



**KEMOTERAPİ UYGULAMALARINDA KULLANILABİLİR  
NİTELİKTE NANOBOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI  
SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ ve MEME KANSERİ  
TEDAVİSİNDE KULLANABİLİRLİĞİNİN IN VİTRO  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

**NAZAN GÖKŞEN TOSUN**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOMALZEME ve DOKU MÜHENDİSLİĞİ  
Prof. Dr. İsa GÖKÇE  
Temmuz-2022  
Her hakkı saklıdır**



**T.C.**  
**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**  
**BİYOMALZEME ve DOKU MÜHENDİSLİĞİ DOKTORA PROGRAMI**

**KEMOTERAPİ UYGULAMALARINDA KULLANILABİLİR**  
**NİTELİKTE NANOBOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI**  
**SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ ve MEME KANSERİ**  
**TEDAVİSİNDE KULLANABİLİRLİĞİNİN IN VİTRO**  
**OLARAK ARAŞTIRILMASI**  
**DOKTORA TEZİ**

**NAZAN GÖKŞEN TOSUN**

**Birinci Danışman: Prof. Dr. İsa GÖKÇE**

**İkinci Danışman: Prof. Dr. Cemil ALKAN**

**TOKAT- 2022**



**Bu tez çalışması;**

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2020/66 nolu ve 2020/118 nolu proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine ve YÖK 100/2000 Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Programı kapsamında destek veren YÖK'e teşekkür ederim.**

**Nazan GÖKŞEN TOSUN** tarafından hazırlanan “Kemoterapi Uygulamalarında Kullanılabilir Nitelikte Nanoboyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Meme Kanseri Tedavisinde Kullanabilirliğinin *In Vitro* Olarak Araştırılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 22 Temmuz 2022 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı YÖK 100/2000 Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği Programı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

II. Danışman

Prof. Dr. Cemil ALKAN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Recep AKKAYA

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Emel CANPOLAT

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ruhan ALTUN ANAYURT

Çankırı Karatekin Üniversitesi

ONAY

.....

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

---/---/20---

## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Nazan GÖKŞEN TOSUN**

**22 Temmuz 2022**

## ÖNSÖZ

Doktora programın süresince gerçekleştirdiğim tüm çalışmalarda ve bu tez çalışmasının yürütülmesinde laboratuvarlarının tüm imkânlarını kullanmama izin veren bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda daima yol gösteren danışmanım Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora programım süresince, akademik olarak gelişmemde büyük emeği bulunan bu yolculukta bilgisini ve tecrübesini paylaşan, laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan, maddi ve manevi desteklerini esirgmeden bu yolculukta bana rehberlik eden eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Cemil ALKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayvan hücre kültürü çalışmalarını öğreten, bu alanda tecrübe kazanmamı ve kendimi geliştirebilmemi sağlayan, bilgisini, tecrübesini ve laboratuvar imkanlarını esirgemeyen, maddi manevi her koşulda yanımda olup bana yol gösteren, gönüllü danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nanopartikül üretim aşamasında yaşadığım çıkmazlarda bilgisiyle ve tecrübesiyle yol gösteren Sayın Prof. Dr. İrem EREL GÖKTEPE ve Sayın Doç. Dr. Mehmet Koray GÖK hocalarıma teşekkür ederim.

Doktora programım boyunca, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, bu yolculukta motivasyonumu yükselten ve hayatta iyi bir noktaya ulaşmamda elinden gelen tüm çabayı sarf eden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN'e, bu yolculukta maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen bilgi ve tecrübesini aktaran Dr. Yahya TAYHAN'a, Doku Mühendisliği alanında bilgi ve tecrübelerini paylaşan, akademik hayatıma katkı sunan Sayın Dr. Tuğba ÖZDEMİR'e ve laboratuvar imkanlarını paylaşarak ortak çalışma yapma deneyimi kazandıran Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aykut Özgür'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımın birçok yerinde bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan ve bu yolculukta yaşadığım tüm çıkmazlarda manevi desteğini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan keyif aldığım değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Özlem KAPLAN'a teşekkür ederim.

Çalışmama katkı sunan Prof. Dr. Recep AKKAYA, Dr. Öğr. Üyesi Emel CANPOLAT ve Dr. Öğr. Üyesi Ruhan ALTUN ANAYURT'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim babam Fuat GÖKŞEN, annem Nuray GÖKŞEN ve kardeşlerim Elif GÖKŞEN, Ayla GÖKŞEN, Mehmet GÖKŞEN ve Müzeyyen İLERİ'ye ve doktora eğitimim boyunca, bana inanan, güvenen sevgisini ve desteğini her an yanımda hissettiğim yol arkadaşım sevgili eşim M. Raşit TOSUN'a ve sevgili ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Nazan GÖKŞEN TOSUN**

**22 Temmuz 2022**



## ÖZET

### KEMOTERAPİ UYGULAMALARINDA KULLANILABİLİR NİTELİKTE NANOBOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ ve MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANABİLİRLİĞİNİN IN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI

Gökşen Tosun, Nazan

Doktora Tezi, Biyomalzeme ve Doku Mühendisliği

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsa Gökçe

İkinci Danışman: Prof. Dr. Cemil Alkan

Temmuz 2022, xii + 155 sayfa

Meme kanseri tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerden kemoterapi ve radyoterapi direkt veya dolaylı olarak tümör bölgesini spesifik olarak hedef alan stratejiler olmadığı için sağlıklı doku ve hücreler üzerinde meydana getirdikleri ağır yan etkiler kanser kaynaklı ölümlerin ardında yatan ana sebebi oluşturmaktadır. Son yıllarda, bu ağır yan etkilerin üstesinden gelmek için ilaçların bir kapsül içerisinde hedeflendirilerek tümör bölgesine gönderilmesi yeni ve umut verici bir yaklaşım olarak ilgi çekmiştir. Meme kanseri tedavisinde kullanılan ve kemoterapötik bir ajan olan doksorubisini enkapsüle edecek polimerik ilaç taşıyıcı sistemler bu tez kapsamında geliştirilmiştir. Burada, polyester grubu olan poliadiptatların, pPAd, pBAd ve pEAd, mPEG-550 kullanılarak PEGilenmesi sonucu sentezlenen kopolimerlerden metot optimizasyonu gerçekleştirilerek, çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile üç farklı yapıda ilaç taşıyıcı sistem, PANPs, BANPs ve EANPs, ilk kez bu tez kapsamında üretilmiştir. Optimize edilmiş metot ile üretilen bu nanotaşıyıcılara DOX yüklenmiş ve enkapsülasyon verimlilikleri sırasıyla %57, %58 ve %44.5 olarak hesaplanmıştır. Serbest formdaki DOX, ilaç yüklü olmayan nanotaşıyıcılar ve ilaç yüklü nanotaşıyıcıların *in vitro* sitotoksitate analizleri meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231'de) gerçekleştirilmiştir. Sitotoksitate analiz sonuçları, üretilen nanopartiküllerin serbest formdaki DOX'a kıyasla düşük toksisite sergilediklerini ve ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceklerini ortaya koymuştur. Fiziksel, kimyasal ve hücre kültürü verileri değerlendirildiğinde, tez kapsamında üretilen PANPs, BANPs ve EANPs nanotaşıyıcıların, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni ilaç taşıyıcı sistemler olabilme potansiyeline sahip oldukları belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İlaç Taşıyıcı Sistem, Nanopartikül, Meme kanseri, Poliadiptat, Doksorubisin

**ABSTRACT**  
DEVELOPMENT OF NANOSIZED DRUG CARRIER SYSTEMS USABLE IN  
CHEMOTHERAPY APPLICATIONS AND IN VITRO INVESTIGATION IN  
BREAST CANCER TREATMENTS

Gökşen Tosun, Nazan  
Doctorate Thesis, Biomaterial and Tissue Engineering  
Supervisor: Prof. Dr. İsa Gökçe  
Co-Supervisor: Prof. Dr. Cemil Alkan  
July 2022, xii + 155 pages

Due to those conventional methods like chemotherapy, and radiotherapy used in the treatment of breast cancer were not directly or indirectly target the tumor area and serious side effects of these strategies causing lethal health issue. Targeting drugs in capsules to the tumor site has attracted considerable attention as a new and promising approach to overcome the adverse severe side effects. Polymeric drug delivery systems to encapsulate Doxorubicin, a chemotherapeutic agent used in the treatment of breast cancer, were developed within the scope of this thesis. Here, three different structures of drug carrier systems, PANPs, BANPs and EANPs, were produced by double emulsion solvent evaporation method, by performing method optimization from the copolymers synthesized as a result of PEGylation of polyadipates, pPAd, pBAd and pEAd using mPEG-550. These nanocarriers produced with the optimized method were loaded with DOX and their encapsulation efficiencies were calculated as 57%, 58% and 44.5%, respectively. *In vitro* cytotoxicity analyses of free-DOX, non-drug-loaded nanocarriers, and DOX-loaded nanocarriers were tested in breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231. The results demonstrated that the nanoparticles exhibited low cytotoxicity and could be used as a drug delivery system. Physical, chemical, and cell culture data showed that PANPs, BANPs, and EANPs nanoparticles produced within the scope of the thesis have the ability to be new drug delivery systems that may be used in breast cancer treatment.

**Keywords:** Drug Delivery System, Nanoparticles, Breast Cancer, Polyadipate, Doxorubicin

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
TABLolar LİSTESİ .....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Malign Tümör .....	4
2.2. Meme Kanseri .....	13
2.2.1. Meme kanseri türleri .....	14
2.2.2. Meme kanseri tedavisi için onaylanmış/onaylanmamış ilaçlar.....	17
2.3. Geleneksel Taşıyıcı Sistemler .....	19
2.4. Meme Kanserinde Gelişmiş İlaç Taşıyıcı Sistemler .....	19
2.5. Meme Kanseri Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar .....	20
2.6. Meme Kanserinde Nano Bazlı Gelişmiş İlaç Taşıyıcı Sistemler .....	20
2.6.1. Veziküler ilaç taşıyıcı sistemler .....	21
2.6.2. Nanopartiküler sistemler .....	24
2.6.3. Miseller .....	26
2.6.4. Dendrimerler .....	27
2.6.5. Nanoemülsiyonlar .....	27
2.6.6. Nanofiberler .....	28
2.6.7. Çok katmanlı nanoparçacıklar.....	28
2.6.8. Manyetik ilaç taşıyıcı sistemler.....	28
2.6.9. Hibrit nanopartiküller.....	29
2.6.10. Diğer taşıyıcı sistemler.....	29
2.7. Nanotaşıyıcıların Üretim Yöntemleri.....	30
2.7.1. Çözücü buharlaştırma yöntemi .....	30
2.7.2. Emülsifikasyon/Solvent Difüzyonu .....	31
2.7.3. Emülsifikasyon/Ters Tuzlama .....	32
2.7.4. Nano-çöktürme.....	33
2.7.5. Diyaliz.....	34

2.8. Kanser Tedavisinde Nanopartiküller ve Hedefe Yönelik İlaç Taşınımı .....	34
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>37</b>
3.1. Materyal .....	37
3.1.1. Cihazlar .....	37
3.1.2. Kimyasallar ve sarf malzemeler.....	38
3.2. Amfipatik Kopolimerin Sentezlenmesi.....	39
3.2.1. Polyesterlerin sentezlenmesi .....	39
3.2.2. Polyesterlerin PEGilasyonu .....	43
3.2.3. Polyesterlerin moleküler ağırlıklarının grup sonu analizi ile belirlenmesi .....	46
3.3. Polimerlerin Kimyasal Karakterizasyonu .....	47
3.4. Amfipatik Kopolimerlerden Nanopartikül Üretim Optimizasyonu .....	48
3.5. Optimum Koşullarda Üretilen Nanopartiküllere İlaç Yüklenmesi .....	48
3.6. Hayvan Hücre Kültürü Çalışmaları.....	48
3.6.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının kültüre edilmesi.....	48
3.6.2. Sitotoksosite analizi .....	51
3.6.3. <i>In vitro</i> hücre sel alım analizi.....	52
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b> .....	<b>54</b>
4.1. Polyesterlerin Sentezlenmesi .....	54
4.2. FTIR Spektroskopisi .....	55
4.3. PEGilasyon.....	59
4.4. Grup sonu analizi ile moleküler ağırlığı tayini.....	61
4.5. Nanopartikül Üretim Optimizasyonu .....	61
4.5.1. Nano-çöktürme yöntemi ile nanopartikül üretimi .....	61
4.5.2. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi .....	68
4.5.3. Düşük moleküler ağırlıklı poliadipatların sentezlenmesi.....	74
4.5.4. Poliadipatlara PEI eklenmesi ile nanopartikül üretimi.....	78
4.5.5. PEI kaplama yöntemi ile nanopartikül üretimi .....	85
4.5.6. Düşük PEGilasyon oranı ile sentezlenen kopolimerlerden nanopartikül üretimi .....	87
4.5.7. Kemoterapötik ajanın belirlenmesi .....	91
4.5.8. Enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanması .....	93
4.5.9. Nanotaşıyıcıların karakterizasyonu .....	97
4.4. Hücre Kültürü Analizleri.....	104
4.4.1. Sitotoksosite Analizi .....	104

4.4.2. <i>In vitro</i> hücresel alım analiz bulguları .....	119
<b>SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	121
<b>KAYNAKLAR</b> .....	131
<b>EKLER</b> .....	151



## TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve markaları.....	37
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan başlıca kimyasallar ve sarf malzemeler .....	38
Tablo 4.1. Poliadipatların sayıca ortalama moleküler ağırlıkları.....	61
Tablo 4.2. mPEG-pEAd-mPEG kopolimerinden sulu faz/organik faz oranına bağlı nanopartikül üretimi.....	62
Tablo 4.3. mPEG-pPAd-mPEG kopolimerden sulu faz/organik faz oranına bağlı nanopartikül üretimi.....	63
Tablo 4.4. mPEG-pBAd-mPEG kopolimerinden sulu faz/organik faz oranına bağlı nanopartikül üretimi.....	64
Tablo 4.5. mPEG-pPAd-mPEG kopolimerden sonikasyon süresine bağlı nanopartikül üretimi.....	65
Tablo 4.6. mPEG-pEAd-mPEG kopolimerden sonikasyon süresine bağlı nanopartikül üretimi.....	66
Tablo 4.7. mPEG-pBAd-mPEG kopolimerden sonikasyon süresine bağlı nanopartikül üretimi.....	67
Tablo 4.8. Metot optimizasyonunda PVA oranının belirlenmesi .....	69
Tablo 4.9. Metot optimizasyonunda sonikasyon süresinin belirlenmesi .....	70
Tablo 4.10. mPEG-pPAd-mPEG kopolimerin konsantrasyonuna bağlı boyut optimizasyonu .....	71
Tablo 4.11. mPEG-pEAd-mPEG kopolimerin konsantrasyonuna bağlı boyut optimizasyonu .....	71
Tablo 4.12. mPEG-pBAd-mPEG kopolimerin konsantrasyonuna bağlı boyut optimizasyonu.....	72
Tablo 4.13. Kopolimerlerin konsantrasyonuna bağlı boyut optimizasyonu.....	73
Tablo 4.14. Poliadipatların moleküler ağırlıkları.....	75
Tablo 4.15. PVA konsantrasyonuna bağlı partikül boyut ve boyut dağılımı .....	76
Tablo 4.16. Polimer konsantrasyonuna bağlı partikül boyut ve boyut dağılımı.....	77
Tablo 4.17. Sonikasyon süresine bağlı boyut değişimi .....	77
Tablo 4.18. Amplitude oranına bağlı boyut değişimi .....	78
Tablo 4.19. PVA oranına bağlı olarak pBAd: PEI yapıdaki nanopartiküllerin boyut değişimi.....	80

Tablo 4.20. Nanopartiküllerin PEI/pBAd oranına bağlı boyut değişimi .....	80
Tablo 4.21. Çift emülsiyon yöntemi ile poliadiyat: PEI karışım türüne bağlı olarak boyut ve boyut dağılım değişimi .....	83
Tablo 4.22. pEAd: PEI ve PVA oranına bağlı partikül boyut ve boyut dağılımındaki değişim.....	83
Tablo 4.23. pPAd: PEI ve PVA oranına bağlı partikül boyut ve boyut dağılımındaki değişim.....	84
Tablo 4.24. pPAd: PEI oranına bağlı partikül boyut ve boyut dağılımındaki değişim...	85
Tablo 4.25. PEI kaplama metot optimizasyonu .....	86
Tablo 4.26. PA kopolimerinden sentezlenen nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımları.....	88
Tablo 4.27. Optimize edilmiş metot kullanılarak sentezlenen kopolimerlerden üretilen nanopartiküllerin yıkama prosedürü öncesi boyut ve boyut dağılımları .....	89
Tablo 4.28. Optimize edilmiş metot kullanılarak sentezlenen kopolimerlerden üretilen nanopartiküllerin yıkama prosedürü sonrası boyut ve boyut dağılımları .....	89
Tablo 4.29 DOX HCI ve ICG' nin eksitasyon ve emisyon dalga boyları .....	94
Tablo 4.30. Spektroflorometre cihazının özellikleri .....	95
Tablo 4.31. DOX HCI ve ICG ajanlarının enkapsülasyon verimlilikleri .....	98
Tablo 4.32. DOX HCI ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların ortalama boyut, PDI ve ortalama zeta potansiyel değerleri .....	100
Tablo 4.33. DOX HCI ve ICG'nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki IC50 değerleri .....	106
Tablo 4.34. Madde yüklü olmayan nanotaşıyıcılar, DOX HCI yüklü nanotaşıyıcılar ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların MCF-7 hücre hattında, 24 s, 48 s ve 72 s deki IC50 değerleri .....	113
Tablo 4.35. İlaç yüklü olmayan nanotaşıyıcılar, DOX HCI yüklü nanotaşıyıcılar ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların MDA-MB-231 hücre hattında IC50 değerleri .....	114

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. DSÖ verilerine göre dünya genelinde toplam kanser vaka sayısının kanser türlerine göre dağılımı (McGuire, 2016'dan uyarlanmıştır.).....	4
Şekil 2.2. DSÖ verilerine göre erkeklerde görülen tahmini toplam kanser vakası sayısının kanser türlerine göre dağılımı (McGuire, 2016'dan uyarlanmıştır.).....	5
Şekil 2.3. DSÖ verilerine göre kadınlarda görülen tahmini toplam kanser vakası sayısının kanser türlerine göre dağılımı (McGuire, 2016'dan uyarlanmıştır.).....	5
Şekil 2.4. Kanserın ayırt edici özellikleri (Hanahan & Weinberg, 2011'den uyarlanmıştır.).....	7
Şekil 2.5. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (Shaikh ve ark., 2021'den uyarlanmıştır.).....	12
Şekil 2.6. Normal meme ve lobüler karsinoma oluştuğu meme ( <a href="https://smart.servier.com/">https://smart.servier.com/</a> uygulaması kullanılarak çizildi.) .....	13
Şekil 2.7. İlaç taşıyıcı sistemler (Greene ve ark., 2021'den uyarlanmıştır.) .....	21
Şekil 3.1. Poliadiptatların kimyasal reaksiyonlarının şematik gösterimi.....	40
Şekil 3.2. Polisüksinatların kimyasal reaksiyonlarının şematik gösterimi .....	41
Şekil 3.3. Polioksalatların kimyasal reaksiyonlarının şematik gösterimi .....	42
Şekil 3.4. mPEG-550-HMDI reaksiyonunun şematik gösterimi .....	44
Şekil 3.5. Poliadiptatların mPEG550-HMDI reaksiyonunun şematik gösterimi.....	45
Şekil 3.6. Grup sonu analiz yöntem prosedürü .....	46
Şekil 4.1. Esterifikasyon reaksiyon koşulları.....	54
Şekil 4.2. Sentez sonu oluşan polyesterlerin görüntüleri.....	54
Şekil 4.3. pEAd, pPAd, pBAd'a ait FTIR spektrası .....	56
Şekil 4.4. pESu, pPSu, pBSu ait FTIR spektrası .....	57
Şekil 4.5. pEOX, pPOX, pBOX ait FTIR spektrası.....	58
Şekil 4.6. PEGilasyon reaksiyonu.....	59
Şekil 4.7. mPEG-pEAd-mPEG, mPEG-pPAd-mPEG ve mPEG-pBAd-mPEG'e ait FTIR spektrası.....	60
Şekil 4.8. Nanopartiküllerin stabilite problemi.....	74
Şekil 4.9. Yüksek moleküler ağırlıklı pPAd görüntüsü B. Düşük moleküler ağırlıklı pPAd görüntüsü .....	75

Şekil 4.10. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile pBAD: PEI karışımından nanopartikül sentez şeması .....	79
Şekil 4.11. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin şematik gösterimi .....	82
Şekil 4.12. PEI kaplama yöntemi.....	86
Şekil 4.13. Nanopartikül için belirlenen nihai prosedürün şematik gösterimi.....	88
Şekil 4.14. PA, BA ve EA kopolimerlerinden elde edilen nanopartiküllerin boyut dağılımı ve zeta potansiyel grafikleri A: PANPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli, B: BANPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli, C: EANPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli .....	91
Şekil 4.15. Debio-0932 ile muamele edilmiş MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 24 ve 48 saatlerdeki IC50 logaritmik eğrileri .....	92
Şekil 4.16. DOX ile muamele edilmiş MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 48 ve 72 saatlerdeki IC50 logaritmik eğrileri.....	92
Şekil 4.17. Spektroflorometre cihazı .....	94
Şekil 4.18. İlaç yüklü ve ilaç yüklü olmayan nanotaşıyıcıların grafiksel tasarımı .....	99
Şekil 4.19. PA, BA ve EA kopolimerleri ile üretilen DOX HCl enkapsüle nanotaşıyıcıların boyut dağılım ve zeta potansiyel grafikleri. (A): PADNPs'nin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli; (B): BADNPs'nin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli; (C): EADNPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli .....	101
Şekil 4.20. PA, BA ve EA kopolimerleri ile üretilen ICG enkapsüle nanotaşıyıcıların boyut dağılım ve zeta potansiyel grafikleri. (A): PAINPs'nin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli; (B): BAINPs'nin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli; (C): EAINPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli .....	102
Şekil 4.21. (A): DOX yüklü nanotaşıyıcıların üretimi (B); DOX yüklü nanotaşıyıcıların UV ışık altında floresan ışımaya göstermesi (C); DOX, PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının FTIR spektrası.....	103
Şekil 4.22. MCF-7(10X) ve MDA-MB-231(4X) hücre hatlarının ters faz ışık mikroskop görüntüleri.....	104
Şekil 4.23. A: DOX HCl'in farklı konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24 s, 48 s ve 72 saat sonundaki % canlılıkları. B: ICG'nin farklı konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24 s, 48 s ve 72 saat sonundaki % canlılıkları. ....	105

Şekil 4.24. PANPs, BANPs ve EANPs nanotaşıyıcılarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 s, 48 s ve 72 s deki antiproliferatif etkilerine ait logaritmik grafikleri .....	108
Şekil 4.25. DOX HCl yüklü PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 s, 48 s ve 72 s deki antiproliferatif etkilerine ait logaritmik grafikleri .....	110
Şekil 4.26. ICG yüklü PAINPs, BAINPs ve EAINPs nanotaşıyıcılarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 s, 48 s ve 72 s deki antiproliferatif etkilerine ait logaritmik grafikleri .....	111
Şekil 4.27. IC50 değerinin zamana bağlı değişimi. A: İlaç yüklü olmayan nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki zamana bağlı IC50 değişimi. B: DOX HCl yüklü nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki zamana bağlı IC50 değişimi. ....	116
Şekil 4.28. İlaç yüklü olmayan nanotaşıyıcılar PANPs, BANPs ve EANPs ile DOX HCl yüklü PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 48 s antiproliferatif etkilerine ait logaritmik grafikleri .....	117
Şekil 4.29. 48 saat boyunca serbest DOX HCl ve DOX HCl yüklü NP'lerle muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin farklı konsantrasyondaki % hücre canlılıklarının değerlendirilmesi ( $p < 0.005$ ) .....	118
Şekil 4.30. Nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında hücre alımlarının floresan mikroskop ile değerlendirilmesi .....	120

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

**%:** Yüzde

**<:** Küçük

**µL:** Mikrolitre

**ng:** nanogram

**µg:** Mikrogram

**cm<sup>2</sup>:** santimetrekare

**°C:** Santigrat Derece

**mV:** milivolt

**DCM:** Diklorometan

**DLS:** “Dynamic Light Scattering”

**DMEM:** “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”

**DMF:** Dimetilformamid

**DMSO:** Dimetilsülfoksit

**DOX:** Dokсорubisin

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

**ER:** Östrojen reseptörü

**FBS:** Fetal sığır serumu (“Fetal Bovine Serum”)

**FDA:** Gıda ve İlaç İdaresi

**FTIR:** Fourier Transform Infrared Spektrofotometre

**IC50:** Kültürdeki canlı hücrelerin %50 sinin ölümüne neden olan madde konsantrasyonu

**ICG:** İndiyosyanin yeşili

**HER2:** İnsan epitelyal büyüme faktörü reseptörü

**MDR:** Çoklu ilaç direnci

**mPEG:** Tek uçtan monometil eter son guruplu poli(etilen glikol)

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolyum) bromür

**NLC:** Nanoyapılı lipid taşıyıcılar

**PEI:** Poli (etilen imin)

**PEG:** Poli (etilen glikol)

**PLGA:** Poli (laktik-ko-glikolik asit)

**PR:** Progesteron reseptörü

**PVA:** Poli (vinil alkol)

**SEM:** Taramalı Elektron Mikroskobu

**SLN:** Birinci nesil lipidik taşıyıcılar



## 1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2014 verilerine göre meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın 2018 raporuna göre, meme kanseri dünyada en sık görülen ikinci kanser (% 11.6) olarak rapor edilmiştir. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın 2015 verilerine göre, kadınlarda görülen ilk 10 kanser türü arasında meme kanseri birinci sırada yer almaktadır ve insidansı yüz binde 52.5 olarak rapor edilmiştir (Karabulutlu ve ark., 2019).

Meme kanseri, dünya genelinde kansere bağlı kadın ölümünün önde gelen nedeni olmaya devam etmekte ve yılda yaklaşık yarım milyondan fazla kadın meme kanserine yakalanmaktadır. Meme kanseri, tümörün reseptör durumuna, özellikle östrojen reseptörüne (ER), progesteron reseptörüne (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör-2'ye (HER2) bağlı olarak tedavi edilmektedir. Uyarlanmış terapiler, ER-pozitif hastalık için hormon terapileri (örneğin tamoksifen ve enzim aromataz inhibitörleri gibi) ve HER2-pozitif meme kanseri için Trastuzumab (Herceptin) gibi kemoterapi ilaçları bazı meme kanserlerinin tedavisinde önemli bir başarı sağlamıştır ancak bu terapilere karşı ilaç direnci oldukça yaygındır (Holen ve ark., 2017). HER-2'nin aşırı ekspresyonu meme kanseri tanılı olguların %30'unda saptanmaktadır. HER-2 aşırı ekspresyonu genellikle daha agresif tümör fenotipi, daha kötü prognoz, daha kısa sürede yeniden nüks etmesi (relaps) ile ilişkilidir.

HER2'nin aşırı ekspresyonun saptandığı metastatik meme kanseri, genelde Trastuzumab içeren kemoterapi yöntemi kullanılarak tedavi edilmektedir. Progresyonun gelişmesi durumunda ikinci basamak olarak tekrar Trastuzumab uygulanması ilaca karşı direncin gelişmesine neden olabilmektedir (Küçükzeybek ve ark., 2010). Meme kanserine yönelik kemoterapi, ışın tedavisi ve cerrahi rezeksiyon gibi geleneksel terapi yöntemleri, hasta ile uyumunun zayıf olması, kötü doku seçiciliği, ciddi toksisite ve ilaç direnci dahil olmak üzere büyük sınırlamalara sahip olması tek bir tip terapötik kanser tedavisine dayanan bu yöntemleri yetersiz kılmaktadır (Chengwei Zhang ve ark., 2017).

Terapötik etkiyi artırmak ve yan etkileri en aza indirmek için ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması umut verici bir strateji olarak kabul edilmektedir.

DOX, FDA onaylı kemoterapötik ajanlardan biridir ve etki mekanizmaları, DNA interlokasyonu ve serbest radikal oluşumunu başlatarak DNA sentezini baskılaması olarak bilinmektedir. DOX geniş bir neoplastik hastalık yelpazesinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, klinikte kullanılan DOX dozu, kemik iliği baskılanması, doza bağlı kardiyotoksikite, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve artan ilaç direnci gibi ciddi yan etkilere neden olmasından dolayı oldukça sınırlıdır (Chatterjee ve ark., 2010) Antitümör ilaçlarının sağlıklı dokularda oluşturduğu ağır yan etkilerin azaltılması ve tümör bölgesindeki ilaç etkinliğinin artırılarak ilaca karşı oluşan direncin önüne geçilebilmesi için farklı yaklaşımlarla çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler üretilmektedir. Genellikle biyouyumlu polimerlerden üretilen nano-taşıyıcıların, istenilen özelliklere göre modifiye edilebilmeleri, boyutlarından dolayı hem fagosite olmaktan kaçınmaları hem de tümör bölgesinde birikebilmeleri, PEG ile fonksiyonlandırma sayesinde kan dolaşımında stabil ve uzun süre kalmaları polimerik nanopartikülleri en çok araştırılan ilaç taşıyıcı sistemlerden biri haline getirmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, meme kanseri tedavisinde kullanılmaya yönelik yeni polimerik ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu sistemler, biyouyumlu ve biyobozunur olan poliadiptatların sentezlenmesi ve sentezlenen poliadiptatların mPEG-550 ile PEGilasyonu sonucu üretilen kopolimerler kullanılarak üretilmiştir. Hem hidrofilik hem hidrofobik özellik sergileyen bu kopolimerlerden polimerik nanopartikül üretimi, metot optimizasyonunu takiben üretilmiştir. PANPs, BANPs ve EANPs nanotaşıyıcılarına DOX yüklenmiş ve DOX yüklü nanotaşıyıcıların, PADNPs, BADNPs ve EADNPs, enkapsülasyon verimlilikleri hesaplanmıştır. Serbest-DOX, ilaç yüklü olmayan nanotaşıyıcılar (PANPs, BANPs ve EANPs) ve DOX yüklü nanotaşıyıcıların (PADNPs, BADNPs ve EADNPs) sitotoksikite analizleri meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerinde test edilmiştir.

PANPs, BANPs ve EANPs nanotaşıyıcılarına fototerapi ajanı ve aynı zamanda floresans boya olan ICG (indiyosiyanın yeşili) yüklenerek nanotaşıyıcıların meme kanseri hücre hatları tarafından hücrel alımları floresans mikroskop ile görüntülenmiştir.

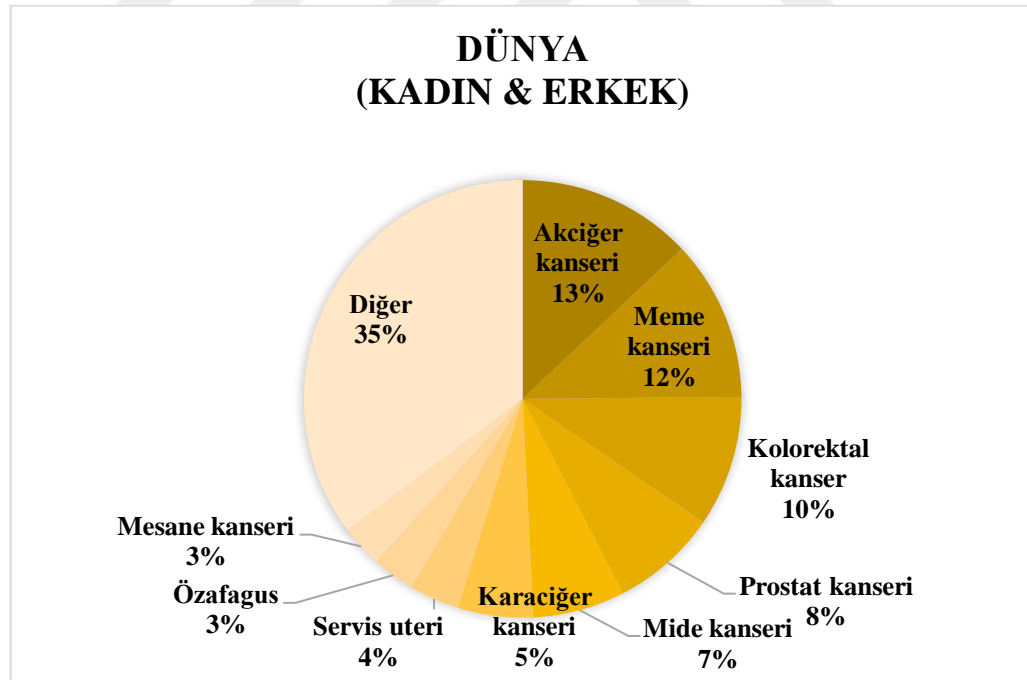
Sonuçlar olarak, bu tez kapsamında sentezlenen amfipatik kopolimerler kullanılarak üretilen nanopartiküllerin metot optimizasyonu yapılarak, meme kanseri tedavisinde kullanılacak nitelikte yeni nanotaşıyıcıların üretimi gerçekleştirilmiştir.



