantum Dot-Conjugated Immunoliposomes in Vitro and in Vivo. *Nano Lett.* 8(9):2851–57
41. Welshe K, Sherlock SP, Dai H. 2011. Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(22):8943–48
42. Jiang P, Zhu C-N, Zhang Z-L, Tian Z-Q, Pang D-W. 2012. Water-soluble Ag₂S quantum dots for near-infrared fluorescence imaging in vivo. *Biomaterials*. 33(20):5130–35
43. Zhang Y, Hong G, Zhang Y, Chen G, Li F, et al. 2012. Ag₂S quantum dot: a bright and biocompatible fluorescent nanoprobe in the second near-infrared window. *ACS Nano*. 6(5):3695–3702
44. Purushothaman B, Song JM. 2021. Ag₂S quantum dot theragnostics. *Biomater. Sci.* 9(1):51–69
45. Duman FD, Erkisa M, Khodadust R, Ari F, Ulukaya E, Acar HY. 2017. Folic acid-conjugated cationic Ag₂S quantum dots for optical imaging and selective doxorubicin delivery to HeLa cells. *Nanomed.* 12(19):2319–33
46. Asik D, Yagci MB, Demir Duman F, Yagci Acar H. 2016. One step emission tunable synthesis of PEG coated Ag₂S NIR quantum dots and the development of receptor targeted drug delivery vehicles thereof. *J. Mater. Chem. B*. 4(11):1941–50
47. Ozkan Vardar D, Aydin S, Hocaoglu I, Yagci Acar FH, Basaran N. 2018. Effects of silver sulfide quantum dots coated with 2-mercaptopropionic acid on genotoxic and apoptotic pathways in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 291:212–19
48. Ren Q, Ma Y, Zhang S, Ga L, Ai J. 2021. One-Step Synthesis of Water-Soluble Silver Sulfide Quantum Dots and Their Application to Bioimaging. *ACS Omega*. 6(9):6361–67
49. de la Rica R, Velders AH. 2011. Biomimetic Crystallization of Ag₂S Nanoclusters in Nanopore Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* 133(9):2875–77
50. Sahu A, Qi L, Kang MS, Deng D, Norris DJ. 2011. Facile Synthesis of Silver Chalcogenide (Ag₂E; E = Se, S, Te) Semiconductor Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 133(17):6509–12

51. Hong G, Robinson JT, Zhang Y, Diao S, Antaris AL, et al. 2012. In Vivo Fluorescence Imaging with Ag₂S Quantum Dots in the Second Near-Infrared Region. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51(39):9818–21
52. Gao J, Wu C, Deng D, Wu P, Cai C. 2016. Direct Synthesis of Water-Soluble Aptamer-Ag₂S Quantum Dots at Ambient Temperature for Specific Imaging and Photothermal Therapy of Cancer. *Adv. Healthc. Mater.* 5(18):2437–49
53. Zhang X-S, Xuan Y, Yang X-Q, Cheng K, Zhang R-Y, et al. 2018. A multifunctional targeting probe with dual-mode imaging and photothermal therapy used in vivo. *J. Nanobiotechnology.* 16:
54. Smith AM, Mancini MC, Nie S. 2009. Second window for in vivo imaging. *Nat. Nanotechnol.* 4(11):710–11
55. Chen G, Tian F, Zhang Y, Zhang Y, Li C, Wang Q. 2014. Tracking of Transplanted Human Mesenchymal Stem Cells in Living Mice using Near-Infrared Ag₂S Quantum Dots. *Adv. Funct. Mater.* 24(17):2481–88
56. Dai C, Yang C-X, Yan X-P. 2015. Ratiometric Fluorescent Detection of Phosphate in Aqueous Solution Based on Near Infrared Fluorescent Silver Nanoclusters/Metal–Organic Shell Composite. *Anal. Chem.* 87(22):11455–59
57. Shu Y, Jiang P, Pang D-W, Zhang Z-L. 2015. Droplet-based microreactor for synthesis of water-soluble Ag₂S quantum dots. *Nanotechnology.* 26(27):275701
58. Wang C, Wang Y, Xu L, Zhang D, Liu M, et al. 2012. Facile Aqueous-Phase Synthesis of Biocompatible and Fluorescent Ag₂S Nanoclusters for Bioimaging: Tunable Photoluminescence from Red to Near Infrared. *Small.* 8(20):3137–42
59. Duman FD, Hocaoglu I, Ozturk DG, Gozuacik D, Kiraz A, Yagci Acar H. 2015. Highly luminescent and cytocompatible cationic Ag₂S NIR-emitting quantum dots for optical imaging and gene transfection. *Nanoscale.* 7(26):11352–62
60. Gui R, Wan A, Liu X, Yuan W, Jin H. 2014. Retracted Article: Water-soluble multidentate polymers compactly coating Ag₂S quantum dots with minimized hydrodynamic size and bright emission tunable from red to second near-infrared region. *Nanoscale.* 6(10):5467–73
61. Wu C, Zhang Y, Li Z, Li C, Wang Q. 2016. A novel photoacoustic nanoprobe of ICG@PEG-Ag₂S for atherosclerosis targeting and imaging in vivo. *Nanoscale.* 8(25):12531–39