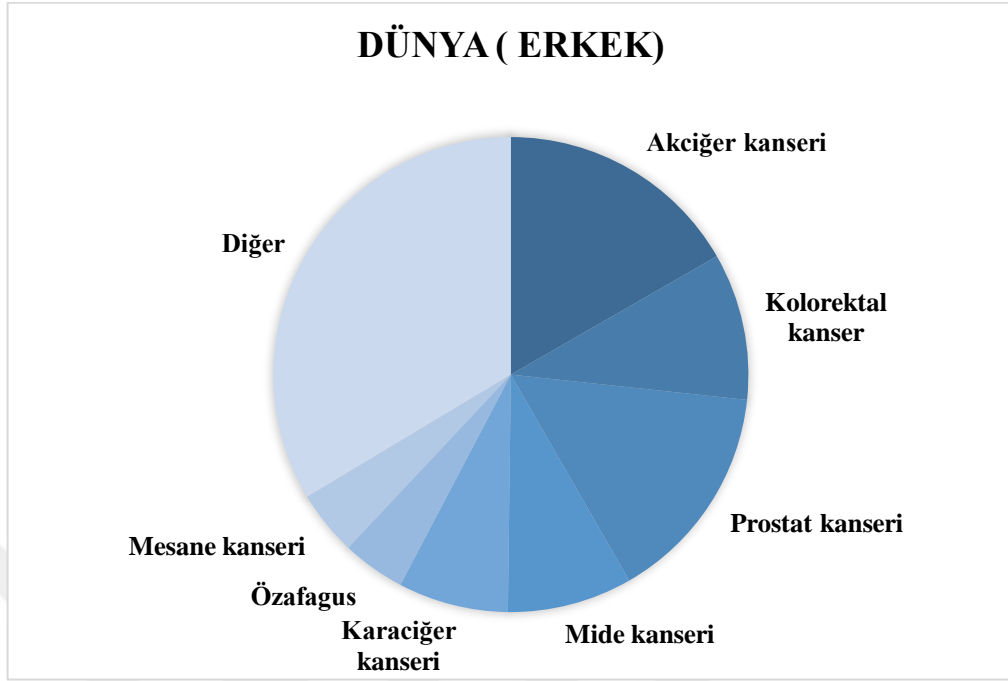
## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

### 2.1. Malign Tümör

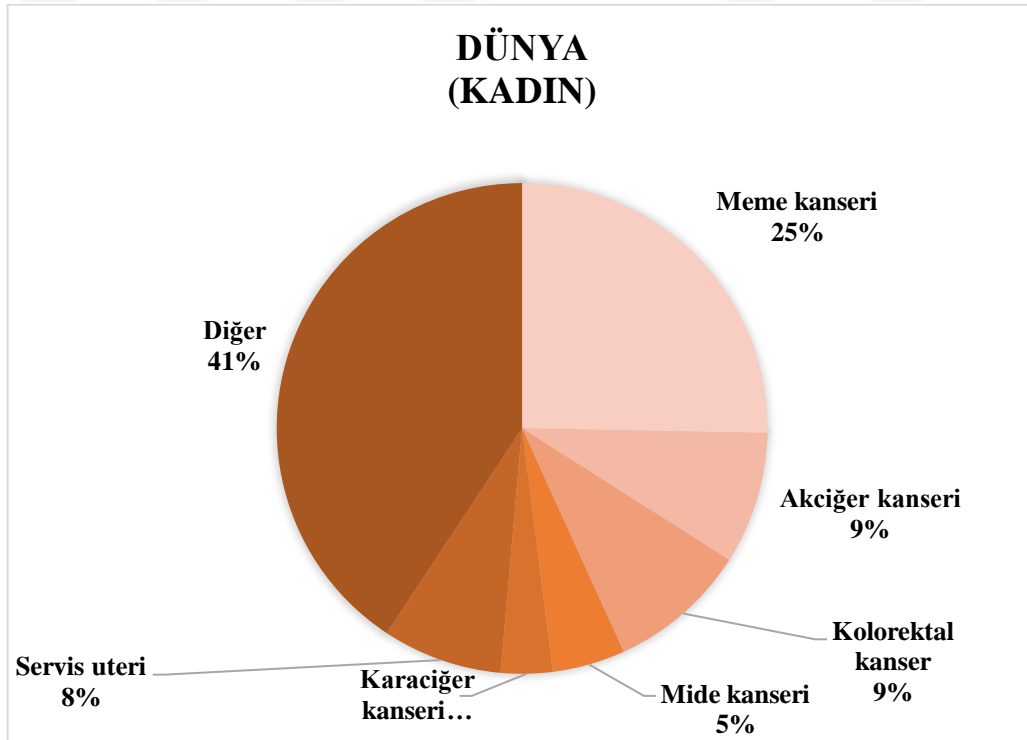
Malign tümör, en yaygın bilinen adıyla kanser, genetik ve çevresel koşulların etkisi altında malignant hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünüp çoğalması sonucu ortaya çıkan ve vücudun farklı bölgelerine yayılma veya vücudun farklı bölgelerini istila etme potansiyeline sahip karmaşık bir hastalıktır (Budak & Segmen, 2022). DSÖ, 2018 Dünya Kanser Raporu'nda, dünya çapında teşhis edilen 18 milyon yeni kanser vakası ve kanser kaynaklı ölüm vakalarının tahmini sayısı 10 milyon olarak bildirilmiştir. Kanser hastalarının sayısı her geçen gün artmaktadır ve 2040 yılı için öngörülen tahmini vaka sayısı dünya çapında 29-37 milyon olarak bildirilmiştir. Kanser tahmini küresel yıllık yeni vaka sayısı ve en önemli kanser türleri hem dünya genelinde hem de erkekler ve kadınlar için ayrı ayrı Şekil 2.1, Şekil 2.2 ve Şekil 2.3' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. DSÖ verilerine göre dünya genelinde toplam kanser vaka sayısının kanser türlerine göre dağılımı (McGuire, 2016'dan uyarlanmıştır.)



Şekil 2.2. DSÖ verilerine göre erkeklerde görülen tahmini toplam kanser vakası sayısının kanser türlerine göre dağılımı (McGuire, 2016'dan uyarlanmıştır.)



Şekil 2.3. DSÖ verilerine göre kadınlarda görülen tahmini toplam kanser vakası sayısının kanser türlerine göre dağılımı (McGuire, 2016'dan uyarlanmıştır.)

Her iki cinsiyette de en yaygın görülen beş kanser bölgesi, akciğer (toplamın %3.0'ı), meme (% 11.9), kolorektum (% 9.7), prostat (% 7.9) ve mide (% 6.8) olup bu beş kanser türü, genel küresel kanser yükünün yarısını oluşturmaktadır. Erkeklerde akciğer kanseri en yüksek insidans ve mortalite oranlarına sahip iken kadınlarda ise meme kanseri, diğer tüm kanser türlerinden çok daha yüksek bir insidans oranına sahiptir (DeSantis ve ark., 2016). Çocuklarda ise özellikle 1-14 yaş arasında, lösemi en yaygın görülen türdür (Hassanpour & Dehghani, 2017; Siegel ve ark., 2013). Genetik yapı, çevresel koşullar, yaşam tarzı, meslek grubu ve bazı biyolojik faktörler farklı kanser türlerinin oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Friedman ve ark., 2009; Verma, 2004).

Kanser, ilgili hücre veya doku tipine göre karsinoma (derideki neoplastik hücreler ve iç organların astarındaki dokularda meydana gelen kanser türü), sarkoma (kemik, kıkırdak, kan damarları ve kaslar gibi bağ dokularında meydana gelen kanser), lösemi (kemik iliğinde anormal kan hücrelerinin oluşumuna yol açan kanserli hücreler) ve lenfoma (bağışıklık hücrelerinin kanseri) olarak sınıflandırılabilir.

Tümörün büyümesi ve metastazından sorumlu on ayırt edici özellik:

- Sürekli çoğalma (proliferasyon) sinyali
- Büyüme karşıtı sinyallerden kaçınma
- Bağışıklık sistemi tarafından yok edilmekten kaçınma
- Sonsuz replikasyon potansiyeli
- İnflamasyon
- Metastaz ve invazyon
- Anjiyogenez
- Genetik mutasyon, stabil olmayan yapılar
- Apoptozdan kaçınma
- Hücre enerjilerinin de-regülasyonu olarak sırlanabilir (Şekil 2.4) (Hanahan & Weinberg, 2011; McNamara, 1923).



Şekil 2.4. Kanserın ayırt edici özellikleri (Hanahan & Weinberg, 2011'den uyarlanmıştır.)

### Sürekli çoğalma (proliferasyon sinyalizasyonu)

Normal hücreler, büyümeı teşvik eden sinyalleri düzenleyerek çoğalma homeostazını korumaktadırlar. Fakat kanserli hücrelerde bu sinyaller sürekli bir şekilde etkinleştirilmektedir ve böylece çoğalma ve çoğalma süreçleri uzun süre devam etmektedir (Caon ve ark., 2020). Van Roosbroeck, CDK4 ve CDK6 gibi siklin bağımlı kinaz (CDK) ailesinin protein kinazlarının hücre döngüsünü ve hücre proliferasyonunu G1 fazında kontrol ettiğini bildirmiştir. Kanser hücresinin genlerinde ve kinaz proteinlerinde meydana gelen anormal ekspresyonlar, CDK sinyal yolunun düzensizliğine yol açmaktadır (Caon ve ark., 2020). Benzer şekilde, mitojenezin bir parçası olduğu için sürekli proliferatif sinyalleşmeye yol açan PI3K-Akt-mTOR veya MAPK yolaklarının yeniden düzenlenmesi kanserleşmede önemli rol oynamaktadır (Caon ve ark., 2020).

### Büyüme karşıtı sinyallerin engellenmesi

Normal hücrelerde, büyüme karşıtı sinyaller olarak bilinen hücrenin büyümesini durduran bazı kontrol noktası sinyalleri bulunmaktadır.

Tümör hücrelerinde bu anti-büyüme sinyalleri duyarsız hale gelerek, tümör hücrelerinin sınırsız replikasyonu ile sonuçlanan büyüme mekanizmalarının kontrolünün kaybına yol açmaktadır ve bu durum tümörlerin inhibe edilememesine ve yaşlanmalarının önlenememesine sebep olmaktadır (Amin ve ark., 2015).

### İmmün sistemden kaçınma

İmmün gözetim teorisi, tüm hücrelerin ve dokuların, kanserli hücrelerin erken tespiti ile tümör oluşumunu ve yayılmasını engelleyen veya tümör oluşumuna dayanıklı olan bağışıklık sisteminin kontrolü altında çalıştığını öne sürmektedir (Caon ve ark., 2020). İmmün gözetim ve immüno-düzenleme teorisine göre, malign hücreler, immün hücreler tarafından tanınır ve elimine edilirler. Bununla birlikte, tümör hücrelerindeki niceliksel ve niteliksel değişiklikler, bir kanser-bağışıklık denge evresine ve ardından immün sistemden kaçış evresine yol açmaktadır (Nakamura & Smyth, 2020). Bu nedenle immün sistem hücreleri kanserli hücreleri tespit edemez ve böylece kanser hücreleri uzun süre immün sistemden kaçınarak hayatta kalırlar. Tümör hücreleri T-hücrelerinin fonksiyonunu bozarak, bağışıklık sistemini değiştirebilmesinin yansira bağışıklık baskılayıcı mediatörleri ve antijen tespitini modifiye etmektedir (Vinay ve ark., 2015). Kobayashi, reseptör tirozin kinazların, JAK-STAT yolağının, MAPK yolağının, Hippo, PI3K-AKT-mTOR yolağının ve Wnt bağışıklık yolağının, kanserli hücrelerde çoğunlukla bozulduğunu rapor etmiştir (Vinay ve ark., 2015).

### Apoptozdan kaçınma

Kanser, genlerdeki mutasyonlardan veya tek bir hücredeki epigenetik değişikliklerden kaynaklanabilmektedir fakat hücre çoğaldıkça daha fazla genetik/epigenetik değişiklik oluşma riski ile karşı karşıya kalmaktadır.

Hücre ölüm mekanizmaları kusurlu olan veya programlı hücre ölümünü engelleyen inhibitör seviyesi yüksek olan hücrelerin hayatta kalma şansı yüksektir (Emdad ve ark., 2020).

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak ifade edilmekte ve bir dokuda hücre sel homeostazı sürdürmek için sıklıkla gelişim ve yaşlanma evrelerinde meydana gelmektedir. Ek olarak apoptoz, DNA'sı hasara uğramış veya mutasyon geçirmiş hücrelerin çoğalmasını engelleyerek organizmanın korunmasını bir görev olarak üstlenmektedir. Kusurlu apoptoz programları ise kanserin gelişmesine ve invazyonuna önemli katkılarda bulunmaktadır. Kanser hücreleri, apoptoz indüksiyonundan kaçınma yeteneğini geliştirme eğilimindedir ve apoptozdan bu kaçınma, terapötik ajanlara karşı direnç kazanmakta önemli bir rol oynamaktadır (Cree, 2011). Doğal olarak apoptoz, içsel ve dışsal yolaklar, p53, BCL2, endoplazmik retikulum stresinin neden olduğu apoptotik yolaklar ve nekroptoz hücre ölüm yolu ile gerçekleştirilmektedir. Kanser, mikroRNA'nın ekspresyon modelini değiştirerek bu yolların düzensizleşmesine ve apoptozdan kaçınmaya neden olmaktadır (Fernald & Kurokawa, 2013; Shirjang ve ark., 2019).

### Doku invazyonu ve metastaz

Kanser hücreleri komşu hücreleri istila edebilmekte ve kan dolaşımı veya lenfatik sistem yoluyla dokuların yanı sıra diğer hücrelere de yayılabilmektedir. Doku istilas ve metastaz, bir dizi karmaşık biyolojik süreçten oluşmaktadır. İlk olarak, kanser hücreleri yakın konumdaki yerel komşularını ve stromayı terk etmekte; ardından, hücrenin dışında bulunan matrisin enzimatik olarak parçalanması ile birlikte belirli bir yönde hareket etmektedir. Daha sonra, sırasıyla, kan veya lenf damarlarının infiltrasyonu (penetrasyon) ve tümör embolisi (tümör hücrelerinin metastazın meydana geldiği yere ve büyüme faktörünün temininde kolaylık sağlayana kadar kan dolaşımında yaşaması) hedef bölgede kan damarı endoteline tutunma ve kan damarının ekstrasvazyonu ve yeni nişe adaptasyonun sağlanmasının yanı sıra self invazyon ve yayılma için yeni bir yer tedariki aşamaları gerçekleşmektedir (Nenclares & Harrington, 2020).

### Tümör anjiyogenezi

Kanserli hücrelerde veya kanserli bir bölgedeki kan damarlarının gelişmesine ve sayılarının artmasına tümör anjiyogenezi denir. Tümör hücreleri büyümek için vücudun kan kaynağını kullanmaktadır ve malign dönüşüme uğrayan vasküler hücre kümeleri olarak görünmektedirler. Büyüyen ve çoğalan kanser hücreleri, oksijen ve besinlerin alınmasını ve atık ürünlerin uzaklaştırılmasını sağlamak için yeni kan damarlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Kanser hücrelerinin hızlı çoğalması, glikojenoliz tarafından temsil edilen hipoksik bir ortam yaratmaktadır. Bu çevresel baskılar anjiyogeneizde değişikliklere neden olmakta ve tümöral çevrede vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)  $\alpha$  ve  $\beta$  ve tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) gibi anjiyogenezi destekleyen büyüme faktörleri salgılanmaktadır (Nenclares & Harrington, 2020).

Tümör kaynaklı büyüme faktörlerinin salgılanması, yakındaki kan damarlarından potansiyel endotel hücrelerini uyaran, geliştiren ve bunları kanser hücrelerine aktaran pro-anjiyogenik faktörler ile anti-anjiyogenik faktörler arasında bir dengesizlik oluşmasına yol açmaktadır (Roudsari & West, 2016).

### Replikasyon potansiyeli

Hayflick fenomenine göre, kanserli olmayan somatik hücreler, hücre büyümesinin tamamen durduğu G0 fazına girmeden önce sınırlı replikasyon yeteneğine sahiptir. Replikasyon meydana geldikçe, hücre yaşamını gösteren ve moleküler bir saat görevi gören telomerler zamanla git gide kısalırlar. Bununla birlikte, tümör hücrelerindeki telomeraz enzimi aşırı eksprese olarak telomer uzunluklarını korumaktadırlar. Böylece ölümsüz hale gelen tümör hücreleri sonsuz replikasyon yeteneği kazanırlar.

### Hücre enerjilerinin deregölasyonu

Hücrenel enerjinin deregölasyonu, kanserin ayırt edici özelliklerinden biridir. Malign tümör hücreleri, artan aerobik glikoliz gibi, tümör oluşumuna ve maligniteye katkıda bulunabilecek, temel olarak değiştirilmiş hücrenel enerjiler sergilemektedir. Malign dönüşümde daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulduğu için bu temel hücrenel sürecin sürekliliği kanserin bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Chunzhi Zhang ve ark., 2013). Proliferasyon için gerekli olan yüksek enerji miktarını karşılamak için kanser hücreleri, glikoliz, oksidatif fosforilasyon, amino asit, nükleotid, lipid sentezi, pentoz fosfat yolu, trikarboksilik asit döngüsü,  $\beta$ -oksidasyonu ve glutaminin bozulması yoluyla metabolik yolu yeniden programlamak üzere metabolizmayı koordine etmektedirler (Torresano ve ark., 2020). Kanser hücreleri, oksijen içeren koşullar altında meydana gelen Warburg etkisi aracılığıyla işlev görmektedir.

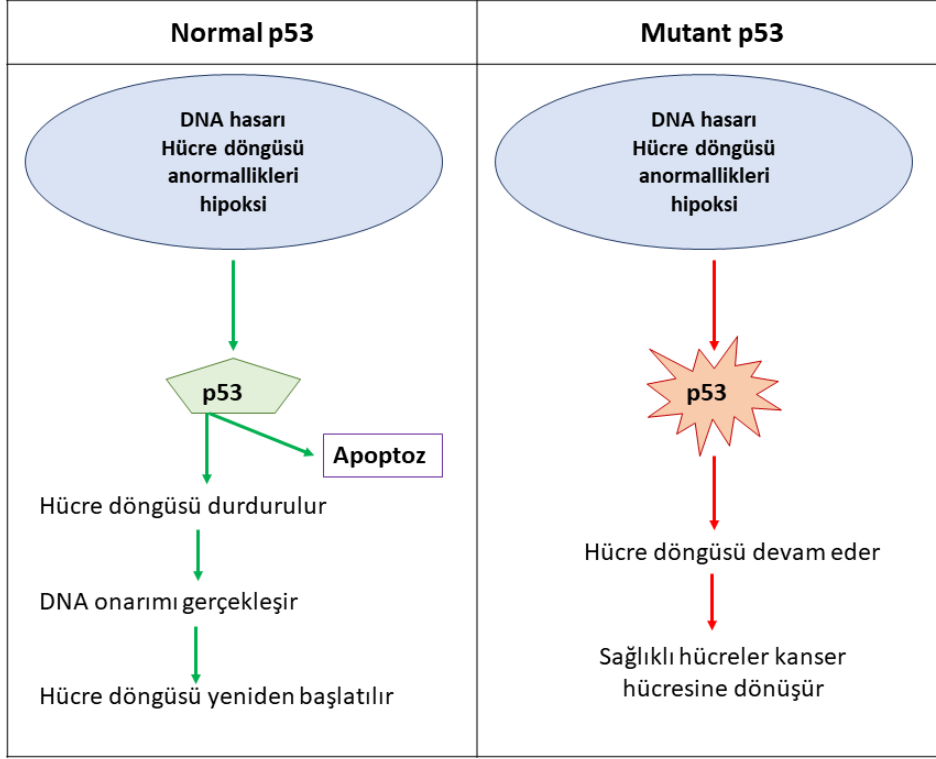
Kanser hücreleri, metabolizmalarını laktik asit üretmek için tercih edilen glikojenoliz kullanımına geçirme eğilimindedir. Bazı kanser hücrelerinde, hipoksik mikro çevre, nöroendokrin farklılaşmasını ve epitelyalden mezenkimal göçü uyarabilmekte ve ayrıca kanser kök hücrelerini indükleyebilmektedir. Bu süreçler, kanser hücrelerinin metastaz yapma eğiliminin artmasıyla ilişkilendirilmektedir (L. Li & Li, 2015; Nenclares & Harrington, 2020).

### Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler

Kanserde onkogenler aktif ve baskın gen grubu iken, tümör baskılayıcı genler (TSG'ler) inaktiftir ve kanser patogeneğinde fenotipik olarak çekiniktir. Onkogenlerin aktivasyonu aşağıda sıralandığı gibi üç farklı yolla gerçekleşmektedir (Nenclares & Harrington, 2020).

- DNA kodunun mutasyona uğraması
- Amplifikasyon işleminin fazlalığı, protein üretiminin artması

- Bir DNA segmentinin bir kromozom üzerinde yeni bir pozisyona transferi, biyolojik olarak oldukça aktif füzyon proteininin oluşumuna yol açması (Şekil 2.5)



Şekil 2.5 Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (Shaikh ve ark., 2021'den uyarlanmıştır.)

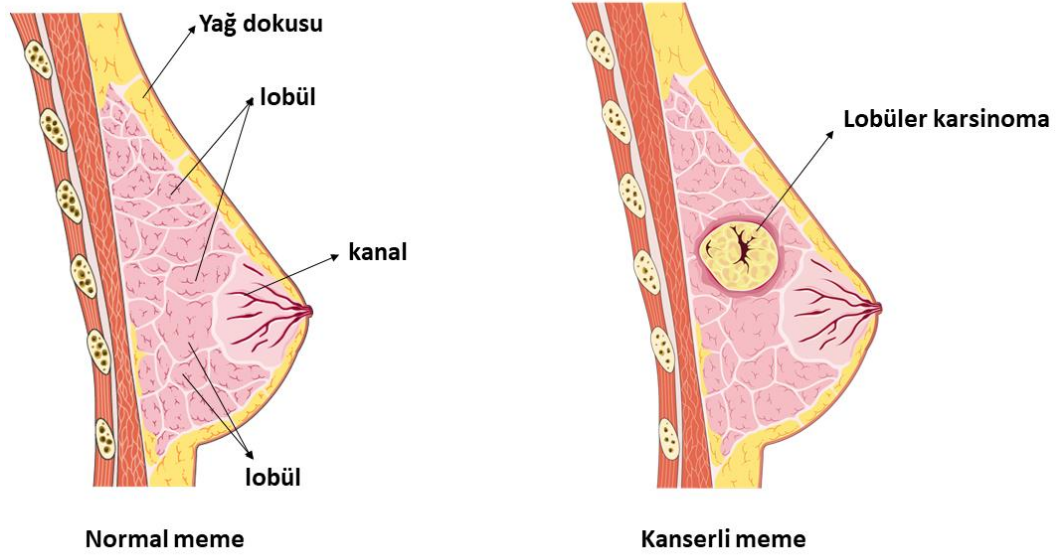
TSG'ler, hücre çoğalmasını önleyen ve apoptoz sürecine yardımcı olan hücresel genlerdir. Bu genler, birçok kanserin patogeneğinde inaktive edilerek anormal proliferasyona ve tümör hücrelerinin gelişmesine neden olmaktadır.

Retinoblastoma proteini (Rb), keşfedilen ilk TSG'dir ve baskılanması sarkoma, retinoblastom, meme, akciğer ve mesane kanserine yol açarken bir başka TSG olan p53; beyin, kolon, meme, karaciğer, yemek borusu ve akciğer kanserlerinin yanı sıra sarkoma, lösemi ve lenfoma ile ilişkilendirilmektedir (Levine ve ark., 2008).

## 2.2. Meme Kanseri

Malın tümör hücrelerinin gelişimiyle meydana gelen meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türüdür. Meme kanserlerinin gğu ya kanallarda ya da lobüllerde meydana gelmektedir. Hatta meme bölgesinin dışında kan damarları ya da lenf damarları yoluyla diğer vücut dokularına metastaz yapabilmektedirler (şekil 2.6). Meme kanseri, esas olarak lobüllerin ve kanalların i tabakasını tutan bir tür doku kanseridir (Sariego ve ark., 1995).

Patologlar meme kanserini, memenin etkilendiği bölgeyi (lobül veya kanal) baz alarak sınıflandırmaktadırlar. Meme kanseri türleri arasında duktal tür (papiller, medüller, müsin veya tübüler), tüm meme kanseri türlerinin %70-80'i oluştururken kalan yüzdeyi ise lobüler meme kanseri oluşturur (Chopra & Davies, 2020).



şekil 2.6. Normal meme ve lobüler karsinoma oluştuğu meme (<https://smart.servier.com/> uygulaması kullanılarak gzildi.)

Meme kanseri, yılda bir milyondan fazla yeni vaka ile kadınlar arasında yaygın bir malın neoplazm türü olup, 45-55 yaş arası kadınlarda kanserle ilişkili başlıca ölüm nedeni olduğu bilinmektedir.

Kadınlarda görülme sıklığı 1/8 olup genellikle cerrahi müdahale ile dokunun tamamen çıkarılması (rezeksiyon) veya kemoterapi, hormon terapisi, radyoterapi gibi terapötik yöntemlerle kanserli bölge tedavi edilmeye çalışılmaktadır (Ataollahi ve ark., 2015).

Meme kanserine yol açabilecek risk faktörleri üzerinde çalışılarak önlem alınabilmektedir. Bu risk faktörleri değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri olarak sınıflandırılmaktadır. Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında artan yaş, mutasyonlar, aile öyküsü, yoğun göğüsler, kişisel meme karsinomu veya kanserli olmayan meme ile ilişkili hastalık öyküsü ve dietilstilbestrol (yapay östrojen) kullanan kadınlar bulunmaktadır. Ailesinde güçlü meme kanseri öyküsü olan veya BRCA1 geninde ve BRCA2 geninde kalıtsal değişiklikler olan kişilerin meme kanserine maruz kalması muhtemel bir durumdur.

Aşırı kilolu veya obez olmak, fiziksel olarak aktif olmamak, hormon alımı, üreme faktörleri ve alkol-sigara tüketimi ise değiştirilebilir risk faktörleri arasında yer almaktadır (Nindrea ve ark., 2017). Sağlıklı kiloyu korumak, düzenli egzersiz yapmak, alkol ve sigaradan kaçınmak, hormon replasman tedavisi veya oral kontraseptif alırken veya mümkünse çocukları emzirirken dikkatli olmak bazı önleyici yaklaşımlardır (Kamińska ve ark., 2015). Bununla birlikte, meme kanseri bir kez ortaya çıktığında, onu yenmek için tedavi şarttır.

### **2.2.1. Meme kanseri türleri**

Meme kanseri, özellikleri ve içeriği bakımından çeşitlilik göstermektedir ve bu nedenle, hormonla (geniş anlamda), histolojik ve moleküler olarak sınıflandırılabilir.

### Histolojik olarak meme kanseri türleri

DSÖ tarafından meme kanseri histolojik bakımdan invaziv ve noninvaziv olarak sınıflandırılmaktadır. İnvaziv olmayan bir tip, lobüler-duktal karsinoma *in situ* (LCIS) veya duktal karsinoma *in situ* (DCIS) olabilmektedir. İnvaziv karsinoma ayrıca aşağıdaki alt sınıflara ayrılabilir (M Deshpande ve ark., 2017).

(a) İnvaziv duktal karsinoma (IDC): En yaygın meme karsinomu tipidir, DCIS varlığında veya yokluğunda stromal invazyon ile duktal malign proliferasyona sahiptir, değişken morfolojik duktal farklılaşma gösterir (Makki, 2015).

(b) Belirgin intraduktal bileşenli invaziv duktal karsinoma (IDCPIC): İnvaziv olandan en az dört kat daha büyük bir intraduktal bileşenle müttefik bir IDC'nin varlığı ile karakterizedir, meme kanserlerinin %5'ini temsil eder (Sabatier ve ark., 2016).

(c) İnvaziv lobüler karsinoma (ILC): Komşu dokuları istila eden ve kümeler halinde toplanmış monoton yuvarlak, küçük, disko hezif hücreler ile karakterize lobüler karsinomdur (Z. Chen ve ark., 2017).

(d) Papiller karsinoma: Papiller karsinom, yeni meme kanseri vakalarının yaklaşık %0.5'ini temsil eder, meme ucundan kanlı akıntı, anormal kitle, radyografide anormallikler, fibrovasküler çekirdekler etrafında hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, sınırlı bir kitle oluşumu ile tanılanır (S. K. Pal ve ark., 2010).

(e) Medüller karsinoma: Nadir (< %5) görülen, “medüller özellikli karsinomlar”dır (Limaiem & Mlika, 2021).

(f) Müsinöz karsinoma: Nadir görülen alt tip (%2), hücresellğe bağlı olarak saf veya karışık tip olabilir. Saf tipte, tümörün %90'ı sadece hücre dışı müsin üretirken, karışık tip ayrıca infiltrate edici bir duktal epitelyal bileşen içerir (Barkley ve ark., 2008).

(g) Tübüler karsinoma: Nadir (invaziv olanların %1-2'si) görülür ve lümen açık, stroma ile birlikte tübüler yapılardan oluşurlar (Nguyen & He, 2021).

- (h) Apokrin karsinoma: Karakteristik bir özelliği apokrin hücrelerinin varlığı olan bir başka nadir görülen alt tiptir (Vranic ve ark., 2017).
- (i) Sekretuar (juvenil) karsinoma: Bu alt tipin insidansı çok düşüktür (%0.015). Histolojik analiz, bol miktarda hücre dışı ve hücre içi salgı materyali gösterir (Joseph ve ark., 2017).
- (j) Adenoid kistik karsinoma: Belirli bir büyüme paterninde organize olmuş bir lümen ve bazaloid hücre popülasyonunun varlığı ile işaretlenen nadir görülen bir meme kanseri alt tipidir (Miyai ve ark., 2014).
- (k) Metaplazili karsinoma: Yıllık tanı alan hastaların %0,25-1'ini kapsar ve skuamöz tip, iğ benzeri, matris üreten, karsino-sarkoma, dev osteoklastik hücreli metaplastik olarak alt bölümlere ayrılabilir (D. R. Shah ve ark., 2012).
- (l) Meme ucu paget hastalığı: Bu alt tip, meme ucu derisinin ve meme ucunu çevreleyen daha koyu alanın her ikisinin de egzama benzeri hale geldiği nadir görülen türdür (Karakas, 2011).

#### Meme kanserinin moleküler sınıflandırması

Molekül seviyede inceleme, normal doku gelişimi ile kanser progresyonu arasındaki dikkate değer benzerlikleri anlamamızı sağlamaktadır. Normal hücre gelişimi karmaşık sinyal yolları tarafından kontrol altındadır fakat kanser hücreleri veya kanser kök hücreleri bunların çoğunu ya gasp etmektedir veya düzensiz hale getirmektedirler. Sırasıyla proto-onkogenleri aktive ederek veya tümör baskılayıcıları etkisiz hale getirerek, kritik negatif düzenleyicilerin hiperaktivasyonuna veya ortadan kaldırılmasına neden olabilmektedirler.

ER sinyali, HER2 sinyali ve kanonik Wnt sinyali, memenin normal glandüler gelişimini ve kök hücre fonksiyonlarını düzenleyen ana sinyal yollarıdır (Feng ve ark., 2018). Ancak kapsamlı anlamda meme kanseri ER+, PR+ ve HER2+ veya üçlü negatif (ER, PR ve HER2 yokluğu) tipte olabilmektedir (Ferrari ve ark., 2014). Tedavi yöntemi aynı zamanda meme kanserinin türüne de bağlıdır.

## 2.2.2. Meme kanseri tedavisi için onaylanmış/onaylanmamış ilaçlar

### FDA tarafından onaylanmış kemoterapötik ajanlar ve hormonal hedefli ilaçlar

Meme kanserini önlemeye yönelik ilaçlar arasında tamoksifen sitrat ve raloksifen hidroklorür bulunmaktadır. FDA tarafından meme kanseri tedavisi için onaylanan ilaçlar kapesitabin, doksetaksel, doksorubisin hidroklorür, epirubisin hidroklorür, siklofosamid, eribulin mesilat, paklitaksel, 5-florourasil, everolimus, fulvestrant, toremifen, gemsitabin hidroklorür, gokserebelin asetat, gosserebin asetat, metotreksat, vinblastin sülfat, tiotepa ve letrozol'dür.

Bazı spesifik ilaçlar arasında hormonal ilaçlar (tamoksifen sitrat (HR+ için) (Ferrari ve ark., 2014), anastrozol (HR+ için), eksemestan (ER + için)), lapatinib (HER2+ için) (Moy ve ark., 2007), olaparib (BRCA mutasyon taşıyıcıları için) (Caulfield ve ark., 2019), megestrol asetat (HR+ için) (Bines ve ark., 2014), neratinib maleat (HER2+ için), pamidronat disodyum (osteolitik kemik metastazlı meme kanseri) (Kotecki ve ark., 2019), talazoparib tosilat (gBRCAm için; HER2-) (Urbina-Jara ve ark., 2019), toremifen (HR+ için) (Vogel ve ark., 2014), ribociclib (HR+ için) (A. Shah ve ark., 2018) vb. bulunmaktadır.

### Monoklonal antikolar

Monoklonal antikolar, kendi antikolarımız gibi belirli hedefleri de tanıyabilen sentetik proteinlerdir (Kimiz-Gebologlu ve ark., 2018; Weiner ve ark., 2010). Meme kanserini tedavi etmeyi amaçlayan bilinen bazı FDA onaylı monoklonal antikolar şunlardır: Trastuzumab (HER2 + meme kanseri için), Pertuzumab (HER2+ meme kanseri için) (Sussell ve ark., 2022) , Atezolizumab (tümörlerin PD-L1'i eksprese ettiği yer) (Mavratzas ve ark., 2019).

### Diğer kemoterapötik ajan/fito bileşenler/ekstraktlar

Son zamanlarda, kurkumin (Atlan & Neman, 2019), quercetin (Kikuchi ve ark., 2019) ve resveratrol (Vinod ve ark., 2015) de meme kanserine karşı bir miktar potansiyel sergilemiştir. Bazı yaygın otlar veya bitki özleri (kurutulmuş *P. ginseng*, karayılan otu kökleri) (Shareef ve ark., 2016) ve çam iğnesi esansiyel yağının da meme kanserine karşı etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Ren ve ark., 2018).

### Meme kanserine karşı antikanser aktivite gösteren nanopartiküller

İlaç olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olan bazı nanopartiküller, fullerenler (Bianco & Da Ros, 2007), grafen oksit (Mahanta & Paul, 2015), altın nanopartiküller (S. Jain ve ark., 2012), gümüş nanopartiküller (Jeyaraj ve ark., 2013), selenyum nanopartiküller (Yazdi ve ark., 2012), platin nanopartiküller (Baskaran ve ark., 2017; Rokade ve ark., 2018), bakır oksit nanopartiküller (Ramaswamy ve ark., 2016), plasental dokudan kalsifiye edilmiş nanobakteriler, meme kanserine karşı belirli oranda bir aktivite göstermektedirler. Bununla birlikte, bu nanopartiküllerin klinik olarak uygulanabilirliklerinin halen tartışılıyor olması önemli bir dezavantajı da beraberinde getirmektedir.

### Gen terapisi ürünleri

Bir gen terapisi ürünü, *in vivo* yöntemle veya *ex vivo* yöntemle uygulanabilen temel olarak profilaktik, tanısal veya terapötik olabilen nükleik asidin bir parçasıdır. (McCrudden & McCarthy, 2014). RNA interferansına dayalı gen tedavisi (özellikle kısa enterferans yapan RNA'lar (siRNA'lar)) en büyük ilgiyi görmüştür.

Bununla birlikte, modifiye edilmemiş siRNA'nın intravasküler instabilite, RNase A tipi nükleaza duyarlılık, hızlı renal klirens, kısa yarı ömür ve potansiyel toksisiteler gibi sınırlamaları bulunmaktadır (Ngamcherdtrakul & Yantasee, 2019).

### **2.3. Geleneksel Taşıyıcı Sistemler**

Meme kanseri tedavisinde ilaç taşımaya yönelik geleneksel yaklaşımlar halen en çok tercih edilenlerdir. Çoğu meme kanseri terapötikleri intravasküler yol (bolus veya infüzyon) ile verilmektedir (Barzaman ve ark., 2020). Bazı ilaçlar ise örneğin hormonal: eksemestan (Barzaman ve ark., 2020), tamoksifen (Adam ve ark., 1980), letrozol (Badawy ve ark., 2008; Rugo ve ark., 2019), anastrozol (Badawy ve ark., 2008; Cuzick ve ark., 2020), megestrol asetat (Ibrahim ve ark., 2019) tablet şeklinde oral yol ile kullanılmaktadır. Palbociclib (Laderian & Fojo, 2017) ve talazoparib (Hoy, 2018) kapsül olarak mevcuttur.

Günümüzde tabletler, kapsüller de dahil olmak üzere geleneksel dağıtım sistemleri, kontrollü bir ilaç dağıtım sisteminden etkilenmekte ve böylece farmasötik maddelerin salımını değiştirerek ve farmakolojik eylemleri yeniden planlayarak hastalara terapötik avantajlar sağlamaktadır (Ashique ve ark., 2021).

### **2.4. Meme Kanseri Gelişmiş İlaç Taşıyıcı Sistemler**

Geleneksel ilaç taşıyıcı sistem yoluyla antikanser ilaçların verilmesi, olumsuz veya istenmeyen yan etkiler, düşük terapötik indeksler, zayıf biyoyararlanım, yüksek doz gereksinimleri, çoklu ilaç direnci (MDR: multi drug resistance) gelişimi ve spesifik olmayan hedefleme gibi bazı temel dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle meme kanserine karşı bir formülasyon geliştirmenin temel amacı, bu sorunları doğru bir şekilde ele almak ve ilacı istenen bölgelere taşımak, ayrıca olumsuz yan etkileri azaltmaktır (Senapati ve ark., 2018b). Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturduğu bu sınırlamaların üstesinden gelmek için gelişmiş ilaç taşıyıcı sistemler tanımlanmıştır (Bhagwat & Vaidhya, 2013).

## **2.5. Meme Kanseri Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar**

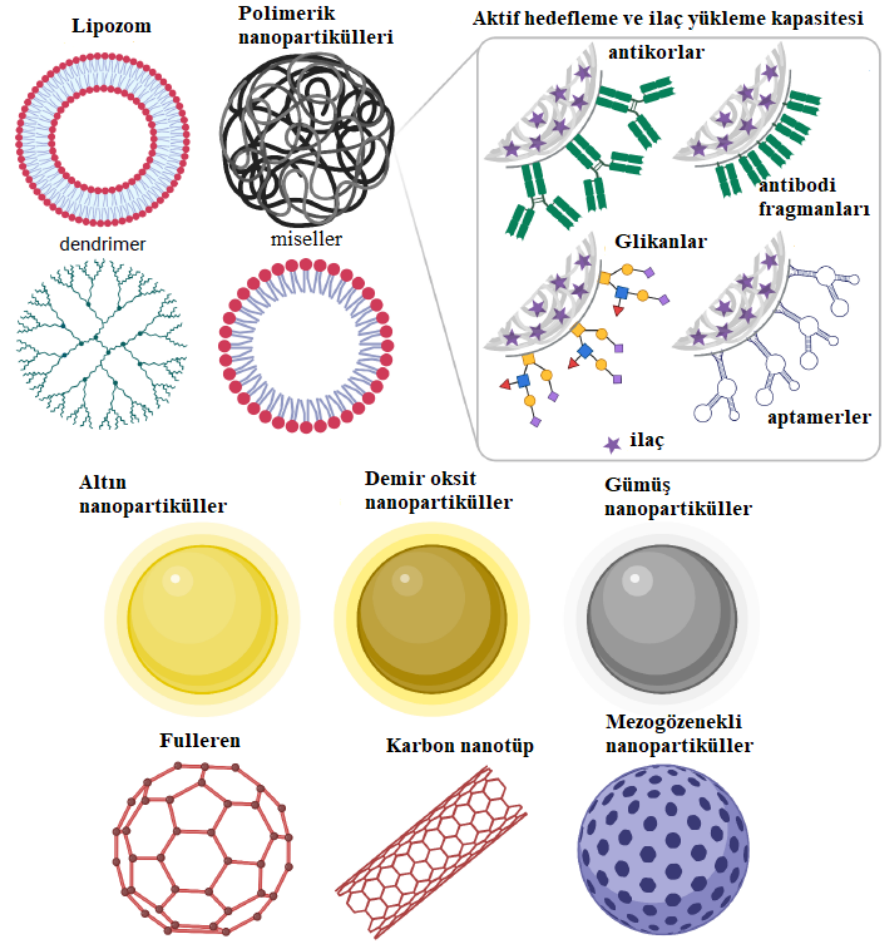
Nanoteknoloji, meme kanseri tedavisinde kullanılan terapötiklerin geleneksel temelli ilaç taşıyıcı sistemlerle vücuda yetersiz dağılımı, bu terapötiklerin oluşturduğu yan etkiler ve bu ilaçlara karşı direncin gelişmeye başlaması, hasta popülasyonundaki biyolojik çeşitlilik ve çoklu hastalık durumu gibi handikaplarına makul çözümler sunmaktadır (Tanaka ve ark., 2009).

Tümör hücreleri sınırsız replikasyon özelliği ile hızla çoğalmaları ve anjiyogenez özellikleri ile düzensiz vaskülarizasyon oluşturmaları karmaşık bir tümör yapısını ortaya koymaktadır fakat bu karmaşık damarlı sistemden nanopartiküllerin geçip gitmesi gerekirken kan akışının yavaş olması ve kötü oluşturulmuş lenfatikler, nanopartiküllerin tümör bölgesinde birikmesine neden olabilmektedir.

Nanopartiküllerin tümör bölgesinde birikmesi, nanoteknolojinin pasif hedefleme stratejisini oluşturmaktadır. Tümör hücrelerinin artan bir şekilde ihtiyaç duyduğu bir molekül veya bir ligand ile nanopartikül yüzeyi modifiye edilerek tümör bölgesine ulaşabilmesi aktif hedefleme stratejisini oluşturmaktadır (Marta ve ark., 2016).

## **2.6. Meme Kanserinde Nano Bazlı Gelişmiş İlaç Taşıyıcı Sistemler**

Klinik öncesi araştırmalarda denenen birçok nanotaşıyıcı sistem umut verici sonuçlar bildirilmiş hatta bazı ilaç yüklü nanotaşıyıcılar klinik düzeyde test edilmiş ve gelecek vaat eden sonuçlar ortaya konulmuştur. Bu nanotaşıyıcılar, polimer, protein, polisakkarit, lipit veya inorganik malzemeler gibi çeşitli malzemeler kullanılarak üretilmektedirler. Malzeme seçimi, üretilmek istenen nanopartikülün boyutu, biyoyumluluğu, biyobozunurluğu, toksisitesi, yüzey özellikleri, çözünürlüğü, yüklenecek ilacın fiziksel ve kimyasal özellikleri, ilaç salım davranışı, yüzey yükü ve geçirgenlik gibi bir takım karakteristik özelliklerine bağlıdır (Vega-Vásquez ve ark., 2020). İlaç taşıyıcı sistemlerden bazıları Şekil 2.7 resmedildiği gibidir.



Şekil 2.7. İlaç taşıyıcı sistemler (Greene ve ark., 2021'den uyarlanmıştır.)

### 2.6.1. Veziküler ilaç taşıyıcı sistemler

Veziküler ilaç taşıyıcı sistemler, veziküler bir yapının bir ilacı enkapsüle ettiği sistemlerdir (Sailaja ve ark., 2010). Çok çeşitli veziküler ilaç taşıyıcı sistem bulunmasına rağmen, meme kanserinde araştırılan sınırlı sayıda tür vardır.

#### Lipozomlar

Lipozomlar, doğal toksik olmayan fosfolipidler ve kolesterol kullanılarak kolaylıkla üretilen yapay küresel veziküllerdir (Akbarzadeh ve ark., 2013). Boyutları 25 nm ila 2,5 µm arasında değişebilen ve tabakalarına göre tek katmanlı, çok katmanlı veya oligo katmanlı olarak sınıflandırılabilirler (Olusanya ve ark., 2018).

Lipozomlarda çift katmanlı fosfolipid tabakası, kapsüllenmiş aktif ilaç formunun tümör dokusuna ulaşmadan parçalanmasını önlemekle birlikte sağlıklı hassas dokunun ilaca maruziyetinin en aza indirilmesi sağlanabilmektedir (Brown & Khan, 2012). Geleneksel lipozomlar, *in vivo* ilaç toksisitesini azaltmasına rağmen, kan dolaşımından hızlı eliminasyon eğilimlidirler, bu durum lipozomların terapötik etkinliğini sınırlandırmaktadır. Lipozomların stabilitesini iyileştirmek ve kandaki dolaşım sürelerini uzatmak için sterik olarak stabilize edilmiş lipozomlar üretilmekte ve hem stabilize hem de kandaki dolaşım süresini artırılmasında polietilen glikol (PEG) genellikle en uygun seçim olarak ortaya çıkmaktadır (Sercombe ve ark., 2015).

Meme kanseri ilaçlarının geliştirilmesinde Doxil, Myocet, ThermoDox gibi doksorubisin lipozomları klinik düzeyde varlıklarını hissettirmiştir (Bulbake ve ark., 2017). Doxil, kolesterol içeren PEGilenmiş bir lipozomken, Myocet kolesterol içeren 150-250 nm boyutunda PEGilenmemiş bir lipozomdur. Mononükleer fagosit sistemi, lipozomları büyük boyutları nedeniyle kolayca tanır ve böylece normal dokularda maruziyet oluşturmalarını önler (Bulbake ve ark., 2017; Kanter ve ark., 1993). Bir çalışmada, metastatik meme kanseri hastalarında Myocet kullanımının kardiyak yan etkilerin/olayların oluşumunu önemli ölçüde azalttığı ortaya konulmuştur (Bulbake ve ark., 2017; Harris ve ark., 2002)

### Niozomlar

Niozomlar, esas olarak iyonik olmayan sürfaktanların ve aynı zamanda sulu bir fazda dağılmış kolesterolün kendi kendine birleşmesini kapsayan iki katmanlı bir yapıdır (Harris ve ark., 2002). Yüzey aktif maddeler kolay türevlendirilebilen çok yönlü yapıları nedeniyle lipozomlardan daha gelişmiş kimyasal yapı ve daha iyi depolama özelliklerine sahiptir (Y.-Q. Xu ve ark., 2016). Tamoksifen sitrat yüklü niozomlar, Span 60: kolesterol oranı 1:1 kullanılarak formüle edilmiş ve bu niozomlar MCF-7 hücrelerinde hücresel alımda 2.8 kat artış sağlamışlardır. *In vivo* şartlarda serbest tamoksifen sitrata kıyasla tümör hacminde azalma tespit edilmiştir (Shaker ve ark., 2015).

### Fitozomlar

Fitozomlar, fosfolipidin yanı sıra çekirdek yapıları olarak biyoaktif bileşiklere sahip olmaları bakımından benzersizdir. Terpenoidler, flavonoidler ve tanenler veya bitki özü gibi fito-bileşenlerin polar olmayan bir çözücü içinde fosfolipidlerin konjugasyonu ile oluşturulmaktadır (Babazadeh ve ark., 2018). Fitozomal kurkumin, AMP-aktive protein kinazın yapısını bozarak E-cadherin pertürbasyonu yoluyla MCF-7 istilasını azalttı ve tümör büyümesini *in vivo* inhibe etmiştir (Hashemzahi ve ark., 2018). Luteolin nano-fitozomları, MDA-MB 231 meme kanseri hücrelerinde biyoyararlanımı ve luteolin'in pasif hedeflemesini iyileştirmiştir. Doksorubisin ile birlikte kullanıldığında ise hücre ölüm oranında bir artış gözlenmiştir (Sabzichi ve ark., 2014).

### Eksozomlar

Eksozomlar, hücre dışı veziküllerin önemli bir sınıfı olup meme kanserinin ilerlemesinde önemli bir role sahip olmalarına rağmen, meme kanseri tedavisi için ilaç taşıyıcı sistem olarak da bir rolleri olabileceği düşünülmüştür (Mughees ve ark., 2020). Eksozomlar, küçük molekülü ilaçların veya genlerin taşınması için ilaç yüklü nanotaşıyıcılar olarak kullanılabilirlikleri araştırılmaya başlanmıştır. Eksozomlar, hedeflenen hücre zarına bağlanarak açılmakta ve yüklerini alıcı hücreye ileterek birçok işleme aracılık etmektedirler (Bunggulawa ve ark., 2018). Bununla birlikte, eksozom alımı daha fazla araştırılmaya ihtiyaç duymaktadır. Bir taşıyıcı olarak eksozomlar, miRNA'yı (Let-7a miRNA, miR-379), diğer Ra'yı (Cas9 mRNA), proteinleri (MHC-I/peptid kompleksleri) ve meme kanseri tedavisi için doksorubisin gibi diğer kemoterapötikleri iletmek için hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalarda kullanılmıştır (Zhao ve ark., 2020). Pullan ve ark. insan meme kanseri hücrelerine karşı hedeflenmiş bir ilaç taşıyıcı sistem olarak farenin olgunlaşmamış dentritik hücrelerinden (imDC'ler) izole edilen eksozomlarına doksorubisin yüklemişlerdir. Doksorubisin yüklü eksozomlar, memedeki tümör hücrelerinin büyümesini engellemiş ve farelerde toksik bir etki oluşturmamıştır. Bununla birlikte spesifik RGD peptitleri ile modifiye edilmesi, hedefleme yeteneği kazanmasını sağlamıştır (Pullan ve ark., 2019).

## Polimerzomlar

Polimerzomlar, hidrofobik bir katman ve sulu bir çekirdek oluşturan güçlü fiziksel etkileşimler nedeniyle suda bir arada tutulan amfifilik blok veya üç bloklu kopolimerlerden oluşan küresel nano-veziküler sistemlerdir. Yüklenecek ajana, ajanın hedeflendiği bölgeye ve ortam şartlarına pH, sıcaklık, ışık, enzimler veya herhangi bir uyarana, uyum sağlayacak şekilde tasarlanabilmektedirler (J. S. Lee & Feijen, 2012; Onaca ve ark., 2009; A. K. Sharma ve ark., 2020). Lipozomlardan daha stabildirler ve meme kanseri hedeflemesinin tedavisinde etkili bir şekilde kullanılabilirler (B. Yang ve ark., 2021). Bir çalışmada, meme kanserine karşı doksorubisin yüklü polimerzomlar kullanılmıştır (Upadhyay ve ark., 2010). Başka bir çalışmada, doksorubisin yüklü redoks duyarlı polimerzomlar, serbest form doksorubisin ile gösterilen %42' nin aksine yaklaşık %85 tümör gerilemesi sağlamıştır (A. Kumar ve ark., 2015).

## **2.6.2. Nanopartiküler sistemler**

### Polimerik nanopartiküller

Meme kanserinde yaygın olarak araştırılan polimerik nanopartiküller, FDA (Food and Drug Administration) onaylı biyoyumlu olan ve genelde PLGA (Poly(L-lactide-co-glycolide) polimeri kullanılarak çeşitli yöntemlerle sentezlenen nanopartiküllerdir. PLGA nanopartikülleri, kendi başlarına orta düzeyde MDR'yi tersine çevirme etkisine sahiptir ve biyolojik olarak parçalanabilir yani biyobozunur özellikteki nanopartiküllerdir. Katiyar ve ark. rapamisin ve piperin beraber yüklendiği PLGA nanopartiküllerini meme kanseri tedavisinde kullanmışlar ve bunun umut verici bir yaklaşım olduğunu bildirmişlerdir (Katiyar ve ark., 2016). PLGA dışında polimerik nanopartikül üretiminde yaygın olarak tercih edilen diğer biyoyumlu polimer ise kitosan (Esfandiarpour-Boroujeni ve ark., 2017; Z. Liu ve ark., 2013; Vivek ve ark., 2013) ve polikaprolaktondur (PCL) ve biyoyumlu polimerlerin genellikle birlikte kullanıldığı polietilenglikol (PEG) sayılabilmektedir (Danafar ve ark., 2017; Shenoy & Amiji, 2005). Ek olarak literatürde polimerik nanopartiküllerin üretildiği çok sayıda biyoyumlu polimerler bulunmaktadır.

Polimerik nanopatiküller genellikle katı formda olanlar nanoküreler ve içi boş olanlar ise nanokapsüller olarak sınıflandırılmaktadır (A. K. Singh, 2016). Nanoküreler ve nanokapsüller, farklı yapı ve morfolojiye sahiptirler. Nanokürelerin kapalı paketlenmiş matris sistemleri varken, nanokapsüller, ilacın bir nanokabuk tarafından çevrelenen iç çekirdekle birleştiği çekirdek-kabuk yapılarıdır (Baghaban-Eslaminejad ve ark., 2017). Polimerzomlar, spesifik nanokapsül türlerinden biridir (Zhu ve ark., 2014). Mevcut eğilime göre, nanopatiküller genellikle istenen hedeflemeyi elde etmek için işlevselleştirilir. Meme kanserine karşı olumlu sonuçlar gösteren, kalsiferol yüklü nanokapsüller, (Nicolas ve ark., 2018) siRNA iletimi için mezogözenekli polimerik nanoküreler (Wu ve ark., 2019) gibi birçok örnek literatürde mevcuttur.

#### Protein nanopatiküller

Paklitaxelin protein bazlı nanoparçacığı Abraksan sentezi, klinik düzeyde meme kanseri araştırmaları için bir umut ışığı olmuştur (Miele ve ark., 2009). İnsan serum albümini (HSA (66.5 kDa)) insan serumunda çok bol bulunan bir serum proteindir ve çeşitli maddelerin sistemik dolaşım boyunca taşınmasını kolaylaştıran çok yönlü bir taşıyıcıdır. Albümine ilaç bağlanması, ilacın biyolojik dağılımını, biyoaktivitesini ve metabolizmasını etkileyebilmektedir (J. E. Lee ve ark., 2018). Albümin nanoparçacıkları üzerine araştırmalar halen devam etmektedir. Lee ve ark. paklitaxeli, kimyasal çapraz bağlama veya yüksek basınç/kesme uygulaması kullanılmadan sadece film dökümü ve yeniden hidrasyon yöntemi kullanılarak HSA-PEG nanoparçacıkları ile birleştirmişlerdir. HSA-PEG nanoparçacıklarının (280 nm), çeşitli meme kanseri hücre hatlarında Abraksana eşdeğer veya ondan daha iyi sitotoksik etki sergilemiştir. SK-BR-3 (insan meme adenokarsinom hücre hattı) ksenograft fare modelindeki sistemik uygulamada daha fazla tümör içi birikim ve 96 saatten daha uzun sistemik bir sirkülasyon sergilemiştir (J. E. Lee ve ark., 2018).

Meme kanseri araştırmalarında bazı olumlu sonuçlar gösteren diğer protein nanoparçacık örnekleri şunlardır: siklofosfamid taşıyan %7 gliadin nanoparçacıkları (Gulfam ve ark., 2012), doksorubisin taşıyan tütün mozaik virüsü protein nanoparçacıkları (Bruckman ve ark., 2016), likopen taşıyan peynir altı suyu protein izolatu protein nanoparçacıkları (A. Jain ve ark., 2018), resveratrol ve eksemestan oral taşınımı için kabuk çapraz bağlı zein nanokapsülleri, (Elzoghby ve ark., 2017) vb.

#### Katı lipid nanoparçacıkları ve nanoyapılı lipid taşıyıcılar

Katı lipid nanoparçacıkları (SLN; birinci nesil lipidik taşıyıcılar) meme kanserine karşı umut verici bir yaklaşımdır. Yapılan bir çalışmada mitoksantron yüklü SLN'lerin lenf nodu metastazlarını iyileştirdiği rapor edilmiştir (Lu ve ark., 2006). SLN'ler ayrıca, adriamisin (Kang ve ark., 2010) ve tamoksifen (Guney Eskiler ve ark., 2018) dirençli meme kanserine karşı ilaç direncini tersine çevirerek üstesinden gelebilmektedir. Bununla birlikte, SLN'lerin enkapsülasyon verimliliklerin düşük olması ve ilaç atımı gibi dezavantajlarının üstesinden gelmek için ikinci nesil lipidik nanotaşıyıcılar, yani nanoyapılı lipid taşıyıcılar (NLC'ler) geliştirilmiştir (Sun ve ark., 2014). NLC'ler meme kanserine karşı antimetastatik ve fototermal olmak üzere çift işlevli hale getirilebilir (H. Li ve ark., 2017). NCL'lerin adriamisine dirençli meme kanserine karşı da etkili oldukları kanıtlanmıştır (X.-G. Zhang ve ark., 2008). NLC'ler ayrıca meme kanserine karşı sitotoksik etki gösteren yağlar (örneğin Perilla yağı) için de iyi bir taşıyıcıdır (K. Kumar ve ark., 2018; Chandra B Tripathi ve ark., 2020).

#### **2.6.3. Miseller**

Polimerik miseller temel olarak sulu bir ortamda hidrofobik ve hidrofilik bloklar içeren amfilik blok kopolimerlerden oluşmaktadır. PEG en yaygın olarak kullanılan hidrofilik bloktur. Hidrofobik blokların çok yönlü seçimi, polimerik misellerin öngörülen özelliklerde olmasını sağlamaktadır (Cho ve ark., 2015).

Genexol-PM, paklitaksel yüklü kremofor EL içermeyen PEG-b- poli(d,l-laktik asit) polimerik miseller (yanıt oranı %45.3-%72.3) metastatik meme kanseri hastalarında geleneksel kremofor EL bazlı paklitakselden (yanıt oranı %21-54) daha olumlu etki sergilemiştir (Cho ve ark., 2015; K. S. Lee ve ark., 2008). Amfifilik polimer Pluronic F127 bazlı polimerik miseller, Zileuton yüklü bir iç çekirdeğe sahiptir ve tümör bölgesinde biriktiği bildirilmekle birlikte karaciğer ve dalakta da bu birikim gözlenmiştir (Gener ve ark., 2020). Bir diğer çalışma, alendronat ile modifiye edilmiş dosetaksel yüklü miseller, kemik metastazı olan meme kanserine karşı önemli veriler ortaya koymuştur (T. Liu ve ark., 2019).

#### **2.6.4. Dendrimerler**

Bu yüksek oranda dallanmış polimerik makromoleküller (Palmerston Mendes ve ark., 2017), doksorubisinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitesini önemli ölçüde geliştirmiştir. EBP-1 ve TAT peptitleri ile dendrimer modifikasyonunun EGFR'ye karşı avantajlı olduğu ve beraber fonksiyonel faydalar sağladıkları kanıtlanmıştır (C. Liu ve ark., 2019). Dendrimerler yapıları nedeniyle, dendrimer-ilaç konjugatı oluşturacak şekilde kimyasal modifikasyonları mümkündür (Castro ve ark., 2018). Kurkumin-dendrimer konjugatının, SK-BR-3 ve BT-549 meme kanseri hücrelerinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Debnath ve ark., 2013). Poliamidoamid dendrimerin sisplatin ve doksorubisin ile birlikte oluşturduğu konjugat ise nispeten düşük konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde bir etki oluşturmuştur (Guo ve ark., 2019).

#### **2.6.5. Nanoemülsiyonlar**

Nanoemülsiyonlar, nano boyut aralığına sahip emülsiyonlardır ve Y/S (su içinde yağ) emülsiyon en çok tercih edilen nanoemülsiyon çeşididir. Meme kanserine karşı antikanser aktivite sergileyen yağlar, örneğin nane yağı gibi, nanoemülsiyonlar aracılığıyla kolaylıkla taşınabilmektedir (Periasamy ve ark., 2016). Mikroemülsiyonlar da nano boyuttadır ancak termodinamik stabilite sergilemektedirler (Anton & Vandamme, 2011).

Lipofilik ilaçlar, nanoemülsiyon olarak da taşınabilmektedirler. Tripathi ve ark.  $\alpha$ -linolenik asit nanoemülsiyonu geliştirmiş ve doksorubisinin daha iyi aktivitesi için folik asit ile işlevsel hale getirmiştir (Chandra Bhushan Tripathi ve ark., 2018).

#### **2.6.6. Nanofiberler**

Nano/mikro liflerin geniş yüzey alanı ve ince gözenekli yapısı, ilaçların bu nano liflere kolaylıkla entegre olmasını sağlamaktadır. Elektro-eğirme parametrelerinin ardından boyut ayarlaması ve nanolif morfolojisinin değiştirilmesi, nanoliflerden kontrollü bir ilaç salım modeli elde etmeye yardımcı olabilmektedir (Banihashem ve ark., 2020). Kurkumin ve krisin yüklü PLGA/PEG elektro-eğirme nanolifleri, mükemmel sinerjistik antiproliferatif aktivite ve T-47D meme kanseri hücrelerine karşı mükemmel inhibitör etki sergilemişler ve meme kanserinin bölgesel nüksünü azaltmada da aynı etkiyi sürdürmüşlerdir (Banihashem ve ark., 2020).

#### **2.6.7. Çok katmanlı nanoparçacıklar**

Katman katman (LbL) biriktirme, çok katmanlı çekirdek-kabuk nanokapsül formu oluşturan faydalı bir tekniktir. Polielektrolitler, enzimler, lipidler, kolloidler, virüsler veya diğer aktif bileşikler gibi kabuk kısmı için çeşitli bileşenler kullanılabilir. Çok katmanlı filmler, ilaçların tek bir üniteye “nano” düzeyde birleştirilmesine izin vererek çok işlevli mimarileri ortaya çıkarmaktadırlar. Ayrıca ilaçlara koruma ve daha yüksek miktarda ilaç yükleme imkânı sağlamaktadır. Poli-l-arginin ve siRNA'yı dönüşümlü olarak biriktirerek oluşan LbL nanoparçacıkların, 28 saatlik uzun süreli serum yarı ömrüne sahip olduğu ve tümör hedef gen ekspresyonunu %80'e kadar azalttığı rapor edilmiştir (Deng ve ark., 2013).

#### **2.6.8. Manyetik ilaç taşıyıcı sistemler**

Onkolojideki sayısız zorluk nedeniyle, ilaçların istenen şekilde daha verimli salımı ve katı tümörlere ilaç penetrasyonu için manyetik nanopartiküller (MNP'ler) geliştirilmiştir (Tran & Wilson, 2011).

MNP'lerin benzersiz manyetik özellikleri, kanser lezyonlarını saptamak ve ilaçları istenen hedefe ulaştırmak için kullanılmalarını sağlamaktadır. Demir oksit, süper paramanyetik özelliklerinden dolayı bu amaç için yaygın olarak kullanılmaktadır. Manyetik alana maruz kalma, tümörlerin yok edilmesine yardımcı olan ısı üretimi bu nanopartiküller tarafından gerçekleştirilmektedir (Amin ve ark., 2015). Violamisin B1 kaplı demir oksit nanoparçacıkları MCF-7 hücreleri üzerinde test edildi ve daha verimli ve daha iyi bir taşıyım sergilemiştir (Marcu ve ark., 2013).

### **2.6.9. Hibrit nanopartiküller**

Hibrit nanoparçacıklar genellikle tek bir nano-tabanlı sistem oluşturmak için iki veya daha fazla nanoparçacık sistemini birleştirmektedir. Metotreksat ve beta karoten yüklü lipid polimer hibriti, MCF-7 hücrelerine karşı 0,89 apoptoz indeksi ile sonuçlanmıştır (A. Jain ve ark., 2017).

Psoralen yüklü hibrit nanopartiküllerin ise doksorubisine benzer antitümör yeteneğine sahip olduğu; ancak, doksorubisinden daha düşük toksisite sergilediği bilinmektedir. Dış lipid tabakasının ise biyouyumluluğu artırdığı bildirilmiştir (Jadon & Sharma, 2019).

### **2.6.10. Diğer taşıyıcı sistemler**

Metalik nanoparçacıklar (gümüş (Rasheed ve ark., 2019), altın (Teixeira ve ark., 2018)), karbon nanotroplar (grafen oksit (Huang ve ark., 2016), karbon nanotüp (Al Faraj ve ark., 2015) fullerenler (Raza ve ark., 2015)) ve seramik (mezogözenekli silika) (Meng ve ark., 2013) gibi ilacı nanosistemlere bağladıktan sonra taşıyabilecek başka sistemler de geliştirilmiştir; fakat, bazı dezavantajlardan dolayı ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımları sınırlıdır.