62. Yan D, He Y, Ge Y, Song G. 2017. Fluorescent Detection of Phosphate in Aqueous Solution Based on Near Infrared Emission Ag₂S QDs/Metal – Organic Shell Composite. *J. Fluoresc.* 27(1):227–33
63. Teertstra SJ, Gauthier M. 2004. Dendrigraft polymers: macromolecular engineering on a mesoscopic scale. *Prog. Polym. Sci.* 29(4):277–327
64. *Characteristics of the DGL.* 2021. Colcum. www.colcum.eu
65. Tsogas I, Theodossiou T, Sideratou Z, Paleos CM, Collet H, et al. 2007. Interaction and Transport of Poly(L-lysine) Dendrigrafts through Liposomal and Cellular Membranes: The Role of Generation and Surface Functionalization. *Biomacromolecules.* 8(10):3263–70
66. Collet H, Souaid E, Cottet H, Deratani A, Boiteau L, et al. 2010. An Expedient Multigram-Scale Synthesis of Lysine Dendrigraft (DGL) Polymers by Aqueous N-Carboxyanhydride Polycondensation. *Chem. - Eur. J.* 16(7):2309–16
67. Boas U, Heegaard PMH. 2004. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* 33(1):43
68. Majoros I, Williams C, Baker Jr. J. 2008. Current Dendrimer Applications in Cancer Diagnosis and Therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 8(14):1165–79
69. Cheng Y, Zhao L, Li Y, Xu T. 2011. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 40(5):2673
70. Perrault SD, Walkey C, Jennings T, Fischer HC, Chan WCW. 2009. Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Lett.* 9(5):1909–15
71. Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, et al. 2011. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat. Nanotechnol.* 6(12):815–23
72. Liu Y, Li J, Shao K, Huang R, Ye L, et al. 2010. A leptin derived 30-amino-acid peptide modified pegylated poly-L-lysine dendrigraft for brain targeted gene delivery. *Biomaterials.* 31(19):5246–57
73. Hu G, Chun X, Wang Y, He Q, Gao H. 2015. Peptide mediated active targeting and intelligent particle size reduction-mediated enhanced penetrating of fabricated nanoparticles for triple-negative breast cancer treatment. *Oncotarget.* 6(38):41258–74
74. Langer R. 2003. Where a Pill Won't Reach. *Sci. Am.* 288(4):50–57
75. Traitel T, Goldbart R, Kost J. 2008. Smart polymers for responsive drug-delivery systems. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 19(6):755–67
76. de Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS. 2008. *Nanotechnology in drug delivery.* Springer
77. Mirza AZ, Siddiqui FA. 2014. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *Int. Nano Lett.* 4(1):94

78. Rudramurthy G, Swamy M, Sinniah U, Ghasemzadeh A. 2016. Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules*. 21(7):836
79. Lam P-L, Wong W-Y, Bian Z, Chui C-H, Gambari R. 2017. Recent advances in green nanoparticulate systems for drug delivery: efficient delivery and safety concern. *Nanomed*. 12(4):357–85
80. Haba Y, Kojima C, Harada A, Ura T, Horinaka H, Kono K. 2007. Preparation of Poly(ethylene glycol)-Modified Poly(amido amine) Dendrimers Encapsulating Gold Nanoparticles and Their Heat-Generating Ability. *Langmuir*. 23(10):5243–46
81. Park S-H, Oh S-G, Mun J-Y, Han S-S. 2006. Loading of gold nanoparticles inside the DPPC bilayers of liposome and their effects on membrane fluidities. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 48(2):112–18
82. Kabanov AV, Lemieux P, Vinogradov S, Alakhov V. 2002. Pluronic® block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54(2):223–33
83. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres M del P, et al. 2018. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology*. 16(1):71
84. Greish K. 2007. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J. Drug Target*. 15(7–8):457–64
85. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol*. 2(12):751–60
86. Fang J, Nakamura H, Maeda H. 2011. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63(3):136–51
87. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. 2015. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93:52–79