## 2.7. Nanotaşıyıcıların Üretim Yöntemleri

Kanser tedavisi için önemli bir strateji olan kemoterapi, kanser terapötiklerini tümör bölgesinde lokalize etme özgünlüğünden yoksundur, bu nedenle normal sağlıklı dokuları etkilemekte ve toksik yan etkilerin oluşmasına neden olmaktadır. Nanopartiküller, pasif ve aktif hedefleme mekanizmaları sayesinde tümör bölgesinde birikebilmektedirler. Polimer bazlı nanotıp, kanser terapötiklerinin etkinliğini artırmak için polimerik nanopartiküllerin, polimer misellerin, dendrimerlerin, polimerozomların, poliplekslerin, polimer-lipid hibrit sistemlerinin ve polimer-ilaç/protein konjugatlarının kullanımını gerektiren ve geniş çapta araştırılan bir alandır (Prabhu ve ark., 2015). Bu alan içerisinde yer alan polimerik nanopartiküller, kontrollü salım için potansiyel kullanımları, ilacı ve biyolojik aktiviteye sahip diğer molekülleri çevreye karşı koruma yetenekleri, ilaca veya hedeflenen bölgeye göre modifiye edilebilmeleri ve biyoyararlanımları gibi avantajlara sahip olmaları onları en çok tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemler kılmaktadır (Zielińska ve ark., 2020). Polimerik nanopartiküller, birçok farklı teknikle üretilmektedir. Üretim tekniği seçimi parçacık boyutu, parçacık boyut dağılımı, uygulama alanı gibi bir dizi faktöre bağlıdır (Rao & Geckeler, 2011). Genel olarak, önceden oluşturulmuş polimerlerin dağılımı veya monomerlerin polimerizasyonu olmak üzere iki ana strateji kullanılmaktadır.

### 2.7.1. Çözücü buharlaştırma yöntemi

Çözücü buharlaştırma, önceden sentezlenmiş bir polimerden polimerik nanopartiküller hazırlamak için geliştirilen ilk yöntemdir. Bu yöntemde, başlangıçta bir su içinde yağ (y/s) emülsiyonunun hazırlanması gerekmektedir (Desgouilles ve ark., 2003) ve bu da nanoküre oluşumuna yol açmaktadır (Jose ve ark., 2014; Vieira ve ark., 2019). Çözücü buharlaştırma tekniğinde ilk olarak, içinde polimerin çözüldüğü bir polar organik çözücünden oluşan bir organik faz hazırlanır ve aktif bileşen (örneğin ilaç), çözünme veya dispersiyon yoluyla dahil edilmektedir.

Diklorometan ve kloroform (Grumezescu, 2017) ve son zamanlara daha düşük toksisiteye sahip olduğu için etil asetat, özellikle biyomedikal uygulamalarda, yaygın olarak kullanılan organik polar çözücülerdir. Sulu faz, sıklıkla bir yüzey aktif madde (örneğin, PVA) içerecek şekilde hazırlanmıştır (Bohrey ve ark., 2016).

Organik çözelti, sulu fazda bir yüzey aktif madde ile emülsifiye edilmekte ve daha sonra tipik olarak yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılarak dağıtılmakta ve nano damlacıkların bir dispersiyonu halinde elde edilmektedir (N. Sharma ve ark., 2016). Emülsiyonun sürekli fazı boyunca yayılmasına izin verilen polimer çözücüsünün buharlaştırılmasıyla bir nanopartikül süspansiyonu oluşturulmaktadır. Çözücü, ya oda sıcaklığında sürekli manyetik karıştırma ile (daha polar çözücüler olması durumunda) ya da düşük basınçta yavaş bir işlemle (örneğin, diklorometan ve kloroform kullanıldığında olduğu gibi) buharlaştırılmaktadır. Çözücü buharlaştıktan sonra, katılaştıran nanopartiküller yıkanabilmekte ve santrifüjleme ile toplanabilmektedir, ardından uzun süreli depolama için dondurarak kurutma yapılabilmektedir. Bu yöntem nanokürelerin oluşturulmasına izin vermektedir (Szczęch & Szczepanowicz, 2020).

### **2.7.2. Emülsifikasyon/Solvent Difüzyonu**

Bu yöntem, polimer ve ilaç içeren kısmen suyla karışabilen bir çözücü ile bir yüzey aktif madde ve sulu bir çözelti arasında bir y/s emülsiyonunun oluşturulmasından meydana gelmektedir (S. Kumar ve ark., 2012; Souto ve ark., 2019). Bu emülsiyonun iç fazı, oda sıcaklığında her iki fazın bir başlangıç termodinamik dengesini sağlamak için önceden su ile doyurulmuş, benzil alkol veya etil asetat gibi kısmen hidro-karışabilir bir organik çözücüdür oluşmaktadır (Esmaili ve ark., 2007). Daha sonra büyük miktarda su ile seyreltme, dağılmış damlacıklardan dış faza çözücü difüzyonunu indüklemekte, bu da koloidal partiküllerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Genel olarak, bu nanoküre üretmek için kullanılan yöntemdir, ancak organik faza az miktarda yağ (trigliseritler gibi: C6, C8, C10, C12) eklendiğinde nanokapsüller de elde edilebilmektedir.

Son olarak, organik çözücünün kaynama noktasına bağlı olarak, bu son aşama, buharlaştırma veya süzme yoluyla gerçekleştirilebilmektedir (You ve ark., 2006). Sonuçta 80 ile 900 nm arasında değişen boyutlarda nanopartiküller elde etmek mümkündür.

Bu yöntem, kolloidal dispersiyondan elimine edilmesi gereken yüksek hacimli sulu faz gereksinimine ve hidrofilik ilacın sulu faza difüzyon riskine rağmen, polimerik nanopartikül üretimi için sıklıkla uygulanmaktadır (Yılmaz & Yorgancıoğlu, 2019; You ve ark., 2006).

### **2.7.3. Emülsifikasyon/Ters Tuzlama**

Emülsiyonlaştırma/çözücü difüzyon yöntemi, emülsiyonlaştırma/ters tuzlama yönteminin bir modifikasyonu olarak düşünülebilir. Tuzlama yöntemi, hidrokarşabilir bir çözücünün, nanokürelerin oluşumuna neden olabilecek bir tuzlama etkisi yoluyla sulu bir çözeltiden ayrılmasına dayanmaktadır (Y. Wang ve ark., 2016). Bu yöntemin temel farkı, aseton veya etanol gibi suyla karışabilen bir polimer çözücünden formüle edilen y/s emülsiyonunun bileşimidir ve sulu faz bir jel, tuzlama maddesi ve bir kolloidal stabilizatör içermektedir (Lim & Hamid, 2018). Uygun tuzlama maddelerinin örnekleri arasında magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ), kalsiyum klorür ( $CaCl_2$ ) veya magnezyum asetat [ $Mg(CH_3COO)_2$ ] gibi elektrolitler ve ayrıca sakaroz gibi elektrolit olmayanlar yer almaktadır (S. L. Pal ve ark., 2011; Pinto Reis ve ark., 2006). Aseton ve suyun karışabilirliği, sulu fazın doyurulmasıyla azaltılmaktadır, bu da diğer karışabilir fazlardan bir y/s emülsiyonunun oluşmasına izin vermektedir (Kabanov & Gendelman, 2007; Vauthier & Bouchemal, 2009). Y/S emülsiyonu, yoğun karıştırma altında oda sıcaklığında hazırlanmaktadır. Daha sonra emülsiyon, organik çözücünün dış faza difüzyonuna, polimerin çökmesine ve sonuç olarak nanokürelerin oluşumuna izin vermek için uygun hacimde deiyonize su veya sulu bir çözelti kullanılarak seyreltilmektedir. Kalan çözücü ve tuz çözücü madde çapraz akışlı filtrasyon ile elimine edilmektedir. Organik çözücü ile su arasında tam karışabilirlik koşulu şart değildir; ancak, uygulama sürecini basitleştirmektedir (Krishnamoorthy & Mahalingam, 2015; Y. Wang ve ark., 2016).

Bu yöntemle elde edilen nanokürelerin boyutları 170 ile 900 nm arasında değişmektedir. Ortalama boyut, iç fazın polimer konsantrasyonu/dış fazın hacmi değiştirilerek 200 ve 500 nm arasındaki değerlere ayarlanabilmektedir (Crucho & Barros, 2017).

#### **2.7.4. Nano-çöktürme**

Çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da adlandırılan bu yöntem, iki karışabilir çözücü gerektirmektedir. İç faz, aseton veya asetonitril gibi karışabilir bir organik çözücü içinde çözülmüş bir polimerden oluşmaktadır (Araújo ve ark., 2009; Cañadas ve ark., 2016; E Sánchez-López ve ark., 2016; Elena Sánchez-López, Egea, ve ark., 2018; Elena Sánchez-López, Ettcheto, ve ark., 2018). Suyla karışamamaları nedeniyle buharlaşma yoluyla kolayca uzaklaştırılabilmektedirler. Bu tekniğin prensibi, organik çözücünün lipofilik bir çözeltilerden sulu faza geçmesinden sonra polimerin arayüzeyde birikmesine dayanmaktadır. Polimer, ara polariteye sahip suyla karışabilen bir çözücü içinde çözülür ve bu çözelti, karıştırma altında kontrollü ekleme hızıyla sulu bir çözeltiye damla damla eklenmektedir. Polimer çözeltisinin sulu faza hızlı kendiliğinden difüzyonu nedeniyle, su moleküllerinden kaçınmak için nanopartiküller anında oluşmaktadır (Salatin ve ark., 2017). Çözücü nano damlacıklardan difüze olurken, polimer nanokapsüller veya nanoküreler şeklinde çökelmektedir. Genel olarak, organik faz sulu faza eklenir, ancak protokol nanoparçacık oluşumundan ödün vermeden tersine çevrilebilmektedir (Martínez Rivas ve ark., 2017).

Genellikle, nanopartiküllerin oluşumunu sağlamak için varlıkları gerekli olmasa da kolloidal süspansiyonun stabilitesini garanti etmek için sürece yüzey aktif maddeler dahil edilebilmektedir. Elde edilen nanoparçacıklar, tipik olarak, emülsifikasyon çözücü buharlaştırma prosedürü ile üretilenlerden daha iyi olan, iyi tanımlanmış bir boyut ve dar bir boyut dağılımı ile karakterize edilmektedir (Bilati ve ark., 2005).

Nano-çöktürme, 170 nm boyutlarında (Chidambaram & Krishnasamy, 2014) polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir, ancak aynı zamanda nanokürelerin veya nanokapsüllerin (Guterres ve ark., 2007) elde edilmesini de sağlamaktadır. Aktif madde polimerik çözelti içinde çözüldüğünde veya dağıldığında nanoküreler elde edilmektedir.

Nanokapsüller, ilaç daha önce bir yağ içinde çözüldüğünde elde edilir, daha sonra iç faz emülsiyonun dış fazında dağılmadan önce organik polimerik solüsyonda emülsiyon haline getirilmektedir (Martínez Rivas ve ark., 2017; Salatin ve ark., 2017).

#### **2.7.5. Diyaliz**

Diyaliz, küçük, iyi dağılmış polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için basit ve etkili bir yöntem sunmaktadır. Polimer organik bir çözücü içinde çözülmekte ve uygun moleküler ağırlık sınırına sahip bir diyaliz tüpünün içine yerleştirilmektedir. Diyaliz, önceki karışabilir ile çözünmeyen bir karışabilene karşı gerçekleştirilmektedir. Çözücünün membran içinde yer değiştirmesi, çözünürlük kaybı ve homojen nanoparçacık süspansiyonlarının oluşumu nedeniyle polimer agregatı oluşmaktadır (Rao & Geckeler, 2011).

#### **2.8. Kanser Tedavisinde Nanopartiküller ve Hedefe Yönelik İlaç Taşınımı**

Hedefe yönelik kanser tedavisi, normal ve kanser hücreleri arasındaki küçük farklılıkları ayırt etmekte önemli faydalar sağlayabilir. Hedefe yönelik tedaviler genellikle diğer geleneksel tedavilerden daha etkilidir ve daha az istenmeyen yan etkiyle sonuçlanmaktadır. Spesifik olmayan sistemik ilaç taşınımı ilacın hızlı eliminasyonuna yol açtığından, ilacın tolere edilebilir en yüksek dozda kullanılması genellikle yüksek toksisite ile beraber ekonomik olmayan bir sonuç ortaya koymaktadır. Son yıllarda, nano boyutlu materyallerin tümör hedefleme, teşhis (görüntüleme) ve tedavide sergiledikleri etkinlikler artan çalışmalarla gösterilmiştir (Farokhzad & Langer, 2009).

Nanopartiküller, ilaçları, görüntüleme ajanlarını ve genleri enkapsüle edebilen nano boyutlu malzemelerdir (Petros & DeSimone, 2010). Nanopartiküller, normal hücreleri atlarken yüksek dozda terapötik faktörleri tümör hücrelerine verebilmektedir. Nanopartiküller, yapı iskelesi, ilaçların ve kontrast maddelerin bağlanmasını sağlarken, yüzeyleri, tümör biyo-belirteçlerine bağlanan ligandlarla konjugasyon yoluyla biyolojik dağılımı ve spesifik iletimi kolaylaştırmaktadır (J. Zhang ve ark., 2010).

Nanopartiküller, spesifik olmayan biyolojik dağılım, ilaç direnci ve istenmeyen yan etkiler dahil olmak üzere geleneksel kemoterapinin sorunlarının üstesinden gelebilme yetisi sergilemişlerdir. Nanopartiküllerin ilginç özellikleri, son yirmi yılda birkaç nanopartikül bazlı terapötik maddenin klinik olarak denenmesini mümkün kılmıştır (Bombelli ve ark., 2014). Nanopartiküllerin çeşitli özelliklerinin modifiye edilebilmesi, onları kanser tedavisi için güçlü terapötik vektörler haline getirmektedir. Nanotaşıyıcılar, vücuttaki terapötiklerin dolaşım yarı ömrünü arttırmakta ve kısmen nanopartiküllerin nano boyutu ve düzensiz vasküler yapı ve arttırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkileri ile ilişkili olarak tümör bölgesinde birikimleri artmaktadır (Qi ve ark., 2014).

Nanotaşıyıcıların fizikokimyasal özellikleri, nanopartiküllerin yarı ömrünü ve biyolojik dağılımını önemli ölçüde etkilemektedir (Haley & Frenkel, 2008; Jadidi-Niaragh ve ark., 2017). Nanopartiküllerin boyutu, parçacıkların istenilen etkiyi sunabilmesinde önemli bir faktördür. Hidrodinamik çapta 7 nm'den küçük nanopartiküller renal filtrasyon ve idrarla atılıma girerken (Najafi-Hajivar ve ark., 2016; Soo Choi ve ark., 2007), 100 nm'den büyük nanomalzemeler genellikle fagositik hücreler tarafından dolaşımdan temizlenmektedir (Davis ve ark., 2008; Decuzzi ve ark., 2008). Ayrıca, partiküllerin yüzey pozitif yükü kanser hücrelerini tarafından alınabilmesini kolaylaştırmaktadır.

PEG gibi bazı polimerlerin nanopartiküllere yüzey ilavesi de kısmen retiküloendotelyal sistem tarafından temizlenmenin önlenmesi ve tümör bölgesinde partikül birikiminin arttırılması yoluyla partiküllerin dolaşım yarı ömrünü artırabilmektedir (Perrault ve ark., 2009). Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu dolaşım sürelerini iyileştirebilse de kanser hücrelerine alımlarını etkileyebilmektedir. Bu nedenle, nanopartiküllerin kanser hücreleri tarafından alımlarını kolaylaştıran nanopartiküllerin yüzeyine bazı tümöre özgü ligandların eklenmesi, aktif hedefleme olarak bilinir (Kim ve ark., 2010).



### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Cihazlar

Bu tez çalışması süresince kullanılan cihazlar ve cihazlara ait markalar Tablo 3.1 de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve markaları

Cihaz	Marka
Hassas Terazı	Radwag AS 82/220.R2
Manyetik Karıştırıcı	VELP AM4
Sonikatör	Bandelin Sonopuls HD 2070
Mikrosantrifüj	HITACHI HIMAC CT15E
Masaüstü santrifüj (Soğutmalı)	Nüve NF800R
Otomatik pipetler	Ependorf
FTIR	Jasco FT/IR 4700
DLS	HORIBA SZ-100V2
Çeker ocak	Fume Cupboard 120 cm
Etüv	Memmert
Pipet tabancası	Greiner
Spin vortex	Biosan-Combi Spin FVL 2400N
Laminar Akışlı Kabin (Steril kabin)	Esco Airstream
Sirkülatörlü su banyosu	Nüve
Soğutmalı santrifüj cihazı	Nüve
UV/VIS Spektrofotometresi	Denovix DS-11 FX+
Çalkalayıcı İnkübatör	Biosan-ES20

Ters Faz Işık Mikroskop	Olympus CKX41
CO <sub>2</sub> 'li İnkübatör	Esco
Otoklav	HMC-Hirayama
Mikroplaka Elisa Okuyucu	Tecan
Buzdolabı	Vestel-GTP 455A
-80 °C Dondurucu	Hettich
Ters Faz Floresan Mikroskop	Olympus CKX53
Spektroflorometre	DeNovix

### 3.1.2. Kimyasallar ve sarf malzemeler

Bu tez çalışması süresince kullanılan başlıca kimyasallar ve sarf malzemeleri Tablo 3.2 de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan başlıca kimyasallar ve sarf malzemeler

#### **Kullanılan kimyasallar**

PVA  
DCM  
DMF  
HMDI  
Sodyum hidroksit  
Etanol  
Methanol  
Kloroform

#### **Kullanılan kimyasallar**

RPMI 1640  
DPBS  
Gentamisin  
DMEM HG  
FBS  
Tripsin-EDTA  
L-glutamin  
DBTL

## 3.2. Amfipatik Kopolimerin Sentezlenmesi

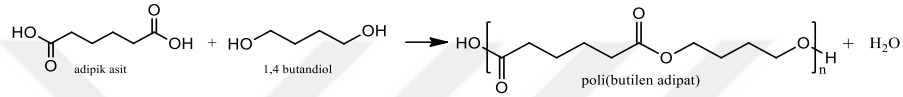
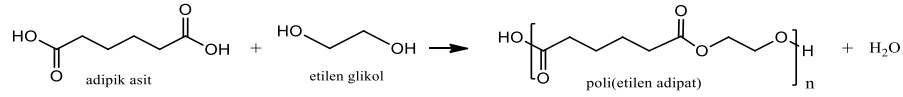
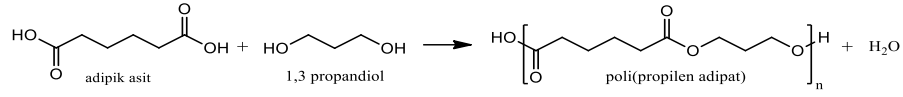
### 3.2.1. Polyesterlerin sentezlenmesi

#### Poliadipatların sentezi

Polimerik nanopartiküller, taşınacak ilaca ve uygulanacak bölgeye uygun şekilde modifiye edilebilmeleri sebebiyle ilaç taşıyıcı sistemler olarak yaygın bir şekilde araştırılmaktadır. Biyouyumlu ve biyobozunur polimerler arasında en çok araştırılan ise PLGA'dır.

PLGA'nın en büyük avantajı biyouyumluluğu olmasına rağmen, hidrofobik yapısı, düşük enkapsülasyon verimliliği ve ilk salımın yüksek oranda gerçekleşmesi gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, biyouyumlu ve biyobozunur olduğu bilinen çeşitli amfifilik polyesterler ilaç taşıyıcı sistemlerin üretilmesi için ilgi odağı olmuştur. Poliadipatlar ise bu biyouyumlu polyester arasında yer alan dikarboksilik asit ve çeşitli alifatik diollerden sentezlenmektedir. PLGA'nın özelliklerini iyileştirmek yerine PLGA'ya alternatif olarak biyouyumlu ve biyobozunur aynı zamanda ekonomik ve fizikokimyasal özellikleri modifiye edilebilen poliadipatlar, bu tez kapsamında sunuldu. (Nanaki ve ark., 2018).

Poliadipatların sentezi, herhangi bir katalizör veya solvent kullanılmaksızın, adipik asidin erime sıcaklığı olan 152 °C -155 °C sıcaklıkta, 2-3 mmHg vakum altında kesikli bir cam reaktörde N<sub>2</sub> gazı altında gerçekleştirildi. Poliadipatların sentezinde üç farklı diol kullanılarak, 1,3 propandiol, 1,4 bütandiol ve etilen glikol, farklı yapılarda üç adet poliadipat, poli (propilen adipat) (pPAD), poli (bütülen adipat) (pBAD) ve poli (etilen adipat) (pEAd) sentezlendi. Reaksiyon, adipik asit: diol mol oranı 1:1.2 olacak şekilde ayarlandı ve kesikli cam reaktör ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilip 500 rpm de manyetik bir balık yardımı ile önce adipik asit karıştırılarak eritildi ve erimeyi takiben diol eklendi. Reaksiyon dört saat devam ettirildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra distile su, aseton ve etanol kullanılarak saflaştırma aşaması gerçekleştirildi (Aydm, 2012). Poliadipatların reaksiyonlarına ait şema Şekil 3.1 de verildi.



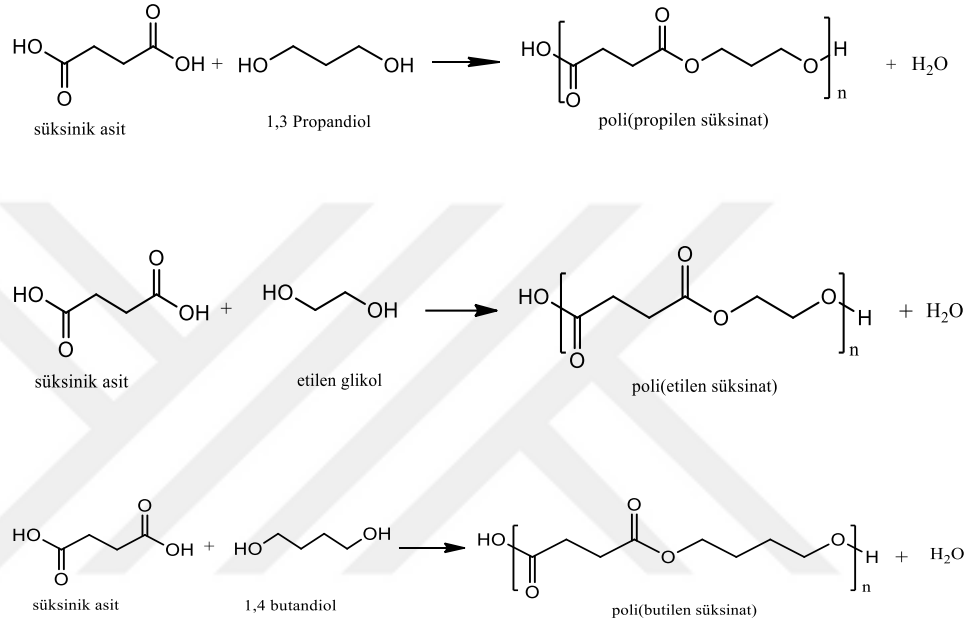
Şekil 3.1. Poliadipatların kimyasal reaksiyonlarının şematik gösterimi

#### Polisüksinatların sentezi

Alifatik polyesterler, PLA, PCL ve alifatik polyesterlerden oluşan bir kopolimer olan PLGA, biyoyumlu ve biyobozunur özelliklerinden dolayı ticari olarak tıp, farmasötik teknoloji, doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerin üretilmesinde de yaygın bir şekilde kullanılan bu alifatik polyesterlere alternatif olarak özellikle poli (propilen) süksinat PCL ‘den bile daha hızlı bir biyolojik bozunmaya sahip olduğu için ilaç taşıyıcı sistemlerin üretiminde kullanılmaya aday bir biyoyumlu polimerdir (Bikiaris ve ark., 2009). Bu sebeple tez kapsamında poliadipatlara alternatif olarak polisüksinatlar sentezlendi.

Polisüksinatlar, bir başka polyester grubu olup, adipik asit yerine dikarboksilik asitlerden süksinik asidin kullanılmasıyla sentezlendi. Polisüksinatların sentezinde, poliadipatların sentezlenmesinde izlenen prosedür takip edildi. Kısaca, sentez çeker ocak altında, 2-3 mmHg vakum uygulanarak, katalizör ve solvent kullanılmadan, N<sub>2</sub> geçirilmiş ortamda, süksinik asidin erime sıcaklığı olan 184 °C- 186 °C de, manyetik bir karıştırıcı üzerinde, kesikli bir cam reaktörde gerçekleştirildi. Süksinik asit: diol oranı 1:1.2 mol olacak şekilde ayarlanılarak, süksinik asit tamamen eridikten sonra dioller (1,3 propandiol, 1,4 bütandiol ve etilen glikol) eklendi.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra saflaştırma işlemi uygulanarak nihai ürünler, poli (propilen süksinat) (pPSu), poli (bütilen süksinat) (pBSu) ve poli (etilen süksinat) (pESu), elde edildi (Aydın, 2012). Polisüksinatların kimyasal reaksiyonlarına ait şema Şekil 3.2 de gösterildiği gibidir.



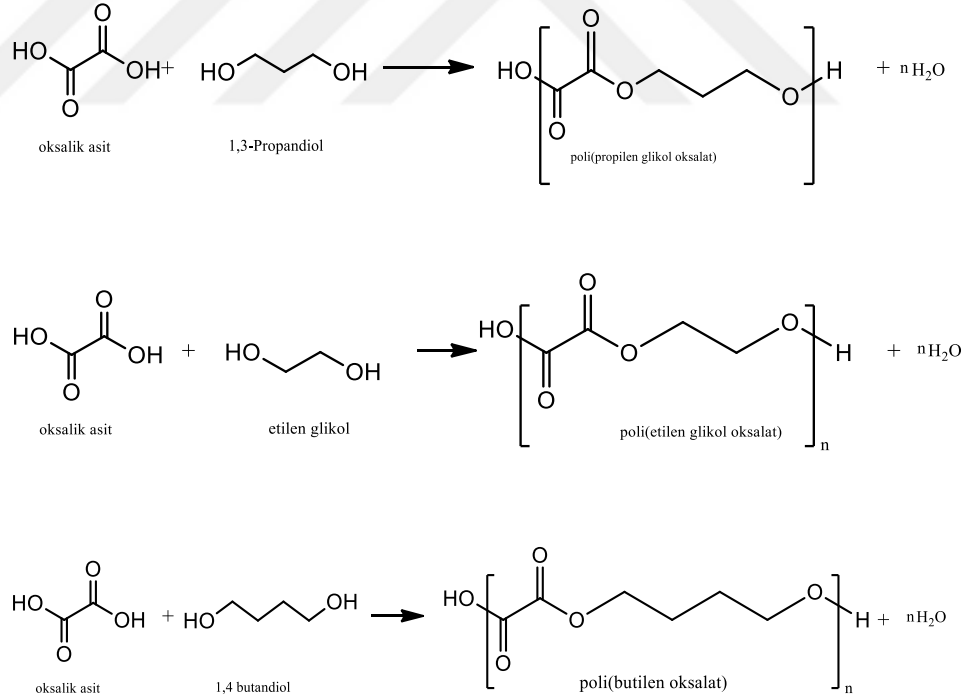
Şekil 3.2. Polisüksinatların kimyasal reaksiyonlarının şematik gösterimi

### Polioksalatların sentezi

Polioksalatlar, alifatik polyesterler olup emilebilen süturlar olarak cerrahi de kullanılan biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerdir. Kolay sentezlenebilmeleri ve hücre içinde biyolojik olarak bozunabilmelerinin yanı sıra polioksalatlar hidrolitik olarak toksik olmayan daha küçük moleküllere bölünebilmektedirler (Phromviyo ve ark., 2014). Bu tez kapsamında ilaç taşıyıcı bir sistem olabilme potansiyeline sahip olan polioksalatlar, poliadipat ve polisüksinatlara alternatif olarak sentezlendi.

Polioksalatlar, dikarboksilik asit türlerinden oksalik asit ve dioller kullanılarak sentezlenen polyester türü polimerlerdir. Polioksalatların sentezi poliadipatlar ve polisüksinatlara kıyasla daha yüksek sıcaklıkta, 2-3 mmHg vakum altında katalizör ve solvent içermeyen ortamda gerçekleştirildi.

Oksalik asidin erime noktası 189 °C- 192 °C olup, polioksalatlar, kesikli bir cam reaktörde, poliadipat ve polisüksinat reaksiyonlarının gerçekleştiği şartlar sağlanarak sentezlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra polioksalatlar, poli (propilen oksalat) (pPOX), poli (bütilen oksalat) (pBOX) ve poli (etilen oksalat) (pEOX), saflaştırıldı. Polioksalatlara ait kimyasal sentez şeması Şekil 3.3 de verildi. Esterifikasyon reaksiyonu her üç grup için de aynı şartlar altında, sadece dikarboksilik asidin erime sıcaklığına bağlı olarak sıcaklığın değiştirilmesi ile gerçekleştirildi (Aydın, 2012).



Şekil 3.3. Polioksalatların kimyasal reaksiyonlarının şematik gösterimi

### 3.2.2. Polyesterlerin PEGilasyonu

Nanotaşıyıcıların sahip olması istenilen özellikleri arasında, stabil olmalarının yanı sıra dolaşım yarı ömrünün uzun olması ve hücrel alımlarının gerçekleşebilmesi yer almaktadır. Hidrofobik nanopartiküller, bilayerdaki lipid molekülleri dağılımında heterojenliğe sebep olurken membran sızıntısına neden olmaz. Amfifilik yapıdaki nanotaşıyıcıların ise hücrel alımı hidrofobik nanotaşıyıcılara göre daha kolay olmaktadır. Çeşitli zincir uzunluklarında PEG'ler kullanılarak sentezlenen amfifilik kopolimerlerden üretilen nanotaşıyıcılar araştırılmış ve PEG'lerin varlığı nanotaşıyıcılar arasında bir itici güç oluşturarak stabil olmalarını sağlarken, PEGilasyonun nanopartiküllerin dolaşımında kalma süresini birkaç dakikadan birkaç saate kadar yükselttiği bildirilmiştir (Behzadi ve ark., 2017).

Bu tez çalışması kapsamında üretilen amfifilik polyesterlerden üretilen nanotaşıyıcıların hem stabilitesini artırmak hem de hücrel alımını güçlendirmek için polyesterler PEGile edildi.

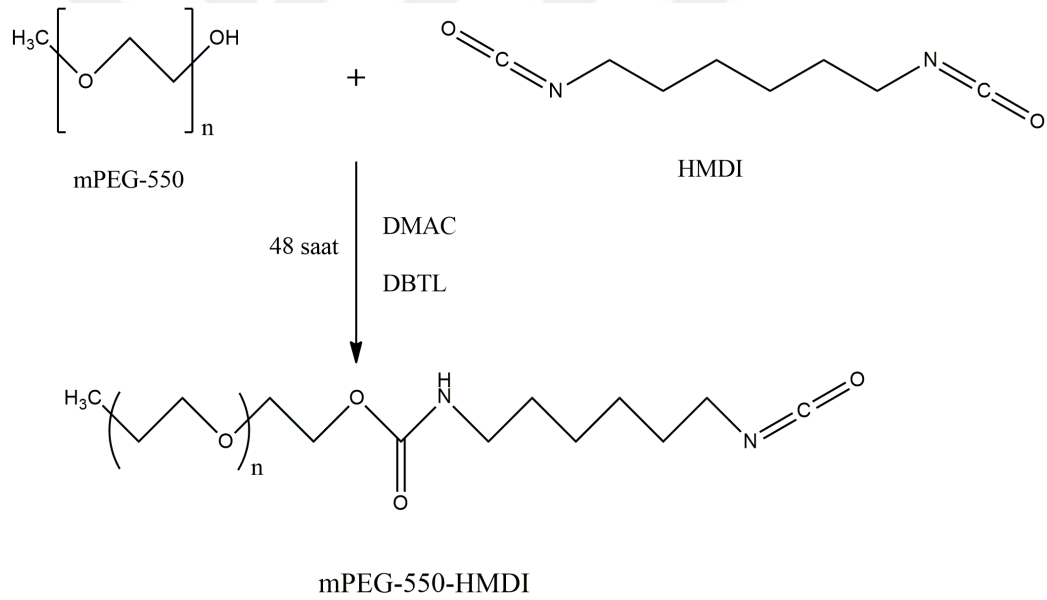
PEGilasyon prosesinde ilaç taşıyıcı sistemler ve doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan biyouyumlu ve lineer yüksüz bir yapıya sahip -OH ucundan kovalent olarak bağ oluşturan mPEG polimeri kullanıldı (Yamasaki ve ark., 1990). mPEG polimerinin zincir uzunluğu, partikül boyut ve boyut dağılımını etkileyen bir faktör olduğu için literatürle uyumlu olarak mPEG-550 seçildi (Choi & Kim, 2007; Piazza ve ark., 2018)

Adipik asidin erime sıcaklığı diğer dikarboksilik asitlerin erime sıcaklığından daha düşüktür dolayısıyla poliadiptatların sentezi için daha az ısı enerjisine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum poliadiptatların sentezini daha ekonomik kılmaktadır. Bu nedenle tezin bundan sonraki tüm aşamalarında poliadiptatlar kullanılmıştır.

Poliadiptatların PEGilasyonu, oda şartlarında N<sub>2</sub> gazı geçirilmiş ağzı kapalı, ışık geçirmeyen cam reaktörlerde, manyetik bir karıştırıcı yardımıyla çeker ocakta gerçekleştirildi. Amfifilik kopolimer sentezinin gerçekleştirilmesinde, polimerleştirici ajan olarak heksametilen diizosiyanat (HMDI), çözücü olarak, N,N-dimetil asetamid (DMAC) ve katalizör olarak da dibüttilin dilaurat (DBTL) kullanıldı.

Kopolimer sentezinin gerçekleşebilmesi ve hidrofilik grupların hidrofobik gruplara bağlanabilmesi için öncelikle HMDI'nın mPEG-550'ye bağlanarak hidrofobik polimer ile hidrofilik polimer arasında bir köprü oluşturması sağlandı. Şekil 3.4 de şematik olarak gösterildiği gibi, öncelikle HMDI, içerisinde 25 mL DMAC bulunan karıştırıcı haldeki cam balon içerisine eklendi ve manyetik bir balık yardımı ile karıştırıldı. Daha sonra mPEG-550: HMDI mol oranı 1:1 olacak şekilde mPEG-550, HMDI karışımına üzerine damla damla ilave edildi ve DBTL katalizörü eklenip cam balonun ağzı kapatılarak 48 saat reaksiyona bırakıldı.

mPEG-550-HMDI kompleksi, poliadipatların moleküler ağırlıklarına göre her bir adıpat için ayrı ayrı sentezlendi (Gong ve ark., 2009).



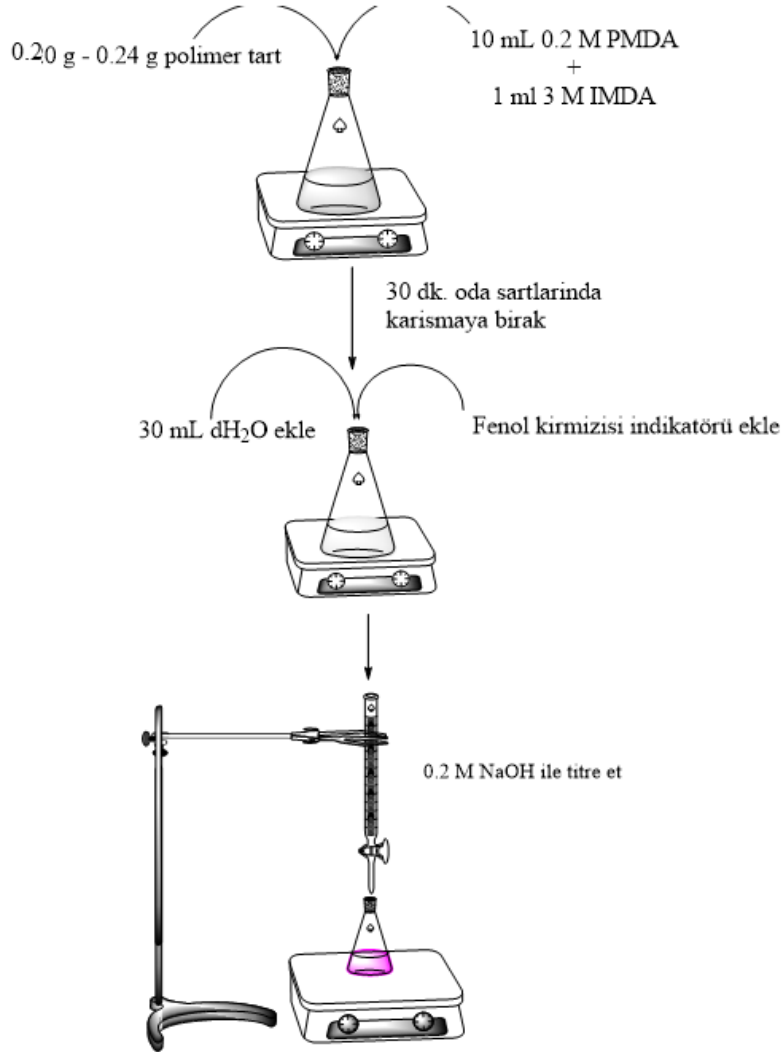
Şekil 3.4. mPEG-550-HMDI reaksiyonunun şematik gösterimi

Poliadipat: mPEG-550-HMDI mol oranı 1:2.5 olacak şekilde poliadipatlar cam balonlar içerisine tartıldı ve sentezlenen mPEG-550-HMDI kompleksi poliadipatlar üzerine damla damla ilave edildi. Daha sonra cam balonun ağzı kapatılarak, oda sıcaklığında 72 saat reaksiyona bırakıldı (Şekil 3.5.). Reaksiyon sonunda evaporatör yardımı ile DMAC buharlaştırılarak uzaklaştırıldı ve elde edilen kopolimerlerin saflaştırılmasında, kloroform ve soğuk metanol kullanılarak, reaksiyona girmeyen mPEG polimeri uzaklaştırıldı (Piazza ve ark., 2018).



### 3.2.3. Polyesterlerin moleküler ağırlıklarının grup sonu analizi ile belirlenmesi

Grup sonu -OH olan polimerlerin moleküler ağırlıkları, grup sonu analiz yöntemi ile belirlenebilmektedir (Chaudhary ve ark., 1997). Bu yöntem kapsamında basit stokiyometrik eşitlikler kullanılarak polimerin mol sayısı hesaplanabilir. Bu analizde; piromelitik dianhidrit (PMDA) ve katalizör olarak imidazol kullanıldı. Reaksiyon susuz bir çözücü ortamında, dimetil formamid (DMF) gibi uçuculuğu az olan bir çözücü kullanılarak oda şartlarında gerçekleştirildi. Grup sonu analiz yöntemin basamaklar halinde Şekil 3.6 da özetlenmiştir.



Şekil 3.6. Grup sonu analiz yöntem prosedürü

Polyesterlerin uçları, esterifikasyon olarak bilinen bir reaksiyonla analiz edilebilen alkol gruplardan oluşmaktadır. Bir esterleştirmede -OH, bir organik asitle veya daha yaygın olarak asidin daha reaktif bir türeviyle reaksiyona girebilir. Bu nedenle bu çalışmada yaygın olarak PMDA olarak bilinen 1,2,4,5-benzen tetra karboksilik asit anhidriti kullanıldı. Şekil 3.6 da gösterilen analiz, dolaylı bir titrasyon prosedürünü ifade etmektedir. Prosedürde belirtilen miktarlar arasında tartılan poliadiptatlar ile fazla miktarda PMDA karıştırıldı ve bu karışıma IMDA katalizörü eklenerek 30 dakika reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, reaksiyona girmemiş anhidrit gruplarını asit formuna dönüştürmek için su eklendi ve asit, standart NaOH ile titre edildi. Harcanan NaOH miktarı kullanılarak poliadiptatların mol sayısı formül 3.1 de gösterildiği gibi hesaplandı.

$$\frac{0.2 \text{ mol}}{L} PDMA \times 4 \times 10 \text{ mL} \times \frac{1L}{1000 \text{ mL}} = 0.008 \text{ mol} - COOH$$

$$\frac{0.2 \text{ mol}}{L} NaOH \times (\text{Harcanan NaOH hacmi}) \text{ mL} \times \frac{1L}{1000 \text{ mL}} = N \text{ mol} - COOH$$

$$(0.008 \text{ mol} - COOH) - (N \text{ mol} - COOH) = n \text{ mol}$$

$$M_A = \frac{m \text{ g polimer}}{\frac{n \text{ mol}}{2}} \quad (3.1)$$

### 3.3. Polimerlerin Kimyasal Karakterizasyonu

Tez çalışmasının sentez aşamasında üretilen tüm polyesterlerin ve kopolimerin kimyasal karakterizasyonu FTIR spektroskopi cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu analiz sayesinde moleküller tarafından absorplanan ışınlar, yakın veya uzak infrared bölgeye bağlı olarak moleküllerin titreşimsel veya rotasyonel enerjileri etkilenir ve bu etkilenme sonucu oluşan spektrumlar sayesinde yeni sentez ürünün yapısı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Çalışma kapsamında sentezlenen ürünlere ait FTIR spektralleri incelenerek sentezin gerçekleşip gerçekleşmediğine dair veriler elde edildi.

### **3.4. Amfipatik Kopolimerlerden Nanopartikül Üretim Optimizasyonu**

Nanopartikül üretim optimizasyonu, kullanılan yöntemle bağı olarak, yöntemin içerdiği parametrelerin değişimi ile nano boyutta partikül üretimi için ideal koşullara ulaşmayı sağlayan birbirinden farklı birçok denemeyi kapsamaktadır. Nanopartikül üretim yöntemleri literatür taraması yapılarak, literatürdeki bazı yöntemlerin modifikasyonu ile gerçekleştirildi (Crucho & Barros, 2017).

Hem hidrofilik hem hidrofobik özellik sergileyen çalışma kapsamında üretilen kopolimerlerden nanopartikül üretimi, nano-çöktürme, tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi, hidrofilik özellik sağlayan yapının değiştirilmesi, çift emülsiyon buharlaştırma yöntemi gibi yöntemler denenerek nano boyutta, monodispers özellikte ve stabil nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirildi.

### **3.5. Optimum Koşullarda Üretilen Nanopartiküllere İlaç Yüklenmesi**

Nanopartikül üretimi için optimum koşullar belirlendikten sonra, üretilen nanopartiküllere ilaç yüklemesi yapıldı. İlaç yükleme aşaması da nanopartikül üretim aşaması gibi birtakım optimizasyonlar gerektiren bir aşamadır. Nanopartiküle yüklenecek ilacın hangi konsantrasyonda ne kadar yüklenmesi gerektiği, nanopartiküllerin ilacın ne kadarını enkapsüle ettiği çeşitli optimizasyon aşamaları ile belirlendi (Pinto Reis ve ark., 2006).

### **3.6. Hayvan Hücre Kültürü Çalışmaları**

#### **3.6.1. MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının kültüre edilmesi**

Meme kanseri araştırmalarında, anti-kanser ilaçlarla ilgili olanlar da dahil olmak üzere, dünya çapında en yaygın kullanılan model hücre dizisi MCF-7 hücre hattıdır. MCF-7 meme kanseri hücreleri ER (östrojen reseptörü) pozitif ve PR (progesteron reseptörü) pozitif olup lümen A moleküler alt tipine aittir. MCF-7, normalde düşük metastatik potansiyele sahip olduğu düşünülen, zayıf agresif ve invaziv olmayan bir hücre dizisidir (Comşa ve ark., 2015).

MDA-MB-231, ER ve PR ekspresyonunun yanı sıra insan HER2 amplifikasyonundan yoksun olduğu için oldukça agresif, invaziv ve zayıf farklılaşmış üçlü negatif meme kanseri (TNBC) hücre hattıdır. Diğer invaziv kanser hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin invazyonuna, hücre dışı matrisin proteolitik bozunması aracılık etmez (Chavez ve ark., 2010).

Hormon reseptör pozitif meme kanseri vakasının görülme oranı %70-80 iken HER2 pozitif %10-%20 civarındadır (Chuaychai & Sriplung, 2022).

Bu nedenle MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları bu tez çalışması için model meme kanseri hücre hatları olarak seçildi.

Tez çalışması kapsamında üretilen nanopartiküller, meme kanseri hücre hatları, MCF-7 ve MDA-MB-231 üzerinde denenebilmesi için öncelikle meme kanseri hücre hatlarının çözdürülmesi, kültüre alınarak pasajlanması ve dondurulması işlemleri gerçekleştirildi.

Hücrelerin çözdürülmesi için öncelikle her bir meme kanseri hücresinin yaşamını ve çoğalmasını sağlayan besi ortamları hazırlandı. MCF-7 meme kanseri hücre hattı için %10 FBS (fetal sığır serumu), %0.1 gentamisin ve %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 besi ortamı hazırlandı. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı için %10 fetal sığır serumu (FBS), %0.1 gentamisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM High Glucose besi ortamı hazırlandı. Daha sonra -196 °C de sıvı azot tankında kriyotüpler içerisinde muhafaza edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları sırayla alınarak 37 °C deki sirkülatörlü su banyosunda çözdürüldü ve çözünen hücre süspansiyonu üzerine 5-6 mL besi ortamı ilave edilerek santrifüj tüpüne alındı. Dondurma aşamasında kullanılan DMSO'yu uzaklaştırmak için 800 rpm de, +4 °C de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pelet halindeki hücreler hem tüp duvarından hem de birbirlerinden mekanik olarak ayrıldı. Ardından 6 mL besi ortamı ile süspansiyon edilip filtreli T75 flasklara alınıp üzeri 12 mL'ye besi ortamı ile tamamlandı ve 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde %90 konfluensiye ulaşana kadar inkübe edildi. Bu süre boyunca iki gün aralıklarla hücrelerin besi ortamı yenilendi.

Monolayer olarak çoğalan bu meme kanseri hücre hatları %90 konfluensiye ulaştıklarında yaşam alanları kısıtlandığı için bir müddet sonra yeterli alan ve besi ortamı olmadığından apoptoza uğrayarak yüzeyden ayrılırlar. Bu nedenle %90 konfluensiye ulaşan hücrelerin pasajlanması gerekmektedir.

Hücrelerin pasajlanması için öncelikle T75 flask içerisinde bulunan besi ortamı uzaklaştırıldı. Hücreler, yüzeylerinde bulunan besi ortamının uzaklaştırılması için, 1x DPBS (Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline) ile yıkandı. Hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için Tripsin-EDTA kullanıldı.

Tripsin, yüzeye bağımlı hücreleri flask yüzeyinden ayırmak için kullanılan, peptid bağlarını hidrolize eden ve serin proteaz ailesinin bir üyesi olan proteolitik bir enzimdir. Tripsin hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde bulunan yüzeye bağımlı proteinleri hidrolize ederek hücreleri süspansiyon haline getirmektedir. Hücre kültüründe ise genellikle EDTA (Etilen di-amin tetra asetik asit) içeren tripsin çözeltileri tercih edilmektedir (Kurashina ve ark., 2019). EDTA,  $Ca^{2+}$  iyonlarını şelatlayarak kalsiyuma bağlı kaderin adhezyon moleküllerinin kırılması sonucu hücrelerin birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır. Tripsin divalent  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyon varlığında inhibe olmaktadır bu nedenle EDTA ilavesi ortamdaki  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonlarını tutarak aynı zamanda tripsinin aktivitesini artırmaktadır (Schmidt ve ark., 2016). Bu nedenle hücre kültürü çalışmalarında EDTA'lı tripsin tercih edildi ve Tripsin-EDTA 37 °C de aktif olduğu için flaska eklendikten sonra flask 1-2 dk inkübatörde bekletildi ve ardından mekanik bir kuvvet uygulanarak hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücreler 8-10 mL besi ortamı ile toplanarak santrifüj tüpüne alındı. Serum içeren besi ortamı tripsini inaktive etmesine rağmen, tripsinin ortamdaki uzaklaştırılması için 800 rpm de, +4 °C de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pelet halindeki hücreler hem tüp duvarından hem de birbirlerinden mekanik olarak ayrıldı. Ardından 6 mL besi ortamı ile re-süspansiyon edilip üç adet filtreli T75 flasklara alınarak üzerleri 12 mL'ye besi ortamı ile tamamlandı. Hücre kültürü ileriki çalışmalarında kullanılmak üzere hücrelerin stoklanması ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle yeterli sayıda pasajlanan hücrelerin dondurularak azot tanklarında saklanması gerekmektedir.

Hücrelerin dondurulması işlemi, hücrelerin pasajlanması işleminde yer alan tripsinizasyon aşamasını içine almaktadır. Kısaca, %90 konfluensiye ulaşan hücrelerin besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra flask 1xDPBS ile yıkandı. Ardından hücreler tripsin-EDTA muamelesi ile yüzeyden ayrılarak besi ortamı yardımı ile toplandı. Santrifüj işleminin ardından tripsin içeren süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet mekanik yöntemle süspansiyon edildikten sonra %10 DMSO içeren FBS ile tekrar süspansiyon edildi. -80 °C ve azot tankına dayanıklı kriyotüpler içerisine 1 ml olacak şekilde konularak ağızları sıkıca kapatıldı. Kriyotüpler stok takibi açısından, hücre hattının adını, pasaj numarasını, dondurulduğu tarih ve dondurucu kişinin adını içeren bilgiler ile etiketlendi.

### 3.6.2. Sitotoksitesite analizi

Tez çalışmasında üretilen nanopartiküllerin, ilaçların ve ilaç yüklü nanopartiküllerin toksik etkilerinin belirlenmesi için sitotoksitesite analizi yapıldı. Öncelikle T75 flasklarda kültüre edilen ve %90 konfluensiye ulaşan hücreler, tripsinizasyon yoluyla yüzeyden ayrıldı ve besi ortamı ile toplandı. Besi ortamı ile toplanan ve iyi bir şekilde süspansiyon edilen hücrelerden bir miktar, hücre sayımı için, mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücre sayımı tripan mavisi kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca 100 µL hücre süspansiyonu ve 100 µL tripan mavisi homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra, bir miktarı otomatik pipet yardımıyla Neubauer Lamı'na yüklenerek, her bir kuyucuğa düşen hücreler ters faz ışık mikroskobu ile sayıldı ve hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Hücre kons.} \left( \frac{h}{mL} \right) = \text{Toplam hücre sayısı} \times 10^4 \times \frac{\text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Kare sayısı}} \quad (3.2)$$

Bu tez çalışmasında kullanımı tercih edilen sitotoksitesite analizi, 96 kuyucuklu pleytlerde gerçekleştirilen bir biyolojik aktivite analizi olup her kuyucukta aynı sayıda hücre bulunmasını gerektirmektedir. Bu nedenle hücre konsantrasyonu hesaplandıktan sonra, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri için her kuyucukta 100 µL  $5 \times 10^4$  hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanarak sekiz kanallı mikropipet yardımı ile 96 kuyucuklu pleytlere ekildi ve 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

Ardından seri dilüsyon yöntemi ile hücreler 100 µL serbest formdaki ilaçlar, boş nanopartiküller ve ilaç yüklü nanopartiküller ile muamele edildi ve 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra pleyt inkübatörden alınarak besi ortamı uzaklaştırıldı ve 100 µL %10 MTT (5 mg/mL) (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) içeren besi ortamı eklenerek 3 saat 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. Daha sonra MTT içeren bu besi ortamı uzaklaştırılıp canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi aracılığı ile oluşturulan formazan tuzlarını çözünür forma getirmek için 100 µL DMSO eklendi. Çalkalayıcı inkübatörde 15 dk kadar formazanların tamamının çözünmesi sağlandıktan sonra, UV mikropleyt okuyucu yardımı ile 570 nm dalga boyunda kolorimetrik okuma gerçekleştirildi. Hücresel canlılık ve IC50 değerleri, bu ham veriler kullanılarak GraphPad 8.1 yazılımı ile hesaplandı (Kaplan ve ark., 2021).

### **3.6.3. *In vitro* hücresel alım analizi**

Hücrenin ihtiyaç duyduğu besinler, O<sub>2</sub> ve diğer malzemeler hücre içine alınarak hücre içi biyolojik sürece dahil edilmektedir. Hücre membranı çift katmanlı fosfolipid tabakadan oluşmaktadır ve bu membran hücre içini dış çevreden ayırarak hücre için zararlı olan maddelerin hücre içine girmesini engellemektedir (Foroozandeh & Aziz, 2018).

Bir maddenin hücre içine alımı pasif taşıma ve aktif taşıma ile gerçekleşmektedir. Pasif taşıma, bir maddenin hücre içi ve hücre dışı derişimine bağlı olarak, çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçişi, difüzyon ile sağlanmaktadır. Pasif taşıma enerjiye ihtiyaç duymazken aktif taşıma enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Aktif taşıma ise maddelerin endositoz yöntemi ile enerji harcanarak hücre içine alınmasıdır (R. Zhang ve ark., 2019).

Hücre içi biyolojik sürece dahil olarak hücreyi apoptoza uğratmayı hedefleyen nanotaşıyıcıların hücre içine endositoz yöntemleri ile alınması umut edilmektedir.

Fakat nanotaşıyıcıların hücre içine alımı onların boyutuna, şekline ve yüzey yükü gibi bir çok fizikokimyasal özelliğine bağlıdır (Donahue ve ark., 2019)(Nelemans & Gurevich, 2020). Partikül boyutu 200 nm'nin üzerinde olan nanotaşıyıcılar hücre tarafından yabancı madde olarak alınıp fagosite olabilmektedir. Bu nedenle üretilen nanotaşıyıcıların hücresel alımı, nanotaşıyıcının karakterizasyonunda önemli bir yere sahiptir (Behzadi ve ark., 2017).

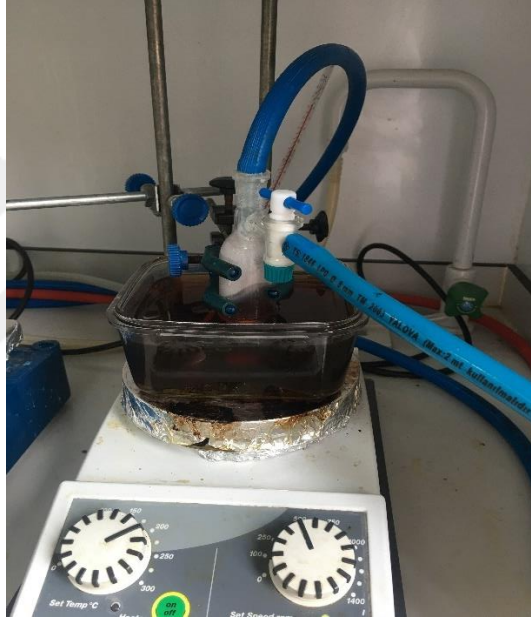
Sitotoksite analizi ile IC50 değerleri belirlenen serbest formdaki ilaçlar ve ilaç yüklü nanopartiküllerin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri tarafından alınıp alınmadığı ters faz floresan mikroskobu ile belirlendi. Burada hücrenin nanopartikülü alıp almadığını gözlemleyebilmek için nanopartikül içerisine floresan bir boya olan indiyosyanin yeşili yüklendi. İlk olarak, 12 kuyucuklu pleytlere 1 mL  $5 \times 10^4$  hücre/mL konsantrasyonunda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri ekildi ve 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 1x DPBS içerisinde IC50 konsantrasyonunda hazırlanan serbest formdaki ICG ve ICG yüklü nanopartiküller ile muamele edildi ve pleytler 37 °C de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 4 saat inkübe edildi. Daha sonra ters faz floresans mikroskop altında alınan görüntüler kaydedildi.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

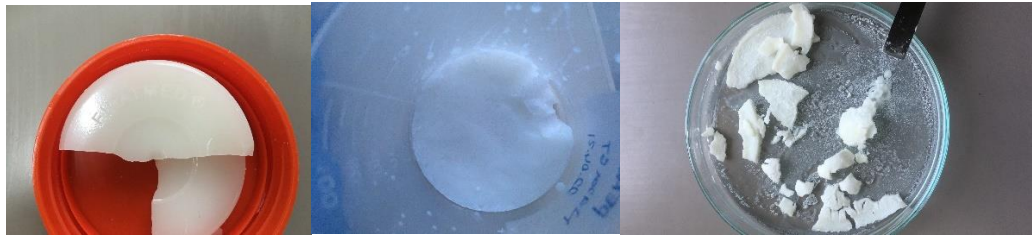
### 4.1. Polyesterlerin Sentezlenmesi

Polysterlerin sentezinde dikarboksilik asit olarak, adipik asit, süksinik asit ve oksalik asit; diol olarak, 1,3 propandiol, 1,4 bütandiol ve etilen glikol kullanılarak 9 farklı polimer, pPAd, pBAd, pEAd, pPSu, pBSu, pESu, pPOX, pBOX ve pEOX, sentezlendi. Sentezler, çözücü ve katalizör kullanılmaksızın vakum altında kesikli cam reaktörde yağ banyosunda gerçekleştirildi. Esterifikasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği reaksiyon ortamı Şekil 4.1 de verilmiştir.



Şekil 4.1. Esterifikasyon reaksiyon koşulları

Sentez sonunda elde edilen polyestere ait görüntüler Şekil 4.2 de verilmiştir. Hem görsel olarak hem de çözünürlük faktörü açısından, tamamen hidrofobik, reaksiyona giren kimyasallardan farklı yeni ürünlerin elde edildiği fiziksel olarak söylenebilir.

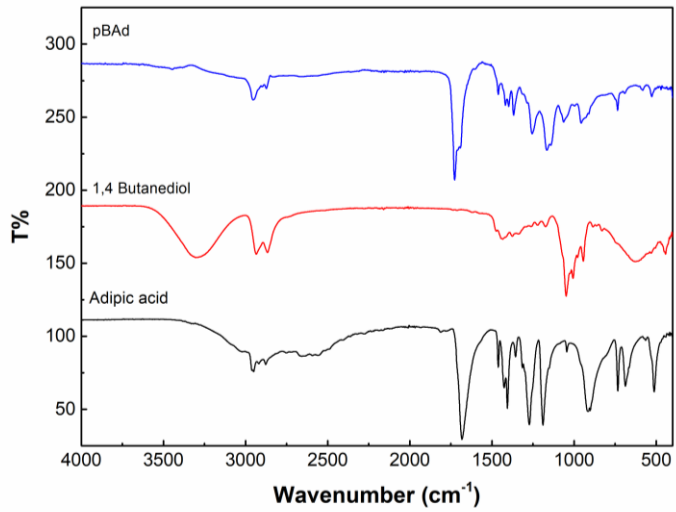
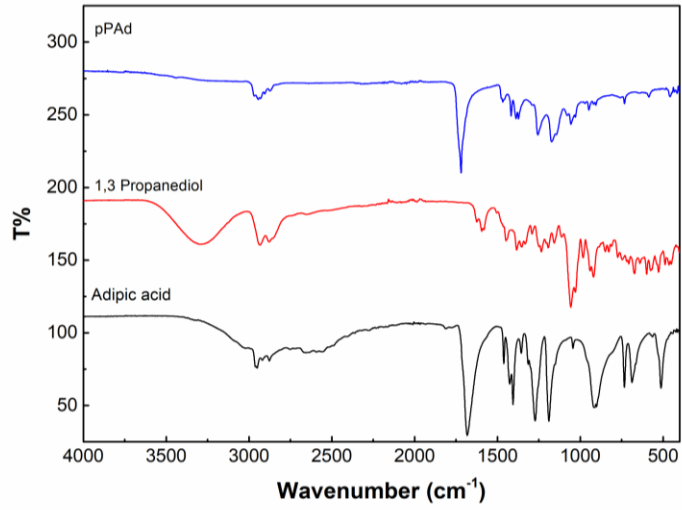
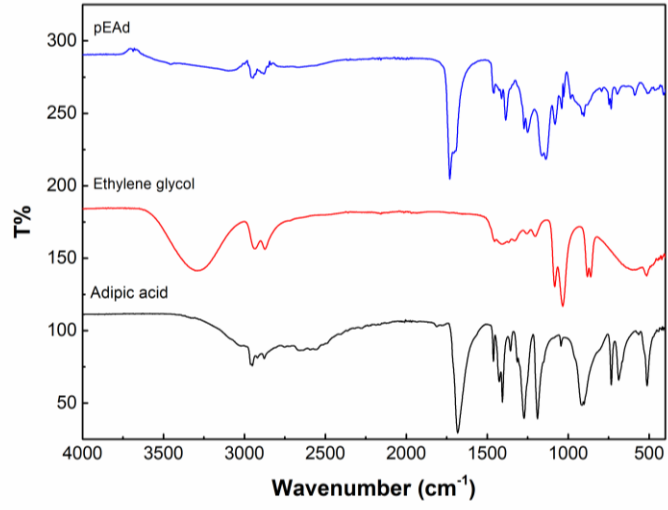


Şekil 4.2. Sentez sonu oluşan polyesterlerin görüntüleri

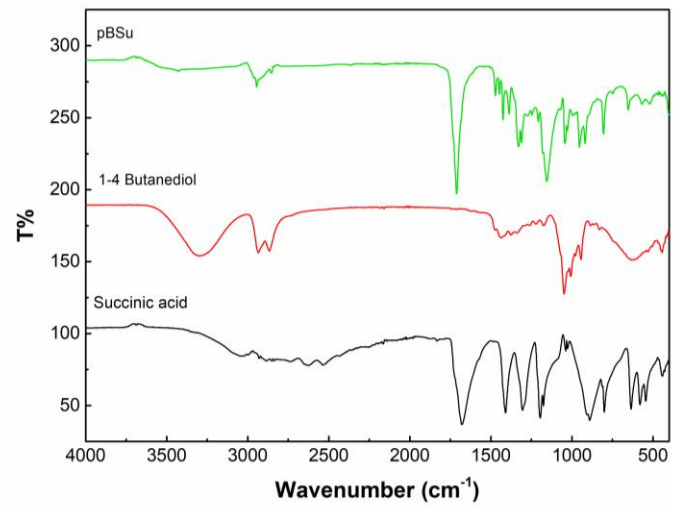
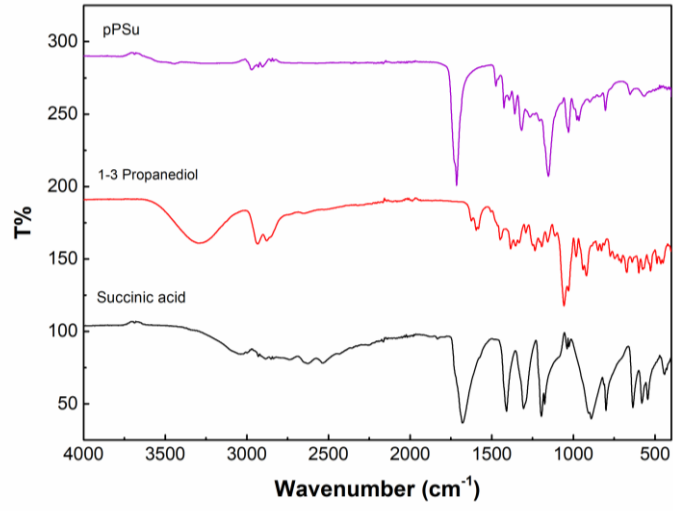
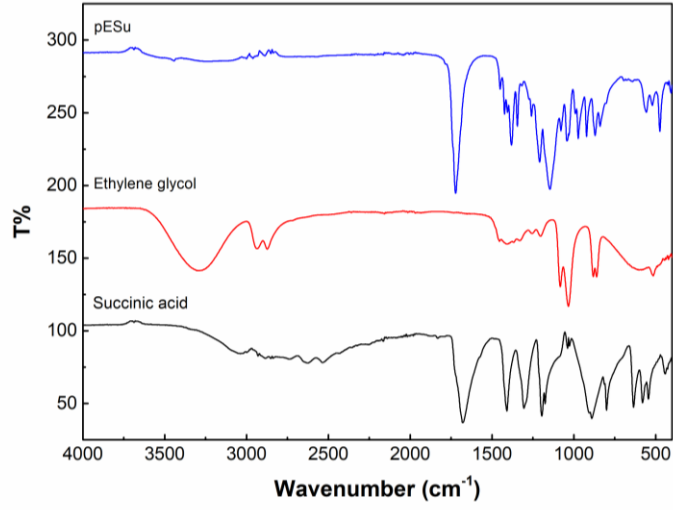
## 4.2. FTIR Spektroskopisi

Sentezlenen polyesterlerin kimyasal karakterizasyonu FTIR spektroskopisi analizi ile gerçekleştirildi. Analiz sonucu polyesterlere ait spektrum ıktıları, poliadipatlar Şekil 4.3 de, polisüksinatlar Şekil 4.4 ve polioksalatlar Şekil 4.5 de, verildi.