88. Shenoy DB, Amiji MM. 2005. Poly(ethylene oxide)-modified poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *Int. J. Pharm.* 293(1–2):261–70
89. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, et al. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(33):11613–18
90. Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJ-P, Bégin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 37(2–3):155–62
91. Krauel K, Pitaksuteepong T, Davies NM, Rades T. 2004. Entrapment of Bioactive Molecules in Poly (Alkylcyanoacrylate) Nanoparticles: *Am. J. Drug Deliv.* 2(4):251–59
92. Abdelwahab SI, Taha, Sheikh, How, El-Sunousi, et al. 2013. Thymoquinone-loaded nanostructured lipid carriers: preparation, gastroprotection, in vitro toxicity, and pharmacokinetic properties after extravascular administration. *Int. J. Nanomedicine*, p. 2163
93. Silva P, Bonifácio B, Ramos M, Negri K, Maria Bauab T, Chorilli M. 2013. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. *Int. J. Nanomedicine*, p. 1
94. Zhai G, Guo, Tan, Liu. 2011. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. *Int. J. Nanomedicine*, p. 1621
95. Sechi M, Vanna S, Roggio AM, Siliani, Massimo P, et al. 2012. Development of novel cationic chitosan- and anionic alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol. *Int. J. Nanomedicine*, p. 5501
96. Casetari L, Illum L. 2014. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J. Controlled Release*. 190:189–200
97. Xu B, Watkins R, Wu L, Zhang C, Davis R. 2015. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. *Int. J. Nanomedicine*, p. 6055
98. Kozlowski A, Milton Harris J. 2001. Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. *J. Controlled Release*. 72(1–3):217–24
99. Monfardini C, Schiavon O, Caliceti P, Morpurgo M, Harris JM, Veronese FM. 1995. A Branched Monomethoxypoly(ethylene glycol) for Protein Modification. *Bioconjug. Chem.* 6(1):62–69
100. Yang F, Williams CG, Wang D, Lee H, Manson PN, Elisseeff J. 2005. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 26(30):5991–98
101. Li XY, Yu SY, Park HJ, Zhao M. 2015. Polyethyleneglycol diacrylate microspheres: a novel carrier for laccase immobilisation. *J. Microencapsul.* 32(1):22–28
102. Wuelfing WP, Gross SM, Miles DT, Murray RW. 1998. Nanometer Gold Clusters Protected by Surface-Bound Monolayers of Thiolated Poly(ethylene glycol) Polymer Electrolyte. *J. Am. Chem. Soc.* 120(48):12696–97
103. Hartmann LC, Keeney GL, Lingle WL, Christianson TJH, Varghese B, et al. 2007. Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *Int. J. Cancer*. 121(5):938–42

104. Kumar P, Tambe P, Paknikar KM, Gajbhiye V. 2017. Folate/ N -acetyl glucosamine conjugated mesoporous silica nanoparticles for targeting breast cancer cells: A comparative study. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 156:203–12
105. Kumar P, Paknikar KM, Gajbhiye V. 2018. A robust pH-sensitive unimolecular dendritic nanocarrier that enables targeted anti-cancer drug delivery via GLUT transporters. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 171:437–44
106. Zhao L, Zheng Y, Yan H, Xie W, Sun X, et al. 2016. 2-Deoxy- α -D-Glucose Modified Magnetic Nanoparticles with Dual Functional Properties: Nanothermotherapy and Magnetic Resonance Imaging. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 16(3):2401–7
107. Holland EC. 2000. Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(12):6242–44
108. Maher EA. 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15(11):1311–33
109. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. 2006. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2(9):494–503
110. Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, et al. 2013. Glioblastoma, a Brief Review of History, Molecular Genetics, Animal Models and Novel Therapeutic Strategies. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 61(1):25–41
111. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, et al. 2014. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2007–2011. *Neuro-Oncol.* 16(suppl 4):iv1–63
112. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. 2017. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*. 18(1):3–9
113. Jia G, Han Y, An Y, Ding Y, He C, et al. 2018. NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 178:302–16
114. ElAli A, Hermann DM. 2011. ATP-Binding Cassette Transporters and Their Roles in Protecting the Brain. *The Neuroscientist*. 17(4):423–36
115. Liu C, Zhao Z, Gao H, Rostami I, You Q, et al. 2019. Enhanced blood-brain-barrier penetrability and tumor-targeting efficiency by peptide-functionalized poly(amidoamine) dendrimer for the therapy of gliomas. *Nanotheranostics*. 3(4):311–30
116. Shirvalilou S, Khoei S, Khoei S, Raoufi NJ, Karimi MR, Shakeri-Zadeh A. 2018. Development of a magnetic nano-graphene oxide carrier for improved glioma-targeted drug delivery and imaging: In vitro and in vivo evaluations. *Chem. Biol. Interact.* 295:97–108
117. Jiang X, Xin H, Ren Q, Gu J, Zhu L, et al. 2014. Nanoparticles of 2-deoxy-d-glucose functionalized poly(ethylene glycol)-co-poly(trimethylene carbonate) for dual-targeted drug delivery in glioma treatment. *Biomaterials*. 35(1):518–29
118. Jablonski A. 1933. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*. 131(3319):839–40
119. Hocaoglu I, Çizmeciyen MN, Erdem R, Ozen C, Kurt A, et al. 2012. Development of highly luminescent and cytocompatible near-IR-emitting aqueous Ag₂S quantum dots. *J. Mater. Chem.* 22(29):14674
120. Tang R, Xue J, Xu B, Shen D, Sudlow GP, Achilefu S. 2015. Tunable Ultrasmall Visible-to-Extended Near-Infrared Emitting Silver Sulfide Quantum Dots for Integrin-Targeted Cancer Imaging. *ACS Nano*. 9(1):220–30
121. Sisavath N, Leclercq L, Le Saux T, Oukacine F, Cottet H. 2013. Study of interactions between oppositely charged dendrigraft poly-l-lysine and human serum albumin by continuous frontal analysis capillary electrophoresis and fluorescence spectroscopy. *J. Chromatogr. A*. 1289:127–32
122. Kodama Y, Nakamura T, Kurosaki T, Egashira K, Mine T, et al. 2014. Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-l-lysine for gene delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87(3):472–79
123. Wang S, Huang P, Chen X. 2016. Stimuli-Responsive Programmed Specific Targeting in Nanomedicine. *ACS Nano*. 10(3):2991–94
124. Lee J-Y, Termsarasab U, Park J-H, Lee SY, Ko S-H, et al. 2016. Dual CD44 and folate receptor-targeted nanoparticles for cancer diagnosis and anticancer drug delivery. *J. Controlled Release*. 236:38–46
125. Saraswathy M, Knight GT, Pilla S, Ashton RS, Gong S. 2015. Multifunctional drug nanocarriers formed by cRGD-conjugated β CD-PAMAM-PEG for targeted cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 126:590–97
126. Zhang Y, Mao L, Liu J, Liu T. 2017. Self-fluorescent drug delivery vector based on genipin-crosslinked polyethylenimine conjugated globin nanoparticle. *Mater. Sci. Eng. C*. 71:17–24

127. Varshosaz J, Hassanzadeh F, Aliabadi HS, Khoraskani FR, Mirian M, Behdadfar B. 2016. Targeted delivery of doxorubicin to breast cancer cells by magnetic LHRH chitosan bioconjugated nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 93:1192–1205
128. Li X-X, Chen J, Shen J-M, Zhuang R, Zhang S-Q, et al. 2018. pH-Sensitive nanoparticles as smart carriers for selective intracellular drug delivery to tumor. *Int. J. Pharm.* 545(1–2):274–85
129. Lee S, Baek M, Kim H-Y, Ha J-H, Jeoung D-I. 2002. Mechanism of doxorubicin-induced cell death and expression profile analysis. *Biotechnol. Lett.* 24(14):1147–51
130. Carvalho C, Santos R, Cardoso S, Correia S, Oliveira P, et al. 2009. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr. Med. Chem.* 16(25):3267–85
131. Savla R, Taratula O, Garbuzenko O, Minko T. 2011. Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer. *J. Controlled Release.* 153(1):16–22
132. Qi L, Gao X. 2008. Emerging application of quantum dots for drug delivery and therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5(3):263–67