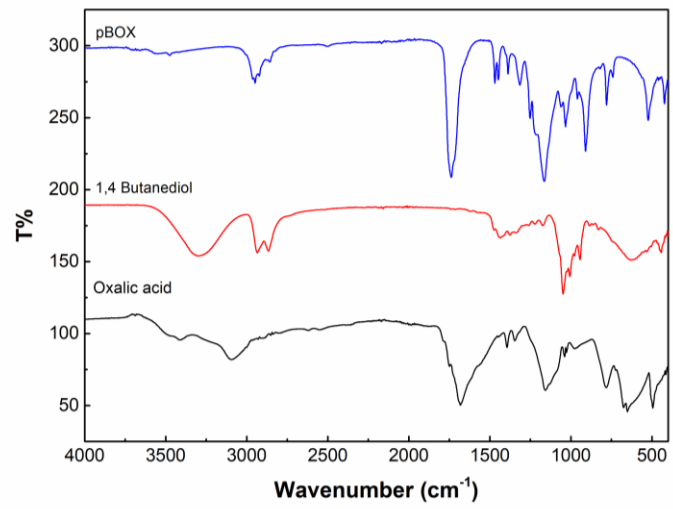
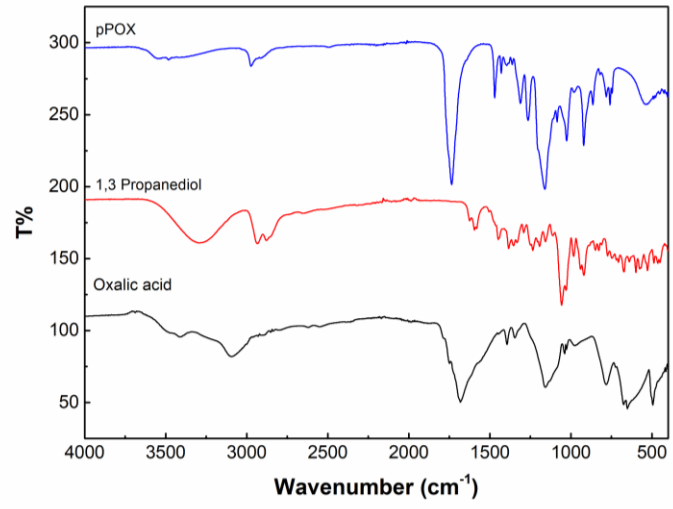
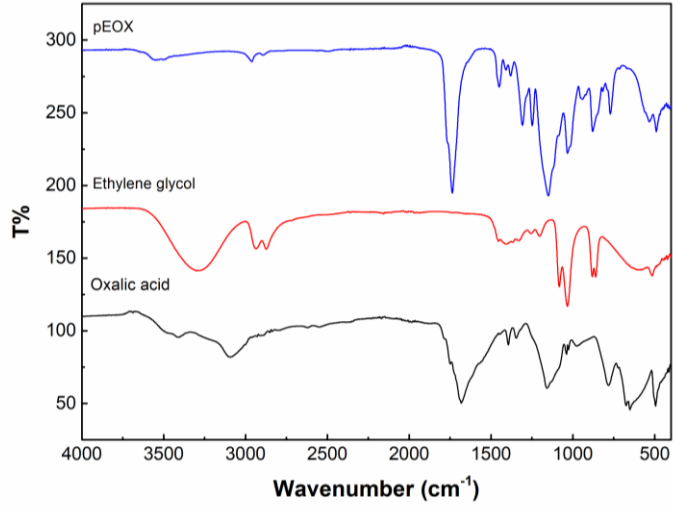
FTIR spektrası 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında taranarak alındı ve polyesterlere ait spektrumlar ve reaksiyon girdi maddelerinin de spektrası alınarak karşılaştırmalı olarak verildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, poliadipatlar, polisüksinatlar ve polioksalatların hepsinde de diol'den gelen -OH piklerinin kaybolması ve 1730  $\text{cm}^{-1}$  civarlarındaki karakteristik ester piklerinin varlığı reaksiyonların başarılı bir Şekilde gerçekleştiğinin kanıtıdır.



Şekil 4.3. pEAd, pPAd, pBAd'a ait FTIR spektrası



Şekil 4.4. pESu, pPSu, pBSu ait FTIR spektrası



Şekil 4.5. pEOX, pPOX, pBOX ait FTIR spektrası

### 4.3. PEGilasyon

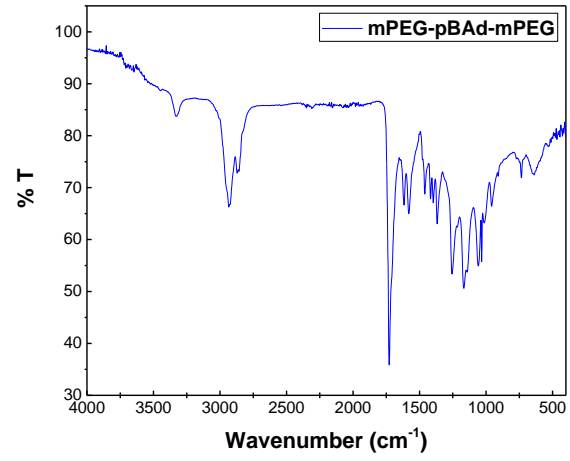
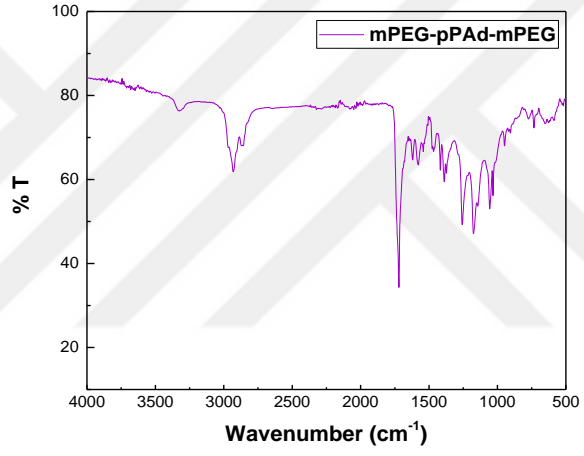
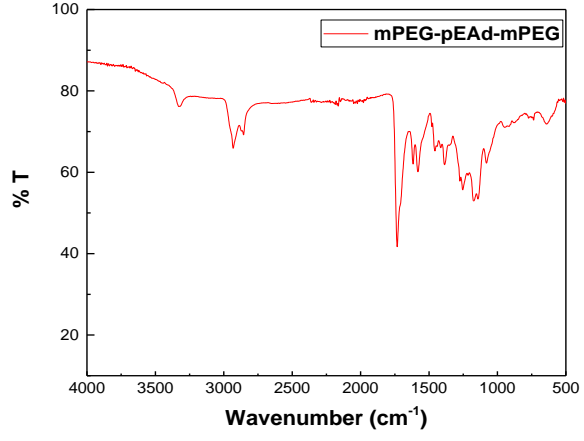
Poliadipatların PEGilasyonu, Şekil 4.6 da resmedildiği gibi oda şartlarında gerçekleştirildi. Başlangıçta yoğunluğu neredeyse suya yakın homojen bir karışım olan mPEG-550-HMDI karışımı 48 saat sonunda, özellikle balonun cidarlarında görülen jelimsi düşük moleküler ağırlıklı PEG görüntüsü reaksiyonun ilk aşamasının başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin fiziksel bir kanıtı niteliğindedir.



Şekil 4.6. PEGilasyon reaksiyonu

Bununla birlikte sadece fiziksel değil aynı zamanda kimyasal bir karakterizasyon olan FTIR spektroskopisi ile kopolimerler 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında tarandı. PEGlenmiş poliadipatlara (mPEG-pEAd-mPEG, mPEG-pPAAd-mPEG ve mPEG-pBAd-mPEG) ait FTIR spektrası Şekil 4.7 de verildi.

FTIR spektroskopisi grafik verileri değerlendirildiğinde 3330  $\text{cm}^{-1}$ -3350  $\text{cm}^{-1}$  ve 1618  $\text{cm}^{-1}$  civarında görülen N-H amine pikleri reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.7. mPEG-pEAd-mPEG, mPEG-pPAd-mPEG ve mPEG-pBAd-mPEG'e ait FTIR spektrası

#### 4.4. Grup sonu analizi ile moleküler ağırlığı tayini

Grup sonu analizi, dolaylı bir titrasyon yöntemidir. Bu yöntemde öncelikle PMDA çözeltisi 0.2 M konsantrasyonunda DMF çözücüsü kullanılarak hazırlandı ve belirli miktarlarda tartılan poliadipatların üzerine 10 mL 0.2 M PMDA eklenerek polimerin tamamen çözünmesi beklendi. Polimerler tamamen çözüldükten sonra üzerine katalizör olarak 1 mL 3 M IMDA eklendi ve 30 dk reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda, reaksiyona girmeyen PMDA'ları asitleştirmek için reaksiyon ortamına distile su ve indikatör olarak fenol kırmızısı eklendi. Hazırlanan karışım 0.1 N NaOH ile titre edildi. Çözelti rengi, renksiz formdan mor rengini alıncaya kadar titrasyona devam edildi. Harcanan NaOH hacmi not edilerek poliadipatların sayıca ortalama moleküler ağırlıkları formül (3.2) ye göre hesaplandı ve sonuçlar Tablo 4.1 de verildi.

Tablo 4.1. Poliadipatların sayıca ortalama moleküler ağırlıkları

Poliadipat	MA (g/ mol)
pPAd	2198
pBAd	2288
pEAd	2232

#### 4.5. Nanopartikül Üretim Optimizasyonu

##### 4.5.1. Nano-çöktürme yöntemi ile nanopartikül üretimi

Nano-çöktürme yönteminde nanopartiküller, polimerin bir organik çözücüde çözünerek hazırlanan çözeltisinden belirli bir miktarda alınarak belirli bir hacimde distile su içerisine damla damla eklendikten sonra, belirli bir süre vorteks veya sonikatöre tabii tutularak elde edilmektedir. Nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımları, kullanılan organik çözücüye, polimer çözeltisi hacmi: distile su hacmi arasındaki orana ve vorteks hız ve süresi gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir (Y. Liu ve ark., 2020). İlk olarak mPEG-pEAd-mPEG, mPEG-pPAd-mPEG ve mPEG-pBAd-mPEG tri-blok kopolimerleri sırayla DMSO içerisinde polimer konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde çözdürülerek hazırlandı.

Daha sonra hazırlanan kopolimer çözeltileri distile su içerisine, toplam hacim 1500 µl olacak şekilde, damla damla ilave edildi.

Sulu faz/organik faz oranı değiştirilerek elde edilen süspansiyonlar 60 sn boyunca yüksek hızda vortekse tabii tutuldu. Çıktı olarak, üretilen nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımları baz alınıp elde edilen veriler Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4 de sunuldu.

Tablo 4.2. mPEG-pEAd-mPEG kopolimerinden sulu faz/organik faz oranına bağlı nanopartikül üretimi

Polimer Kons. (mg/mL)	Oran (µL/µL)	Süre (sn)	Boyut (nm)	PDI
1	1400/100	60	1794.6	1.389
1	1300/200	60	908.3	0.566
1	1200/300	60	978.5	0.597
1	1100/400	60	2927.5	8.531
1	1000/500	60	854.0	0.363
1	900/600	60	2402.5	5.335
1	750/750	60	1001.0	0.103

Tablo 4.3. mPEG-pPAd-mPEG kopolimerden sulu faz/organik faz oranına bağlı nanopartikül üretimi

<b>Polimer Kons. (mg/mL)</b>	<b>Oran (<math>\mu\text{L}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
1	1400/100	60	141.4	0.261
1	1300/200	60	177.9	0.239
1	1200/300	60	533.2	0.377
1	1100/400	60	466.5	0.501
1	1000/500	60	1920.8	0.728
1	900/600	60	1311.8	0.752
1	750/750	60	1818	0.534

Tablo 4.4. mPEG-pBAd-mPEG kopolimerinden sulu faz/organik faz oranına bağlı nanopartikül üretimi

Polimer Kons. (mg/mL)	Oran ( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ )	Süre (sn)	Boyut (nm)	PDI
1	1400/100	60	2381.6	1.023
1	1300/200	60	758.3	0.439
1	1200/300	60	456.0	0.215
1	1100/400	60	481.0	0.114
1	1000/500	60	539.2	0.09
1	900/600	60	581.1	0.170
1	750/750	60	601.0	0.107

Üç farklı kopolimer için sulu faz/organik faz oranına bağlı optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen partiküllerin boyut ve boyut dağılımları nano ölçüde değil mikro ölçülerde olup aynı zamanda bazılarının polidispers bir boyut dağılımı sergilemeleri bu partiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak uygun olmadıklarını göstermektedir (Donahue ve ark., 2019). Toplam hacim 1500  $\mu\text{L}$  alınarak, sulu faz/organik faz oranına bağlı optimizasyon çalışmasında sadece mPEG-pBAd-mPEG kopolimeri kullanılarak 1400/100 ve 1300/200 oranlarında boyut: boyut dağılımları sırasıyla 141.4: 0.261 ve 177.1: 0.239 olarak ölçüldü. Fakat bu oranlar kullanılarak üretilen nanopartiküller kısa süre sonra agregat oluşturdu. Bu nedenle daha büyük ölçeklerde toplam hacim 4500  $\mu\text{L}$  olacak şekilde vorteks yerine sonikatör kullanılarak sonikasyon süresine bağlı optimizasyon yapıldı. Bu optimizasyon verilerine bağlı boyut ve boyut dağılımı çıktıları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6 da sunuldu.

Tablo 4.5. mPEG-pPAd-mPEG kopolimerden sonikasyon süresine bağlı nanopartikül üretimi

<b>Polimer Kons. (mg/mL)</b>	<b>Oran (<math>\mu\text{L}/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
1	3900/600	60	459.0	0.516
1	3900/600	30	320.6	0.507
1	3900/600	27	290.0	0.421
1	4200/300	25	866.0	0.537
1	3900/600	15	1064.1	0.502

Toplam hacim 4500  $\mu\text{L}$  olarak alındığında, mPEG-pPAd-mPEG kopolimerinden sulu faz/organik faz oranı: 3900/ 600 iken en iyi boyut boyut dağılım sonucu 27 sn sonikasyon süresi ile elde edildi. Bu sürenin altına düşüldüğünde ve su faz miktarı arttırıldığında boyut ve boyut dağılım değerlerinde yaklaşık üç kat artış görüldü.

R.Xu ve ark. tarafından mPEG-PLGA kopolimeri kullanılarak ürettikleri nanopartiküllerin boyutu 145.2 nm iken Yuan ve ark. meme kanserinde kullanılmak üzere mPEG-PLGA kopolimerinden ürettikleri nanopartiküllerin boyutunu 105.3 nm olarak bildirmişlerdir (R. Xu ve ark., 2020; Yuan ve ark., 2018). PEGile edilmiş kopolimerler kullanılarak üretilen bu nanopartiküllerin boyutları ile karşılaştırıldığında elde edilen bulgular, partikül boyutu açısından literatüre göre çok daha büyük ve boyut dağılımı polidisperdir. Bu nedenle metot optimizasyonuna devam edildi.

Tablo 4.6. mPEG-pEAd-mPEG kopolimerden sonikasyon süresine bağlı nanopartikül üretimi

Polimer Kons. (mg/mL)	Oran ( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ )	Süre (sn)	Boyut (nm)	PDI
1	3900/600	27	383.8	0.273
1	3000/1500	40	418.1	0.118
1	3000/1500	60	618.6	0.434
1	3000/1500	120	4757.0	1.186
2	3000/1500	40	511.3	0.234

mPEG-pEAd-mPEG kopolimeri kullanılarak üretilen nanopartiküllerin çıktıkları değerlendirildiğinde, sulu faz/ organik faz oranı: 3000/ 1500 iken sonikatör süresi arttıkça partikül boyutu mikro boyutlara doğru artış gösterirken sonikatör süresi 40 sn tutulduğunda boyut dağılımının monodispers olduğu görüldü. Fakat üretilen nanopartiküllerin boyutları 200 nm'nin üstündedir. Toplam hacim oranı 1500  $\mu\text{L}$ ' den 4500  $\mu\text{L}$ ' ye yükseltildiğinde nanopartiküllerin boyutları arttığı için mPEG-pBAd-mPEG kopolimerinden üretilen nanopartiküllerin sonikasyon süresine bağlı optimizasyonu toplam hacim 1500  $\mu\text{L}$  baz alınarak yapıldı. Sonuçlar Tablo 4.7 de verildi.

Tablo 4.7. mPEG-pBAd-mPEG kopolimerden sonikasyon süresine bağlı nanopartikül üretimi

Polimer Kons. (mg/mL)	Oran ( $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ )	Süre (sn)	Boyut (nm)	PDI
1	1400/100	30	302.0	0.085
1	1300/200	30	351.0	0.276
1	1200/300	30	352.0	0.250
1	1100/400	30	302.7	0.384
1	1400/100	20	510.6	0.307
1	1400/100	40	317.1	0.216
1	1400/100	60	315.2	0.253

Sonikatör süresi 30 saniyenin altına düşürüldüğünde partikül boyut ve boyut dağılımında artış gözlemlendi. Fakat sonikatör süresi 30 ile 60 sn arasında üretilen nanopartiküllerin boyutları 300 nm civarında ölçülmüştür. Nanopartikül boyutu 200 nm üzerinde olduğu durumlarda hücre tarafından fagosite edilmelerinin daha kolay olabildiği bildirilmiştir (Behzadi ve ark., 2017)(Donahue ve ark., 2019).

Nano-çöktürme yöntemi ile üretilen tüm nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımları değerlendirildiğinde, partikül boyutlarının 200 nm'nin altında olmaması, 200 nm altındaki değerlerin boyut dağılımlarının yüksek olması veya stabilizasyon sorunları nedeniyle nano-çöktürme yöntemi bu kopolimerlerden nanopartikül üretimi için uygun bulunmamıştır. PEGilenmiş poliadipatlara Risperidone yüklenerek üretilen partiküllerin boyutları mikro boyutta olup, tez kapsamında ürettiğimiz bu partiküller nano boyutta olup literatüre bir katkı sunmaktadır (Nanaki ve ark., 2018).

#### **4.5.2. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi**

Amfifilik kopolimerlerden nanopartiküllerin hazırlanabilmesi için öncelikle metot optimizasyonunun yapılması gerekmektedir. Bu nedenle polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan, atmosfer basıncı altında gerçekleştirilen kolay ve ekonomik bir yöntem olması sebebi ile tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma metodu kullanıldı (Suri ve ark., 2013).

Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde, belirli oranda yüzey aktif madde içeren bir çözelti içerisinde, su ile karışabilirliği düşük ve kaynama noktası yüksek olmayan bir çözücüde çözünmüş polimer solüsyonu damla damla ilave edildikten sonra belirli süre sonikasyona tabii tutulmaktadır. Daha sonra çözücü, oda şartlarında karıştırılarak, buharlaştırma yöntemi ile uzaklaştırılır. Bu metot kullanılarak kopolimerlerden üretilen nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımı, çözücünün cinsi, kullanılan yüzey aktif maddenin oranı, polimerin konsantrasyonu ve sonikasyon süresi gibi çeşitli parametrelere bağlıdır ve bu parametrelere bağlı olarak kopolimerlerden nanopartikül üretim optimizasyonu yapıldı.

Yüzey aktif madde oranının belirlenmesi için yüzey aktif madde olarak %4 (w/v) PVA (30 kDa) hazırlandıktan sonra filtre edildi (Kızılbey, 2019). Kopolimer türü, polimer konsantrasyonu, süre ve amplitude sabit tutularak, PVA oranı değişiminin partikül boyut ve boyut dağılımı üzerine etkisi belirlenerek Tablo 4.8 de sunuldu.

Tablo 4.8. Metot optimizasyonunda PVA oranının belirlenmesi

<b>Polimer Kons. (mg/mL)</b>	<b>PVA (%)</b>	<b>Amplitude (%)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
10	4	50	120	790	0.348
10	3	50	120	544.9	0.344
10	2	50	120	448.5	0.306
10	1	50	120	278.7	0.339
10	0.5	50	120	247.7	0.463

PVA konsantrasyonu azaltıldığında, partikül boyutu küçülmesine rağmen partikül boyut dağılımı yükseldiği ve polidispers bir dağılımın meydana geldiği belirlendi. PVA konsantrasyonu %1 iken partikül boyut ve boyut dağılımı istenilen değere en yakın olan değerlerdir.

Sonikasyon süresinin partikül boyut ve boyut dağılımı üzerine etkisini belirlemek için PVA konsantrasyonu %1 de sabit tutularak farklı sonikasyon sürelerinde nanopartikül üretimi gerçekleştirildi. Çıktılar boyut ve boyut dağılımı olarak Tablo 4.9 da sunuldu.

Tablo 4.9. Metot optimizasyonunda sonikasyon süresinin belirlenmesi

<b>Polimer Kons. (mg/mL)</b>	<b>PVA (%)</b>	<b>Amplitude (%)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
10	1	50	60	296.8	0.427
10	1	50	120	247.7	0.463
10	1	50	180	333.7	0.512
10	1	50	240	335.5	0.409

Sonikasyon süresi arttıkça partikül boyutu artarken partikül boyut dağılımı üzerinde ciddi bir etki oluşturmadı.

Partikül boyutu ve partikül boyut dağılımını etkileyen önemli parametreler arasında polimer konsantrasyonu bulunmaktadır. PVA konsantrasyonu %0.5 de, sonikasyon süresi 120 sn de sabit tutularak polimer konsantrasyonuna bağlı partikül boyut ve boyut dağılımı Tablo 4.10 ve Tablo 4.11 de verildi.

Tablo 4.10. mPEG-pPAd-mPEG kopolimerin konsantrasyonuna bağlı boyut optimizasyonu

<b>Polimer Kons. (mg/mL)</b>	<b>PVA (%)</b>	<b>Amp. (%)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
1	0.5	50	120	700.3	6.353
2	0.5	50	120	140.9	0.825
4	0.5	50	120	180.0	0.452
6	0.5	50	120	203.6	0.366
8	0.5	50	120	392.8	0.397
10	0.5	50	120	247.8	0.468

Tablo 4.11. mPEG-pEAd-mPEG kopolimerin konsantrasyonuna bağlı boyut optimizasyonu

<b>Polimer Kons. (mg/mL)</b>	<b>PVA (%)</b>	<b>Amp. (%)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
1	0.5	50	120	199.4	0.236
2	0.5	50	120	218.4	0.247
3	0.5	50	120	233.8	0.271
4	0.5	50	120	1307.8	2.640
6	0.5	50	120	1313.3	2.062

PVA konsantrasyonu %0.5 ve sonikasyon süresi 120 sn iken mPEG-pPAd-mPEG kopolimeri konsantrasyonu arttırıldığında, partikül boyutu küçülürken, mPEG-pEAd-mPEG kopolimeri konsantrasyonu arttırıldığında partikül boyutunun büyüdüğü dağılımın ise polidispers olduğu belirlendi. mPEG-pBAd-mPEG kopolimeri konsantrasyonuna bağlı boyut ve boyut dağılımı Tablo 4.12 de verildi.

Tablo 4.12. mPEG-pBAd-mPEG kopolimerin konsantrasyonuna bağlı boyut optimizasyonu

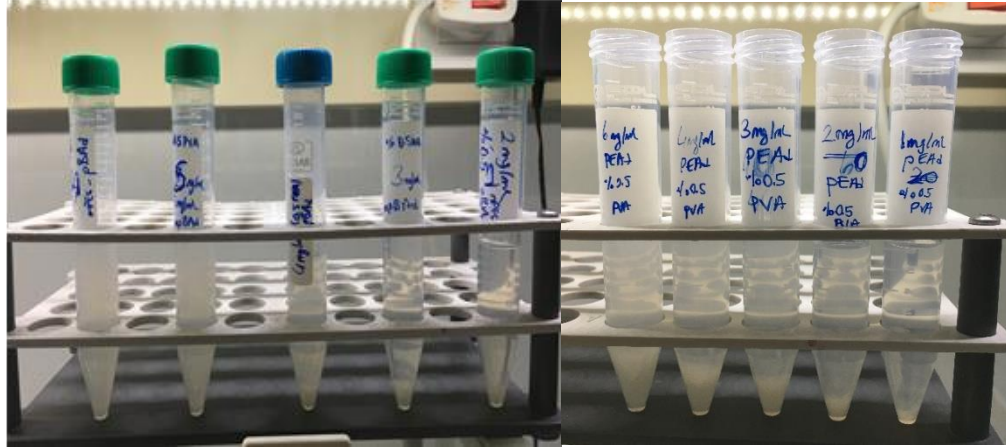
<b>Polimer Kons. (mg/mL)</b>	<b>PVA (%)</b>	<b>Amp. (%)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
2	0.5	50	120	171.4	0.188
4	0.5	50	120	178.1	0.130
6	0.5	50	120	184.0	0.186
2	2	50	120	306.7	0.398
3	0.5	50	120	171.4	0.351

mPEG-pBAd-mPEG ve mPEG-pEAd-mPEG kopolimerleri ile yapılan denemeler sonunda, nanopartiküllerin agregat oluşturarak çöktükleri gözlemlendi. Stabilite sorununun çözümü olarak ilk önce, stabilite optimizasyonundaki en etkili parametrelerden birinin yüzey aktif madde olması nedeniyle yüzey aktif madde oranının arttırılarak nanopartiküllerin stabil kalma sürelerini uzatılabilir.

Tablo 4.13. Kopolimerlerin konsantrasyonuna bağı boyut optimizasyonu

Kopolimer adı	Polimer Kons. (mg/mL)	PVA (%)	Süre (sn)	Boyut (nm)	PDI
mPEG-pPAd-mPEG	2	1	120	228.1	0.248
mPEG-pPAd-mPEG	5	1	120	223.6	0.202
mPEG-pBAd-mPEG	2	1	120	248.9	0.185
mPEG-pBAd-mPEG	5	1	120	234.7	0.119
mPEG-pEAd-mPEG	2	1	120	884.2	1.386
mPEG-pEAd-mPEG	5	1	120	991.4	0.847

Yüzey aktif madde oranının artırılması stabilitenin artmasında ciddi bir etki göstermemekle birlikte, nanopartiküllerin boyutlarında da önemli oranda artışa sebep oldu.



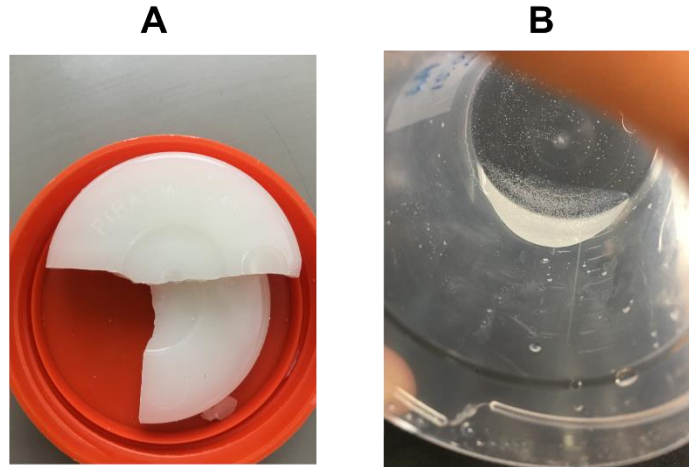
Şekil 4.8. Nanopartiküllerin stabilite problemi

Nano-çöktürme ve tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri ile üretilen tüm nanopartiküller stabilizasyon açısından değerlendirildiğinde, sentezlenen kopolimerlerin gövdesinde yer alan hidrofobik kısımların moleküler ağırlığı yüksek olduğu için hidrofilik kısımların zincir uzunlukları merkez hidrofobik kısma göre daha kısa kalmakta ve bu nedenle bu hidrofobik kısımlar etkileşerek agregat oluşturma eğilimi göstermektedirler. Dolayısıyla yeni bir yöntem optimizasyonundan ziyade daha düşük moleküler ağırlığa sahip poliadiptatlar sentezlenmelidir tezi ortaya kondu.

#### 4.5.3. Düşük moleküler ağırlıklı poliadiptatların sentezlenmesi

Düşük moleküler ağırlıklı poliadiptatlar, aynı şartlar altında sentezlendi. Poliester reaksiyonu bir kondenzasyon polimerizasyonu olduğundan, polimerin zincir uzunluğu zamana bağlı olarak kontrol edilebilmektedir. Bu nedenle reaksiyon süresi kısa tutulduğunda zincir uzunlukları daha kısa olan polimerler sentezlenebilir. Bu fikir ile yola çıkıldığında, katalizör ve solvent içermeyen ortamda, dikarboksilik asit: diol mol oranı 1: 1.2 olacak şekilde hazırlanıp kesikli bir cam reaktöre alınarak 2-3 mmHg vakum altında 2 saat reaksiyona bırakıldı. Burada ortam sıcaklıkları, dikarboksilik asidin erime sıcaklığı baz alınarak ayarlandı ve reaksiyon süresi %50 oranın da azaltıldı.

Sentezlenen poliadiptat ilk sentezlenen poliadiptatla kıyaslandığında, fiziksel olarak oldukça farklıydı (Şekil 4.9). İlk sentezlenen poliadiptatlar katı halde iken, reaksiyon süresi düşürüldüğünde düşük yoğunluğa sahip jelimsi formda polimerler elde edildi.



Şekil 4.9. Yüksek moleküler ağırlıklı pPAd görüntüsü B. Düşük moleküler ağırlıklı pPAd görüntüsü

Fiziksel farklılık sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin bir kanıtı olmasının yanı sıra kimyasal bir kanıt ortaya koymak için FTIR analizi yapıldı.

FTIR analizleri sonucunda  $1730\text{ cm}^{-1}$  civarında görülen ester pikleri sentezin başarıyla gerçekleştiğini ortaya koydu. Sentezlenen poliadipatların moleküler ağırlıkları grup sonu analiz yöntemi ile belirlenerek hesaplandı. Bulgular Tablo 4.14 de ilk sentez ürünleriyle karşılaştırmalı olarak verildi.

Tablo 4.14. Poliadipatların moleküler ağırlıkları

Poliadipatın adı	Düşük MA (g/mol)	MA (g/ mol)
pPAd	683	2198
pBAd	870	2288
pEAd	952	2232

Moleküler ağırlığı analiz sonuçları, düşük moleküler ağırlıklı poliadipat sentezinin başarıyla gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

Sentezlenen polimerler, yöntem kısmında bahsedilen PEGilasyon yöntemi ile PEGillendi ve hidrofilik grupların bağlandığı kopolimerler elde edildi. Bu kopolimerlerin kimyasal karakterizasyonu FTIR spektroskopisi analizi ile gerçekleştirildi.

Başarılı bir şekilde gerçekleştirilen sentez aşamasının ardından, nanopartikül üretim yöntemleri kullanılarak bu düşük zincir uzunluğuna sahip kopolimerlerden nanopartikül üretim optimizasyon çalışmaları yapıldı. İlk olarak tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi denendi. Kısaca:

- 4 mg mPEG-pPAd-mPEG tartılarak 2 mL DCM içerisinde çözüldü.
- 8 mL PVA çözeltisi 1200 rpm de karıştırılırken üzerine polimer çözeltisi damla damla eklendi.
- Tekli emülsiyon, karışımın 120 saniye sonikasyona tabii tutulması ile gerçekleştirildi.
- 800 rpm de çözücü karıştırılarak buharlaştırıldı.

PVA konsantrasyonuna bağlı değişim, partikül boyut ve boyut dağılımı çıktı olarak alınıp elde edilen bulgular Tablo 4.15 de verildi.

Tablo 4.15. PVA konsantrasyonuna bağlı partikül boyut ve boyut dağılımı

Konsantrasyon (mg/mL)	PVA (%)	Süre (sn)	Amp. (%)	Boyut (nm)	PDI
2	1	120	50	437.3	0.599
2	2	120	50	598.9	0.564

PVA konsantrasyonu arttırıldığında boyut artarken, boyut dağılımında anlamlı bir azalma meydana gelmedi. Partiküllerin boyut ve boyut dağılımlarının istenilen aralıkta olmaması ve sonuçlar arasında ciddi bir fark bulunmamasından dolayı PVA konsantrasyonu, boyutun en küçük olduğu %1 oranı sabit tutularak, polimer konsantrasyonu bağlı tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile bir seri deneme daha yapıldı ve sonuçlar Tablo 4.16 da verildi.

Tablo 4.16. Polimer konsantrasyonuna bağılı partikül boyut ve boyut dağılımı

Konsantrasyon (mg/mL)	PVA (%)	Süre (sn)	Amp. (%)	Boyut (nm)	PDI
1	1	120	50	203.0	0.888
2	1	120	50	238.9	0.519
3	1	120	50	244.3	0.415
4	1	120	50	258.1	0.383

Polimer konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunun arttığı fakat boyut dağılım indeksinin azaldığı yani monodispers bir dağılım elde edildiği görüldü. Bununla birlikte, PVA ve polimer konsantrasyonuna bağılı boyut ve boyut dağılımı indeksi değerlendirildiğinde, polimer konsantrasyonu 1 mg/mL iken partikül boyutu küçük olmasına rağmen partikül boyut dağılımının çok yüksek olması diğer yandan PVA oranı arttıkça partikül boyutunun artmasına rağmen düşük PVA konsantrasyonun PDI değeri çok yüksek olması farklı bir parametreye bağılı değişimlerin değerlendirilmesi gerekliliğini gösterdi. Bu nedenle, sonikasyon süresinin partikül boyut ve boyut dağılımına etkisi göz önünde bulunduruldu ve farklı sonikasyon sürelerindeki değişimler Tablo 4.17 de verildi.

Tablo 4.17. Sonikasyon süresine bağılı boyut değişimi

Konsantrasyon (mg/mL)	PVA (%)	Süre (sn)	Amp. (%)	Boyut (nm)	PDI
2	2	120	50	367.8	0.727
2	2	180	50	354.7	0.690

Bulgular, partikül boyut ve boyut dağılımında sonikasyon süresinin ciddi bir etki oluşturmadığını ortaya koydu ve son olarak amplitude oranına bağlı boyut ve boyut dağılım değişimi değerlendirildi. Bulgular Tablo 4.18 de verildi.

Tablo 4.18. Amplitude oranına bağlı boyut değişimi

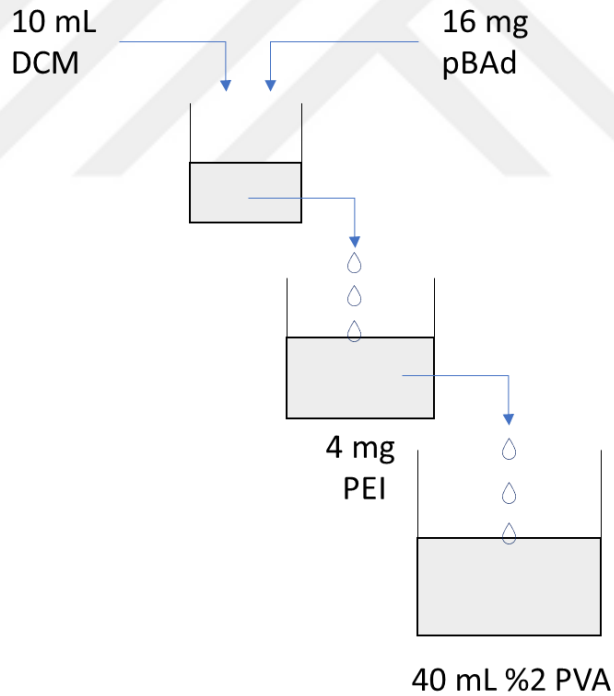
Konsantrasyon (mg/mL)	PVA (%)	Süre (sn)	Amp. (%)	Boyut (nm)	PDI
2	2	180	50	472.0	0.580
2	2	180	100	293.0	0.300

Düşük moleküler ağırlıklı pPAd içeren amfifilik kopolimer kullanılarak üretilen partiküllerin boyut dağılımı 0.7'nin altında olanların askıda kolloidal halde stabil kaldığı ve agregat oluşturmadıkları gözlemlendi. Buna rağmen, tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile istenilen boyut ve boyut dağılımına sahip partiküller üretilemedi. Burada partikül boyutunun büyük olmasının birçok sebebi olabilir. İlk çözüm önerisi olarak, düşük moleküler ağırlıklı poliadiyat kullanılmasına rağmen sentezlenen kopolimerin zincir uzunluğu sebebi ile partikül boyutunun belirli bir boyutun altına düşemediği tezi ortaya kondu ve hidrofobik polimere mPEG-550 bağlamak yerine katyonik bir polimer olan PEI'nin farklı yöntemlerle ile polimere hidrofilik bir özellik kazandırması hedeflenirken aynı zamanda katyonik özelliği sayesinde hücreye girişini kolaylaştıracak bir ilaç taşıyıcı sistem üretilbileceği düşünülmektedir (Xia ve ark., 2009).

#### 4.5.4. Poliadiyatlara PEI eklenmesi ile nanopartikül üretimi

PEI ilavesi ile nanopartikül üretiminde kullanılan yöntem modifiye edildi (J. Wang ve ark., 2010). Buna göre ilk önce bir cam beher içerisine 1 mg PEI tartıldı ve 20 mL %2 PVA çözeltisinde çözdürüldü. Hazırlanan bu çözelti 1500 rpm de karıştırılırken üzerine 16 mL DCM içerisinde çözünen ve son konsantrasyonu 2 mg/mL olan düşük moleküler ağırlıklı pBAd çözeltisi damla damla ilave edildi.

Karışım, çözücünün buharlaşması için oda sıcaklığında 900 rpm de karışmaya bırakıldı. Çözücü buharlaştıktan sonra oluşan partiküllerin çöktüğü gözlemlendi. Bu nedenle farklı bir yöntem denendi (Ding & Zhu, 2018). Şekil 4.10 da gösterildiği gibi, ilk önce 16 mg pBAd, 10 mL DCM de çözüldü. Bu çözelti 4 mg PEI üzerine eklenerek, PEI çözünüp pBAd ile homojen bir karışım oluşturan kadar karıştırıldı. Bu karışım, 40 mL %2 PVA içeren çözelti üzerine, çözelti 1500 rpm de karıştırılırken, yavaş yavaş eklendi. Emülsiyon, elde edilen karışımın %100 Amp. de 120 sn sonikasyona tabii tutulması ile gerçekleştirildi. Çözücü, 800 rpm de oda sıcaklığında yaklaşık 2 saat de buharlaştırıldı. Nanopartiküllerin boyutu 190 nm, boyut dağılımı 0.869 olarak ölçüldü. Boyut dağılımı üretilen nanopartiküllerin polidispers bir dağılım sergilediğini olduğunu göstermektedir. Polidispers hal, nanopartiküllerin kolloidal halde stabil kalamayacağını bir göstergesidir.



Şekil 4.10. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile pBAd: PEI karışımından nanopartikül sentez şeması

Nanopartiküllerin stabilizasyonu PVA oranına bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle bu protokole sadece PVA oranı değiştirilerek elde edilen sonuçlar Tablo 4.19 da verildi.

Tablo 4.19. PVA oranına bağı olarak pBAd: PEI yapıdaki nanopartiküllerin boyut değişimi

PVA (%)	pBAd: PEI (mg/mg)	Toplam Hacim	Boyut (nm)	PDI
1	4:16	40+10	559.3	0.342
2	4:16	40+10	291.0	0.659
3	4:16	40+10	319.0	0.920

Sonuçlar gösteriyor ki, PVA konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunda belirli bir oranda küçülme olmasına rağmen, boyut dağılımı indeksi çok yükselerek kabul edilebilir sınırların üzerine çıktı ve partikül boyut dağılımı polidispers bir hal aldı. Karıştırma hızının partikül boyutu üzerindeki etkisi göz önüne alınarak, karıştırma hızı 1500 rpm yerine 2200 rpm'e yükseltip, PEI: pBAd'nın farklı oranları kullanılarak elde edilen sonuçlar Tablo 4.20 de verildi.

Tablo 4.20. Nanopartiküllerin PEI/pBAd oranına bağı boyut değişimi

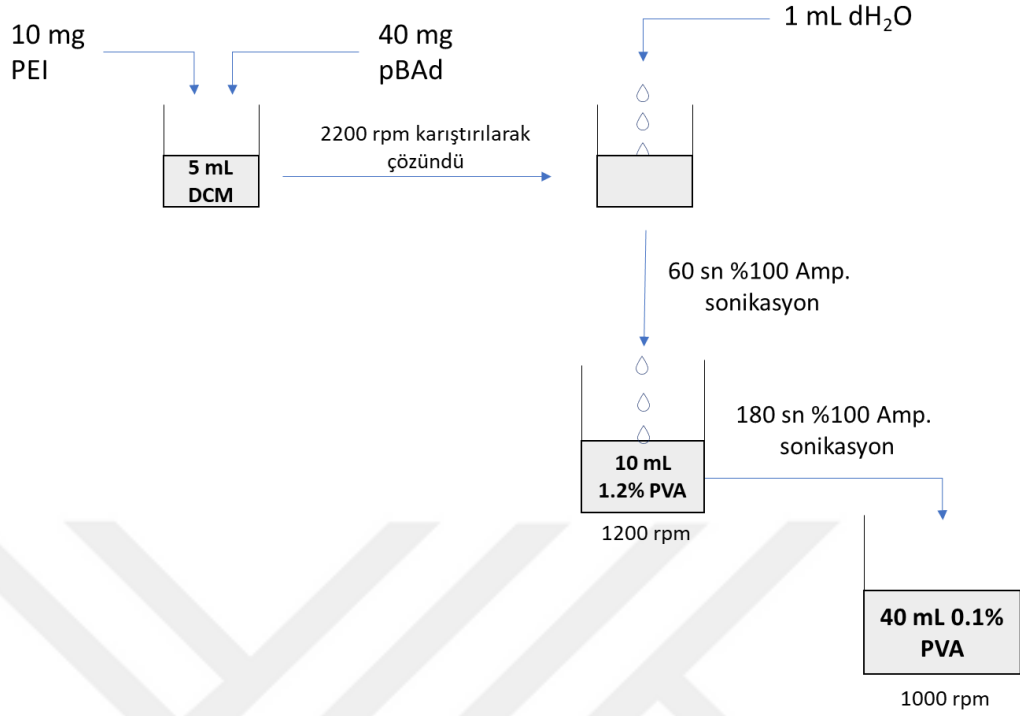
PVA (%)	pBAd (mg)	PEI (mg)	Boyut (nm)	PDI
2	15	5	2855.3	1.049
2	12	8	4533.6	1.334
2	10	10	5686.6	2.633

Bulgular, karıştırma hızının artırılması ile birlikte PEI miktarının artırılması partikül boyutunun büyümesine ve polidispers bir partikül boyut dağılımının oluştuğunu gösterdi. En yüksek değerlere pBAd: PEI 1:1 oranında kullanıldığında ulaşıldı. Sonuç olarak bu yöntemle elde edilen partiküllerin boyutları mikro seviyede olup istenilen aralıkta değildi. Bu aşamaya kadar farklı parametreler değiştirilerek, tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma metot optimizasyonu yapılmaya çalışılmış fakat bu metotla istenilen boyut ve boyut dağılımında stabil bir nanopartikül üretilemeyeceği sonucuna ulaşılmıştır.

Nano-çöktürme ve tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemlerinden farklı bir yöntem olarak çift emülsiyon çözücü uzaklaştırma yönteminin denenmesine karar verildi. Bu yöntem farmakolojik nanopartiküllerin üretiminde daha etkin olabilen ve enkapsülasyon verimini artıran bir yöntem olması ve son seyreltme basacağı ile birlikte partiküllerin nanoboyutta olma ihtimali göz önünde bulundurularak tercih edildi (Jenjob ve ark., 2019). Bununla birlikte, farklı moleküler ağırlıklarına sahip, 30 kDa ve 27 kDa, PVA kullanımı boyutta ciddi bir küçülme sağlamadığı için daha düşük moleküler ağırlıklı, 6 kDa, PVA kullanıldı.

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile S/Y/S (su içinde yağ içinde su) emülsiyon oluşturma basamakları aşağıda sıralandığı gibidir (Şekil 4.11). Kısaca:

- 40 mg pBAd ve 10 mg PEI 10 mL'lik cam beher içerisine tartıldı ve 5 mL DCM içerisinde çözüldü.
- Karışım 2200 rpm de karıştırılırken 1 mL distile su damla damla ilave edildi.
- İlk emülsiyon, S/Y, karışım %100 Amp. de 60 sn sonikasyona tabii tutularak gerçekleştirildi.
- 25 mL'lik beher içerisinde 10 mL %1.2 PVA çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti 1200 rpm de karıştırılırken, üzerine elde edilen ilk S/Y emülsiyonu damla damla ilave edildi.
- İkinci emülsiyon, S/Y/S, karışım %100 Amp. de 180 sn sonikasyona tabii tutularak gerçekleştirildi.
- S/Y/S emülsiyonu, 100 mL cam beher içerisinde bulunan 40 mL %0.1 PVA çözeltisine eklenerek seyreltildi.
- Çözücü 500 rpm de yaklaşık 2 saat karıştırılarak buharlaştırıldı (Abamor ve ark., 2019; Bivas-Benita ve ark., 2004).



Şekil 4.11. Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin şematik gösterimi

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak üretilen nanopartiküllerin boyutu 150.1 nm ve boyut dağılım indeksi 0.286 olarak ölçüldü. Fakat 24 saat sonra nanopartiküllerin çöktüğü gözlemlendi. Denenen tüm yöntemler arasında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile nanopartikül üretiminin gerçekleştirilebildiği ortaya kondu. PEI kullanılmadan sadece pBAd kullanılarak, çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hidrofobik özellikte nanopartiküller sentezlendi. Buradaki amaç, stabilite sorununun sebebinin PEI: pBAd oranı olup olmadığına karar vermektir.

Başlangıçta 50 mg pBAd 5 mL DCM de çözdürüldükten emülsiyon oluşturma basamakları çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde olduğu gibi gerçekleştirildi. pBAd nanopartiküllerinin boyutu 140.1 nm ve boyut dağılımı 0.122 olarak ölçüldü ve uzun süre stabilitesini korudu. Bu nedenle diğer PEI: poliadipat karışımlarından da aynı yöntem ile nanopartikül sentezi yapılarak elde edilen sonuçlar Tablo 4.21 de verildi.

Tablo 4.21. Çift emülsiyon yöntemi ile poliadipat: PEI karışım türüne bağlı olarak boyut ve boyut dağılım değişimi

<b>poliadipat: PEI</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Zeta pot. (mV)</b>
pEAd: PEI	35.5	1.883	+ 20.0
pBAd :PEI	158.9	0.180	+ 12.9
pPAd :PEI	151.3	0.191	+15.1

pEAd: PEI karışımından elde edilen partikülün boyut dağılımı yüksek, yani polidispers bir dağılım sergilediği için ölçülen partikül boyutu anlamlı değildir. Bu nedenle pEAd: PEI karışımı kullanılarak elde edilecek nanopartiküller için hem PVA hem de pEAd: PEI oranları değiştirilerek çeşitli metot optimizasyon denemeleri yapıldı. DLS cihazı ile ölçülen değerler çıktı olarak Tablo 4.22 de verildi.

pEAd:PEI hariç diğer kompleksler kullanılarak elde edilen partiküllerin boyut ve boyut dağılımları literatür ile uyumludur (Bivas-Benita ve ark., 2004).

Tablo 4.22. pEAd: PEI ve PVA oranına bağlı partikül boyut ve boyut dağılımındaki değişim

<b>PVA (%)</b>	<b>pEAd: PEI (mg/mg)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
2	80:20	60	23.5	0.466
2	40:10	60	17.1	0.554
0.1	40:10	60	6621.7	8.788
1.2	40:10	120	13.4	0.855
4	40:10	60	44.3	0.262

Aynı koşullar altında poliadipat/PEI karışım türü değiştirilerek, pEAd: PEI yerine pPAd: PEI kullanılarak bir seri deneme daha yapıldı elde edilen veriler Tablo 4.23 de verildi.

Partikül boyut dağılım indeksinin yüksek olması polidispers bir dağılımı yani nanopartiküllerin birbirleri ile aynı boyutta olmadığını göstermektedir (Wilson & Prud'homme, 2021).

Tablo 4.23. pPAd: PEI ve PVA oranına bağlı partikül boyut ve boyut dağılımındaki değişim

<b>PVA (%)</b>	<b>pPAd: PEI (mg/mg)</b>	<b>Süre (sn)</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>
2	40:10	60	141.0	0.183
2.5	40:10	60	133.4	0.178
3	40:10	60	132.8	0.161
4	40:10	60	131.0	0.191

PVA oranının artırılması pEAd: PEI karışımından üretilen partiküllerin boyutunun artmasına ve partikül boyut dağılımının ise monodispers olmasını sağlarken, pPAd: PEI karışımından elde edilen partiküllerin boyutunda çok az oranda küçülmeye sebep oldu. poliadipat: PEI arasındaki oran hem partikül boyutunu hem de üretilen nanopartiküllerin stabilitesini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Bu nedenle pPAd: PEI arasındaki oranın partikül boyutu üzerindeki etkisini değerlendirmek ve en ideal oranı belirlemek için bir seri deneme yapıldı ve elde edilen Tablo 4.24 de verildi.

Tablo 4.24. pPAd: PEI oranına bağlı partikül boyut ve boyut dağılımındaki değişim

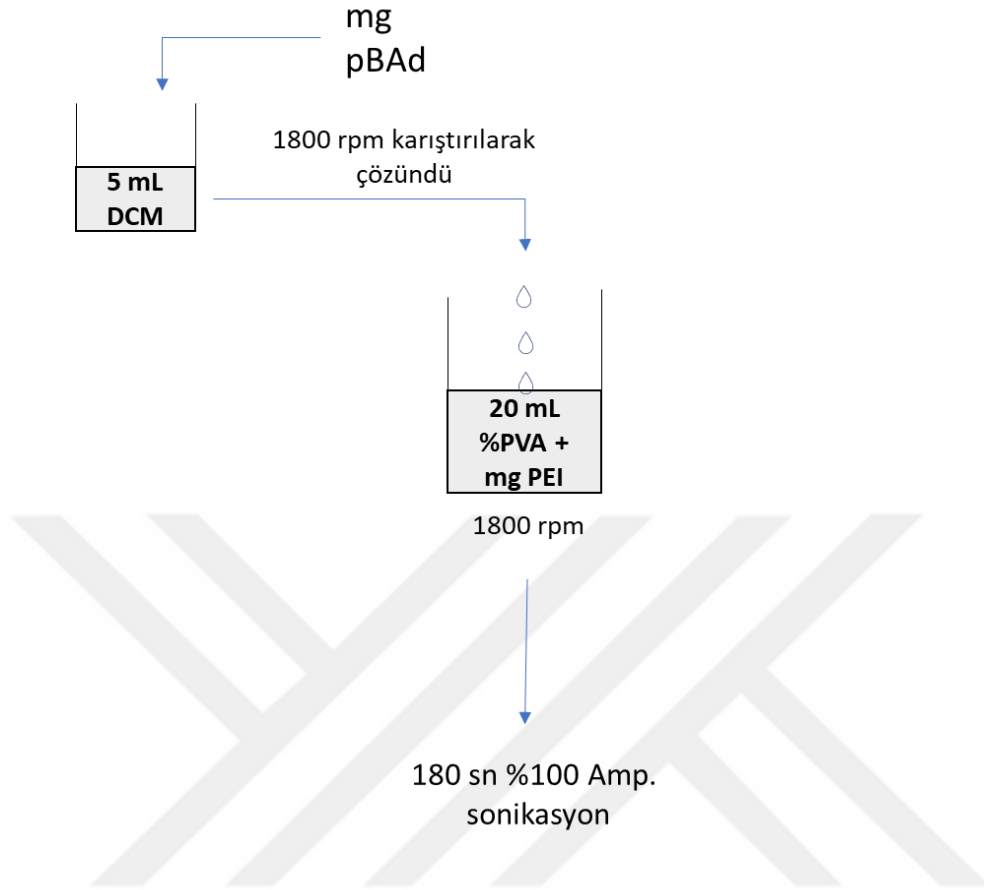
PVA (%)	pPAd: PEI (mg/mg)	Boyut (nm)	PDI
2	5:45	3187.3	4.540
2	10:40	39.0	0.781
2	15:35	55.3	0.539
2	20:30	64.1	0.349
2	25:25	80.3	0.276
2	30:20	88.7	0.300
2	35:15	111.1	0.243

Bulgular, pPAd: PEI karışımındaki pPAd oranı arttıkça partikül boyutunun arttığı ve partikül boyut dağılımının monodispers özellik sergilediği gösterdi. pPAd: PEI karışımından üretilecek nanopartiküller için en ideal koşul ‘%3 PVA (6 kDa) ve pPAd: PEI 40:10’ olarak belirlendi.

Poliadipatlara PEI ilavesi ile gerçekleştirilen karışimlardan üretilen nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımları hücre kültürü analizleri için uygun olmasına rağmen stabilite sorunun çözölememesi başka bir yöntemin denenmesi gerekliliğini ortaya koydu.

#### 4.5.5. PEI kaplama yöntemi ile nanopartikül üretimi

PEI ile poliadipatları kaplama yöntemi Şekil. 4.12 de resmedildiği gibi kısaca, belirlenen miktardaki pPAd, DCM de çözöndü. Elde edilen polimer çözeltisi, 20 mL belirli oranda PVA ve PEI içeren çözelti üzerine, çözelti 1800 rpm de karıştirılırken, damla damla ilave edildi. Elde edilen karışim, %100 Amp. de 180 sn sonikasyona tabii tutuldu. Daha sonra çözöcü 500 rpm de karıştirılarak buharlaştırıldı ve üretilen partiküllerin, partikül boyut ve boyut dağılımını DLS cihazı ile ölçölerken elde edilen sonuçlar Tablo 4.25 de verildi (Niza ve ark., 2020).



Şekil 4.12. PEI kaplama yöntemi

Tablo 4.25. PEI kaplama metot optimizasyonu

Konsantrasyon (mg/mL)	PVA (%)	PEI (mg)	Boyut (nm)	PDI
40/5	1	24	195.9	0.318
40/5	1	12	292.5	0.235
40/5	2	12	171.3	0.222
25/5	2	12	175.1	0.299
50/5	0.2	30	192.8	0.059
50/5	0.2	30	3590.2	2.111

PEI kaplama yöntemi ile istenilen partikül boyut ve boyut dağılımı elde edilmesine rağmen, bu yöntem kullanılarak da stabilite sorunu çözülememiştir.

Sonuç olarak PEI ekleme veya PEI kaplama stratejisi partikül boyut ve boyut dağılımı sorununa bir çözüm üretirken, stabilite sorunu için bir çözüm ortaya konulamamıştır. PEGilasyonun nanopartikül stabilitesine artırdığı yönündeki çalışmalar değerlendirildiğinde, PEGilasyon oranı düşürülerek hem daha küçük boyutlarda hem de stabil olabilen nanopartiküllerin üretilebileceği fikri ortaya konuldu (Logie ve ark., 2014)(Mosqueira ve ark., 2001).

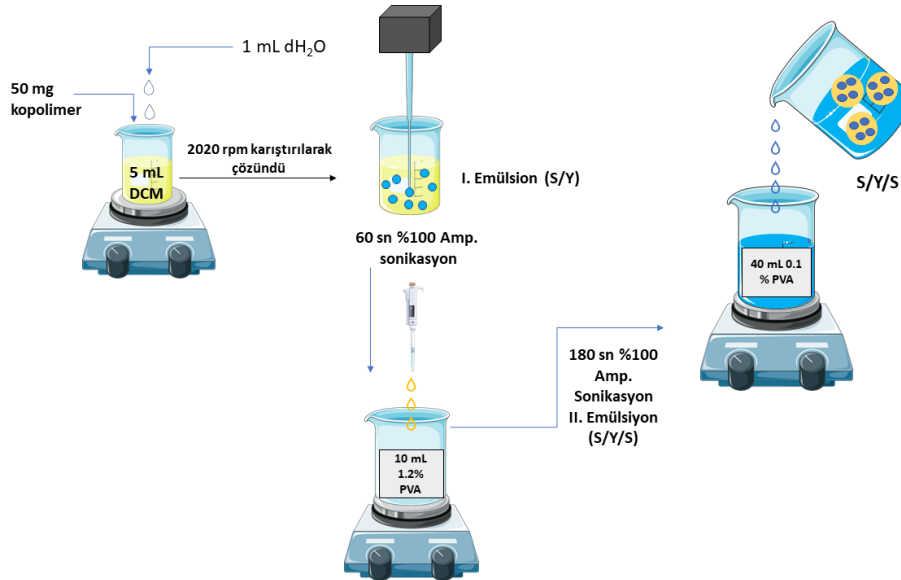
#### **4.5.6. Düşük PEGilasyon oranı ile sentezlenen kopolimerlerden nanopartikül üretimi**

Düşük moleküler ağırlıklı sentezlenen poliadiptların (pPAd, pBAd ve pEAd) PEGilasyon oranı %100 oranından %10 oranına düşürüldü (C. Yang ve ark., 2018). PEGilasyon yöntemi, metot kısmında anlatıldığı gibi uygulandı fakat poliadipt: mPEG -550 oranı 1: 0.1 olarak ayarlandı. Sentezlenen kopolimerlerin, PA, BA ve EA, fiziksel görüntüsü 1:1 oranında sentezlenenlerden daha farklı idi. Kimyasal karakterizasyonları için yapılan FTIR analiz sonuçları, sentezlerin başarıyla gerçekleştiği kanıtladı. Sentezlenen bu kopolimerlerden PA kullanılarak hem tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma hem de çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri ile nanopartikül sentezi gerçekleştirildi (Abamor ve ark., 2019). Nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımı Tablo 4.26 da verildi.

Tablo 4.26. PA kopolimerinden sentezlenen nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımları

PA konsantrasyonu (mg/mL)	PVA (%)	Metot	Size	PDI
2	2	TE	190.3	0.430
2	4	TE	240.3	0.255
10	2	ÇE	-	-
10	4	ÇE	185.0	0.146

Bulgular gösteriyor ki en ideal partikül boyut ve boyut dağılımı çift emülsiyon çözücü bulaştırma yöntemi ile elde edildi. Fakat bu yöntemde PVA oranında ne kadar etkili olduğu bir kez daha gösterilmiş oldu. Bu tez çalışmasının bundan sonraki nanopartikül üretim aşamalarında kullanılacak nihai prosedür Şekil 4.13 de gösterildi.



Şekil 4.13. Nanopartikül için belirlenen nihai prosedürün şematik gösterimi

Şekil 4.13 de gösterilen prosedür ile PA, BA ve EA kopolimerlerinden üretilen nanopartiküllerin boyutları, boyut dağılımları ve zeta potansiyel verileri Tablo 4.27 de verildi. Herhangi bir ilaç yüklü olmayan bu nanotaşıyıcılar, PA kopolimerinden üretilen “PANPs”, BA kopolimerinden üretilen “BANPs” ve EA kopolimerinden üretilen “EANPs” olarak isimlendirildi.

Tablo 4.27. Optimize edilmiş metot kullanılarak sentezlenen kopolimerlerden üretilen nanopartiküllerin yıkama prosedürü öncesi boyut ve boyut dağılımları

Nanopartikül adı	Boyut (nm)	PDI
PANPs_YÖ	180.6	0.178
BANPs_YÖ	146.1	0.199
EANPs_YÖ	150.9	0.575

Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminin modifiye edilmesiyle üretilen nanopartikül süspansiyonları, yüzey aktif maddenin (PVA'nın) uzaklaştırılması için öncelikle 10 000 rpm de 6 dk santrifüj edildiler ve ardından distile su ile iki kere yıkandıktan sonra DLS ile boyut ve boyut dağılımları zeta potansiyelleri ölçüldü. Boyut dağılım ve zeta potansiyellerine ait grafikler Şekil 4.14 ve boyut, PDI ve zeta potansiyel verileri Tablo 4.28 de sunuldu.

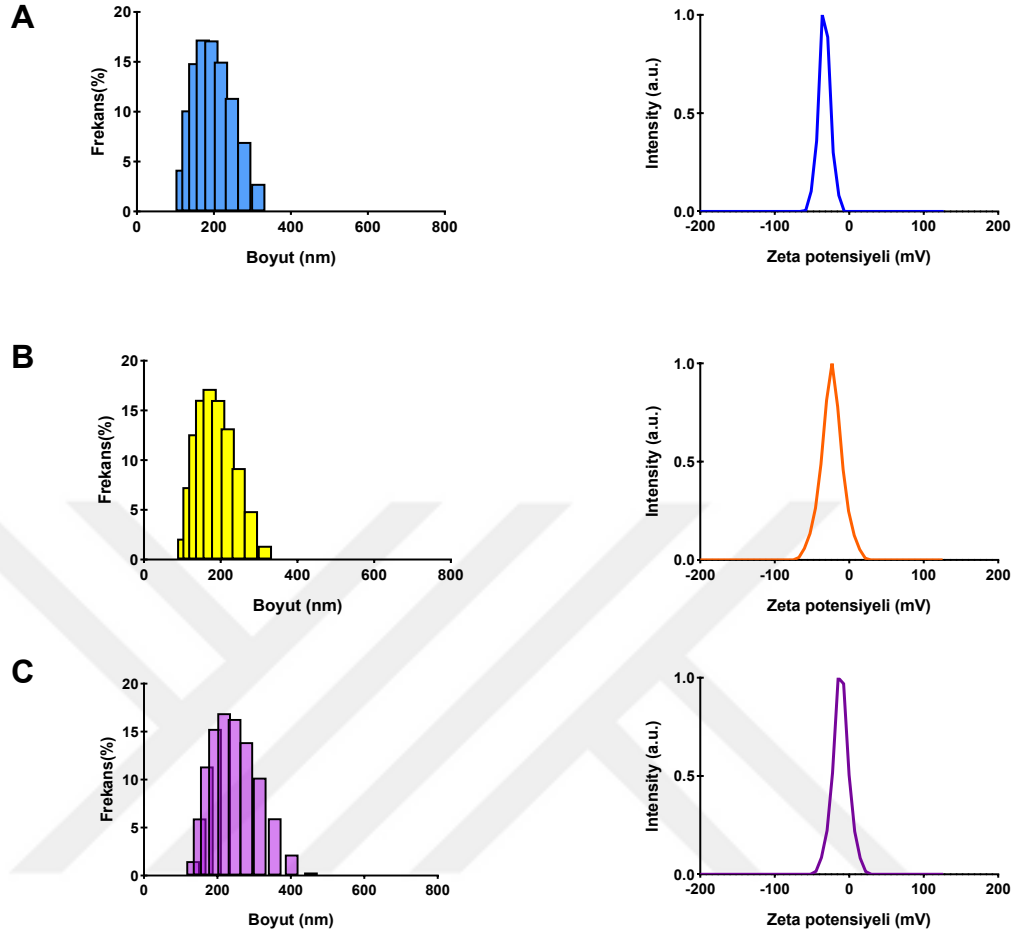
Tablo 4.28. Optimize edilmiş metot kullanılarak sentezlenen kopolimerlerden üretilen nanopartiküllerin yıkama prosedürü sonrası boyut ve boyut dağılımları

Nanotayıyıcı adı	Boyut (nm)	PDI	Zeta pot. (mV)
PANPs	169.2	0.088	-33.1
BANPs	164.9	0.170	-20.2
EANPs	197.6	0.310	-11.3

Nanotaşıyıcıların hücre tarafından alımı önemli bir biyolojik süreç olup, partikülün hücre zarına yapışma süreci ve partikülün hücre içine alınımı içeren bu biyolojik süreç için partikül boyutu partikülün hücre zarına yapışmasını etkileyen önemli faktörlerden biridir. Nanopartikül boyutunun 200 nm'nin üzerinde olduğu durumlarda partikül, hücre tarafında fagosite edilebilirken 100-200 nm aralığındaki partiküllerin hücre alım sonuçlarının en ideal olarak bildirilmekte ve daha küçük boyuta sahip nanopartiküllerin hücre alımı için eşik değeri 50 nm olarak rapor edilmiştir (Banik ve ark., 2016; Behzadi ve ark., 2017).

Bu bilgiler ışığında elde edilen bulgular, EA kopolimerinden üretilen nanopartiküllere göre, BA ve PA kopolimerlerinden üretilen nanopartiküllerin boyutlarının daha küçük, boyut dağılımlarının ise daha ideal olduğunu ortaya koydu.

Polimerik nanopartikül sentezinde, partikül boyutunu etkileyen en önemli faktörlerden biri de polimerin moleküler ağırlığıdır. Burada EA kopolimerinin, hidrofobik gövdesini oluşturan pEAd'ın moleküler ağırlığının diğerlerinden daha yüksek olmasının bir etki yarattığı söylenebilir (Mittal ve ark., 2007).



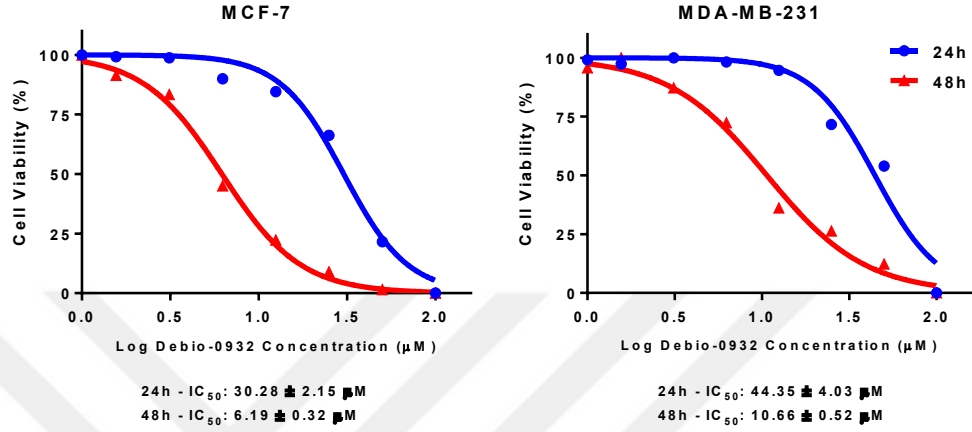
Şekil 4.14. PA, BA ve EA kopolimerlerinden elde edilen nanopartiküllerin boyut dağılımı ve zeta potansiyel grafikleri A: PANPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli, B: BANPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli, C: EANPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli

Şekil 4.14 de verilen boyut dağılımına ait grafiksel veriler, nanopartiküllere ait PDI verilerininin 0.7' den küçük olması nanotaşıyıcıların monodispers bir yapıya sahip olduğunu, zeta potansiyel verileri ise nanotaşıyıcıların kollodial yapıda stabil olduklarını ortaya koymuştur (Khorrami ve ark., 2018) (Kaplan ve ark., 2021).

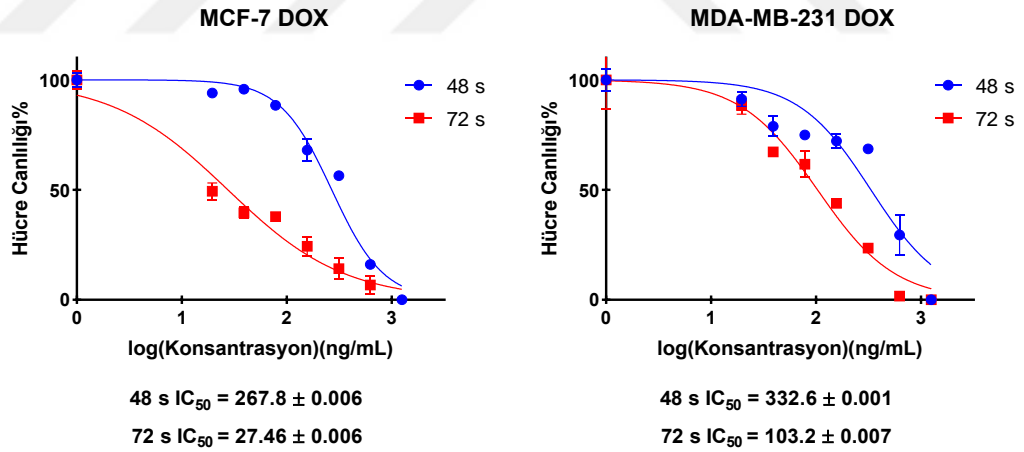
#### 4.5.7. Kemoterapötik ajanın belirlenmesi

Metot optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra, üretilen ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmek üzere iki farklı ilaç belirlendi. Bunlar kanser hücresinin apoptoza uğramasında farklı ölüm mekanizmalarına sahip ticari ilaçlardır.

Yenil nesil HSP90 ısı şok protein inhibitörü olan, Debio-932 ve meme kanseri tedavisinde ve *in vitro/in vivo* çalışmalarda referans olarak kullanılan DOX ile MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ön deneme yapıldı (Özgür ve ark., 2021).



Şekil 4.15. Debio-0932 ile muamele edilmiş MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 24 ve 48 saatlerdeki IC50 logaritmik eğrileri



Şekil 4.16. DOX ile muamele edilmiş MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının 48 ve 72 saatlerdeki IC50 logaritmik eğrileri

Referans olarak kullanılan DOX'un Debio-932'ye göre daha uzun sürede daha düşük konsantrasyonlarda etkili olması nedeniyle, ileriki çalışmalarda ilaç olarak DOX'un kullanılmasına karar verildi.

#### 4.5.8. Enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanması

Nanotaşıyıcılara yüklenecek kemoterapötik ajan ‘DOX’ ve hücre sel alım deneylerinde kullanılmak üzere, floresans özelliğinden faydalanılacak olan boyar madde ‘ICG’ olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada Doksorubisin’e eşdeğer Doksorubisin hidroklorit (DOX HCl) kullanıldı. DOX HCl ve ICG floresan özelliğe sahip oldukları için karakteristik eksitasyon ve emisyon dalga boylarına sahiplerdir. Bu özelliklerinden faydalanarak nanotaşıyıcıların DOX HCl ve ICG enkapsülasyon verimlilikleri spektrofotometre cihazı ile belirlendi.

DOX HCl’ in sudaki çözünürlüğü literatürde 50 mg/10 mL olarak bildirilmektedir. DOX HCl aynı zamanda DMSO ve DCM gibi polar solventlerde de belirli oranlarda çözünebilmektedir. Bu nedenle enkapsülasyon verimliliği belirlemek için öncelikle DOX HCl suda çözünerek elde edilen nanotaşıyıcı sistemin enkapsülasyon verimliliği hesaplandı. DOX HCl enkapsülasyon prosedürü kısaca aşağıdaki şekilde özetlendi.

- 1.95 mg DOX HCl, 1 mL dH<sub>2</sub>O (distile su) de çözüldü. Bir mikrosantrifüj tüpü içerisinde hazırlanan çözeltinin ışıktan korunması için ependorf tüp alüminyum folyo ile sarıldı.
- 50 mg kopolimer bir cam beher içerisine tartılarak 2020 rpm de 5 mL DCM de çözüldü.
- 1.95 mg/mL konsantrasyonundaki DOX HCl’ den 1 mL 0.5 mg/mL konsantrasyonundaki çözelti seyrelterek elde edildi. Ardından bu 1 mL 0.5 mg/mL konsantrasyonundaki çözelti, karışır durumdaki PA çözeltisi içerisine damla damla ilave edildi.
- İlk emülsiyon, karışım %100 Amp. de 60 sn sonikasyona tabii tutularak gerçekleştirildi.
- 10 mL %4 PVA (polivinil alkol) içeren çözelti içerisine, bu çözelti 1200 rpm de karışırken, ilk emülsiyon damla damla ilave edildi.
- İkinci emülsiyon, karışım %100 Amp. de 180 sn sonikasyona tabii tutularak gerçekleştirildi.

- Son olarak elde edilen bu karışım, 40 mL %0.1 PVA içeren çözelti içerisine yavaş yavaş eklenerek seyreltilmiştir.
- Çözücü, oda şartlarında 2 saat 500 rpm karıştırılarak uzaklaştırıldıktan sonra nanopartikül süspansiyonundan 2 mL alınıp mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 10 000 rpm de 6 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmında kalan DOX HCl kapsüllenmeyen miktarı ifade etmektedir. Süpernatant kısmından alınan örnek spektroflorete (Şekil 4.17) de kullanılarak absorbans verileri ölçüldü.

DOX HCl ve ICG ye ait eksitasyon ve emisyon dalga boyları Tablo 4. 29 da verildi.

Tablo 4.29 DOX HCl ve ICG' nin eksitasyon ve emisyon dalga boyları

Madde adı	Eksitasyon dalga boyu (nm)	Emisyon dalga boyu (nm)
DOX HCl	~ 480	~ 590
ICG	~ 789	~ 814



Şekil 0.17. Spektroflorete cihazı

Spektroflorometre cihazının özellikleri Tablo 4.29 da verildi ve buna göre DOX HCl ölçümleri için Mavi eksitasyon filtresi kullanılıp, 2. kanaldaki bulgu kullanılırken, ICG ölçümleri için kırmızı eksitasyon filtresi kullanılıp, bulgu 3. kanaldan elde edildi.

Tablo 0.30. Spektroflorometre cihazının özellikleri

Eksitasyon Filtreleri	Emülsiyon Filtreleri
Mavi (442-497 nm)	1.Kanal 514-567 nm
Yeşil (490-558 nm)	2.Kanal 565-650 nm
Kırmızı (613-662 nm)	3.Kanal 665-740 nm
UV (361-389nm)	-

Tüm bu bilgiler ışığında enkapsülasyon verimliliği aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\% EE = \left( 1 - \frac{A_X}{A_T} \right) \times 100 \dots \dots \dots (4.1)$$

%EE: Enkapsülasyon verimliliği

A<sub>X</sub>: X maddesinin kapsüllenmeyen miktarının absorbans değeri

A<sub>T</sub>: Başlangıçta eklenen miktarın absorbans

Enkapsülasyon verimliliği formül 4.1 deki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\% EE = \left( 1 - \frac{49601.127}{49778.412} \right) \times 100 = \%0.36$$

Enkapsülasyon verimliliği çok düşük olduğu için DOX HCl, DMSO da çözünerek kapsüle edildi. Kısaca:

- 50 mg kopolimer bir cam beher içerisine tartılarak 2020 rpm de 5 mL DCM de çözüldü.

- 10 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde DOX HCl, DMSO kullanılarak hazırlandı ve bu çözeltiden 50 µL alınarak PA çözeltisine eklenip, kapsülasyonun gerçekleşmesi için 25 dk boyunca 2020 rpm de karıştırıldı. Ardından 1 mL dH<sub>2</sub>O, karışır durumdaki PA çözeltisi içerisine damla damla ilave edildi.
- İlk emülsiyon, karışım %100 Amp. de 60 sn sonikasyona tabii tutularak gerçekleştirildi.
- 10 mL %4 PVA içeren çözelti içerisine, bu çözelti 1200 rpm de karışırken, ilk emülsiyon damla damla ilave edildi.
- İkinci emülsiyon, karışım %100 Amp. de 180 sn sonikasyona tabii tutularak gerçekleştirildi.
- Son olarak elde edilen bu karışım, 40 mL %0.1 PVA içeren çözelti içerisine yavaş yavaş eklenerek seyreltildi.
- Çözücü, oda şartlarında 2 saat 500 rpm karıştırılarak uzaklaştırıldıktan sonra nanopartikül süspansiyonundan 2 mL alınıp ependorf tüpe aktarıldı ve 10 000 rpm de 6 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmından alınan örnek spektrofotometre kullanılarak absorbans verileri ölçüldü.

$$\%EE = \left(1 - \frac{49870.411}{71071.562}\right) \times 100 = \%30$$

Son olarak DCM de çözülen DOX HCl kullanılarak enkapsülasyon verimliliği hesaplandı.

Kısaca:

- 50 mg kopolimer bir cam beher içerisine tartılarak 2020 rpm de 5 mL DCM de çözüldü.
- 10 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde DOX HCl, DCM kullanılarak hazırlandı ve bu çözeltiden 50 µL alınarak PA çözeltisine eklenip, kapsülasyonun gerçekleşmesi için 60 dk boyunca 2020 rpm de karıştırıldı. Ardından bu 1 mL dH<sub>2</sub>O, karışır durumdaki PA çözeltisi içerisine damla damla ilave edildi.

- İlk emülsiyon, karışım %100 Amp. de 60 sn sonikasyona tabii tutularak gerçekleştirildi.
- 10 mL %4 PVA içeren çözelti içerisine, bu çözelti 1200 rpm de karışırken, ilk emülsiyon damla damla ilave edildi.
- İkinci emülsiyon, karışım %100 Amp. de 180 sn sonikasyona tabii tutularak gerçekleştirildi.
- Son olarak elde edilen bu karışım, 40 mL %0.1 PVA içeren çözelti içerisine yavaş yavaş eklenerek seyreltilti.
- Çözücü, oda şartlarında 2 saat 500 rpm karıştırılarak uzaklaştırıldıktan sonra nanopartikül süspansiyonundan 2 mL alınıp mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 10 000 rpm de 6 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmından alınan örnek spektrofloreometre kullanılarak absorbans verileri ölçüldü.

$$\%EE = \left(1 - \frac{18969.007}{32431.758}\right) \times 100 = \%41.5$$

DOX HCl' in DCM de çözünerek, kopolimer çözeltisi ile 60 dk muamele edildiği prosedür ile en yüksek enkapsülasyon verimliliğine ulaşılmıştır.

#### 4.5.9. Nanotaşıyıcıların karakterizasyonu

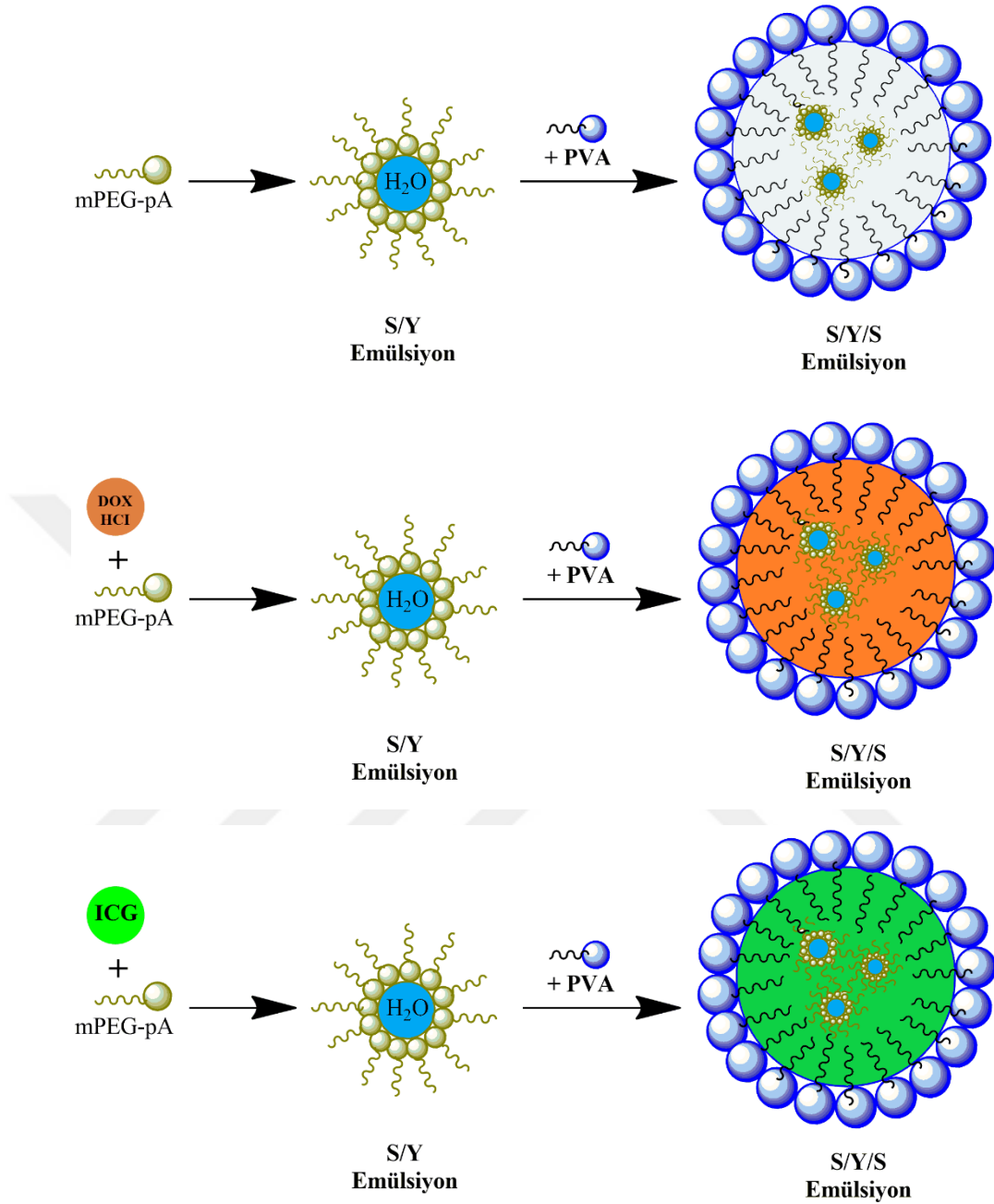
En yüksek enkapsülasyon verimliliği sağlayan prosedür ile elde edilen nihai nanotaşıyıcılar, DOX HCl yüklü olanlar, “PADNPs, BADNPs ve EADNPs” olarak adlandırılırken, ICG yüklü olanlar “PAINPs, BAINPs ve EAINPs” olarak adlandırıldı. PA, BA ve EA kopolimerlerinin DOX HCl ve ICG enkapsülasyon verimlilikleri Tablo 4.31 de verildi.

Tablo 4.31. DOX HCl ve ICG ajanlarının enkapsülasyon verimlilikleri

DOX HCl	%EE	ICG	%EE
PADNPs	57	PAINPs	47
BADNPs	58	BAINPs	46
EADNPs	44.5	EAINPs	41.2

Bulgular, BA kopolimerinin en yüksek DOX HCl enkapsülasyonuna sahipken EA kopolimeri en düşük enkapsülasyon verimliliği sergilediğini göstermektedir. Ayrıca her üç nanotayıyıcı DOX HCl' i ICG'ye göre daha yüksek oranda enkapsüle etmektedir.

DOX HCl ve ICG yüklü nanopartiküller ile boş nanopartiküllerin optimize edilmiş üretim metotları ile üretilen nanotayıyıcıların grafiksel tasarımı Şekil 4.18 de gösterildiği gibi resmedildi.

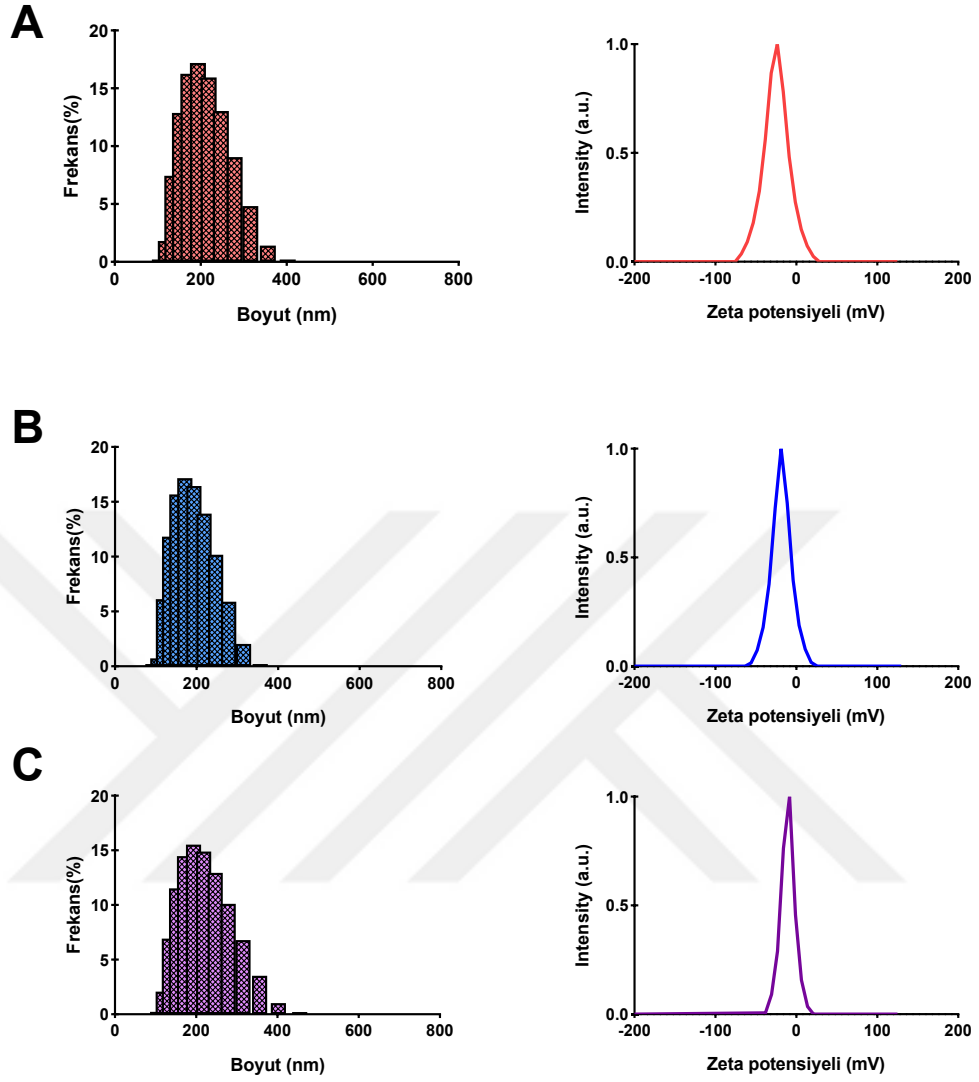


Şekil 4.18. İlaç yüklü ve ilaç yüklü olmayan nanotaşıyıcıların grafiksel tasarımı

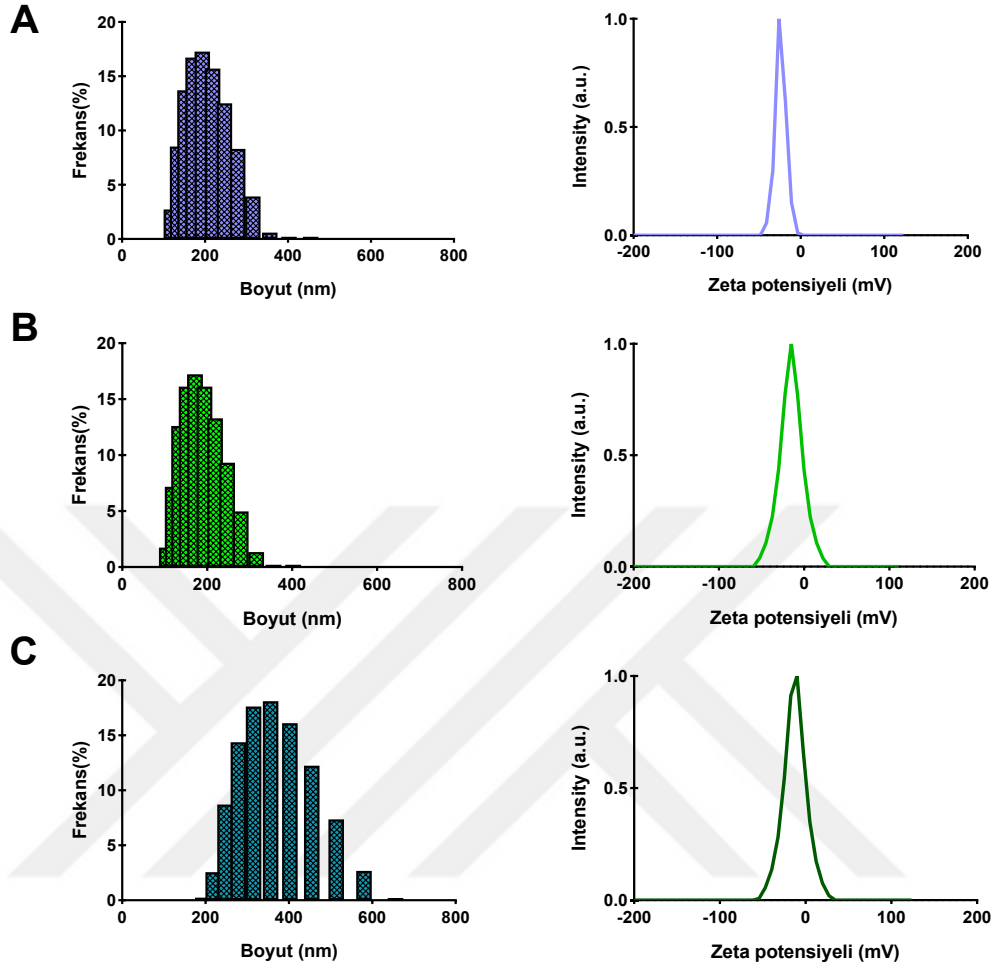
DLS cihazı kullanılarak, DOX HCl ve ICG enkapsüle edilmiş nanotaşıyıcıların, boyut, boyut dağılım ve zeta potansiyelleri ölçüldü ve elde edilen grafikler Şekil 4.19 ve Şekil 4.20 de DLS yazılımı tarafından hesaplanan ortalama değerler ise Tablo 4.32 de sunuldu.

Tablo 4.32. DOX HCl ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların ortalama boyut, PDI ve ortalama zeta potansiyel değerleri

<b>Nanotaşıyıcı adı</b>	<b>Boyut (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Zeta pot. (mV)</b>
PADNPs	178.5	0.110	-24.6
BADNPs	162.6	0.109	-18.5
EADNPs	179.3	0.381	-10.5
PAINPs	172.5	0.168	-24.3
BAINPs	158.2	0.114	-20.2
EAINPs	234.6	0.554	-12.4



Şekil 4.19. PA, BA ve EA kopolimerleri ile üretilen DOX HCl enkapsüle nanotaşıyıcıların boyut dağılım ve zeta potansiyel grafikleri. (A): PADNPs'nin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli; (B): BADNPs'nin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli; (C): EADNPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli

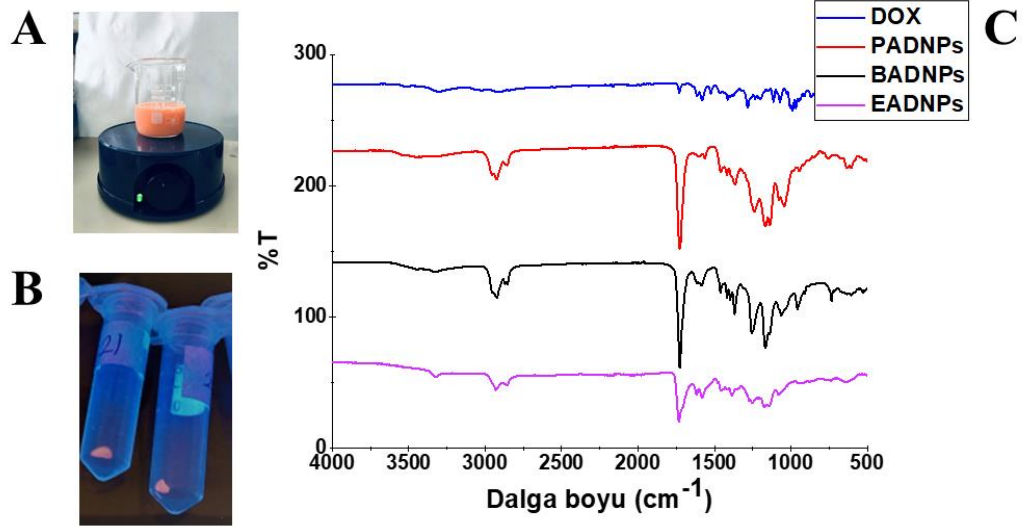


Şekil 4.20. PA, BA ve EA kopolimerleri ile üretilen ICG enkapsüle nanotaşıyıcıların boyut dağılım ve zeta potansiyel grafikleri. (A): PAINPs'nin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli; (B): BAINPs'nin boyut dağılımı ve zeta potansiyeli; (C): EAINPs boyut dağılımı ve zeta potansiyeli

DOX HCl ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların, boyut ve boyut dağılımları ile ilaç yüklü olmayan nanotaşıyıcıların boyut ve boyut dağılımları arasında farklılıklar vardır. PANPs nanotaşıyıcılara ilaç yüklendiğinde boyutunda bir artış meydana gelirken, BANPs'lere ilaç yüklenmesi ile nanotaşıyıcıların boyutunda bir küçülme meydana geldi. EANPs yüklenen ilaca göre değişim gösterdi. EANPs DOX HCl yüklendiğinde partikül boyutu küçülürken, ICG yüklendiğinde partikül boyutunda bir artış gözlemlendi.

Nanotaşıyıcılara DOX HCl ve ICG yüklenmesi, enkapsülasyon verimliliği ve DLS cihazı ile karakterize edildi.

Meme kanseri tedavisine yönelik *in vitro* araştırmalarda kullanılacak olan DOX yüklü nanopartiküller, UV ışık altında floresan ışımaya yapma ve FTIR çıktıları ile de ek karakterizasyon analizleri yapıldı (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. (A): DOX yüklü nanotaşıyıcıların üretimi (B); DOX yüklü nanotaşıyıcıların UV ışık altında floresan ışımaya göstermesi (C); DOX, PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının FTIR spektrasi

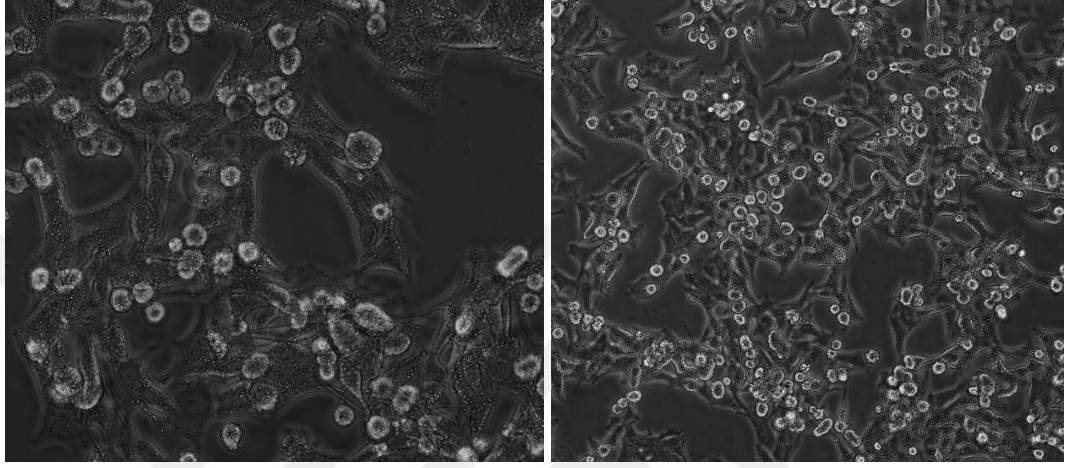
DOX HCl kendine özgü turuncu rengi ile hem üretim aşamasında hem de üretim sonrası yapılan yıkama aşamalarından sonra, nanotaşıyıcıların UV ışık altında yaptığı ışımaya ile fiziksel olarak varlığı kanıtlandı. Aynı zamanda FTIR spektrum verileri kimyasal olarak DOX HCl' in enkapsülasyonun gerçekleştiğini ortaya koydu.

PA, BA ve EA kopolimerleri kullanılarak sentezlenen nanotaşıyıcılara DOX HCl başarı ile enkapsüle edildi ve sentezlenen nanopartiküller *in vitro* çalışmalarda kullanıma uygunlukları fiziksel ve kimyasal karakterizasyon yöntemleri ile kanıtlandı.

#### 4.4. Hücre Kültürü Analizleri

##### 4.4.1. Sitotoksosite Analizi

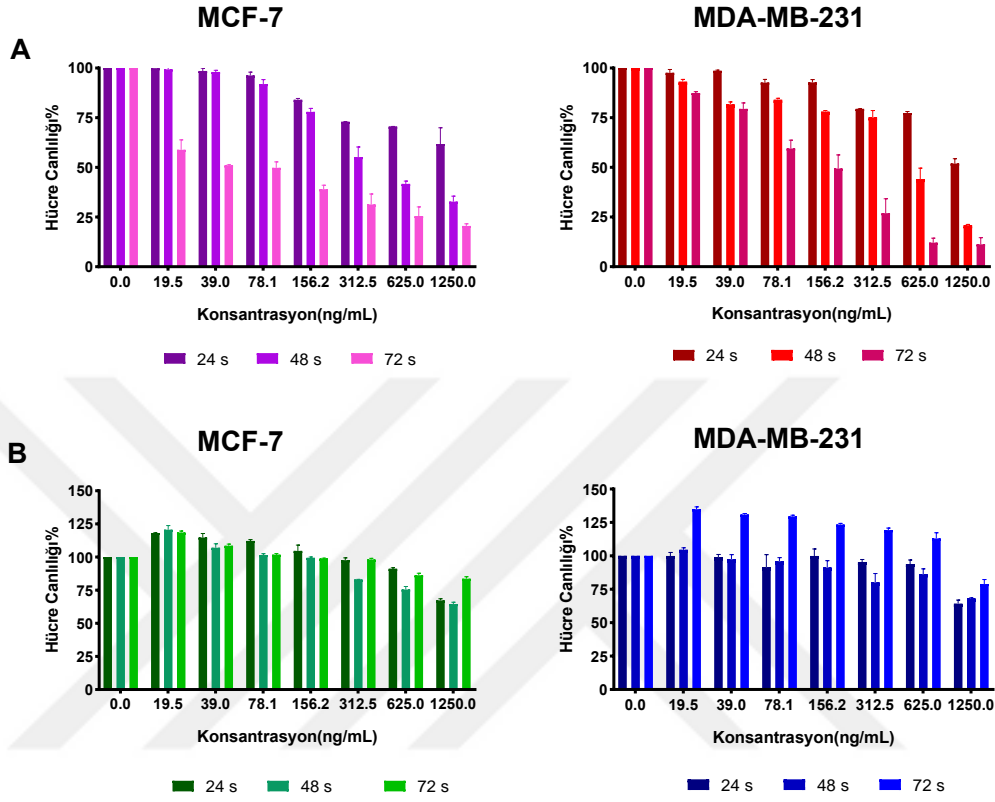
MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları, sırasıyla %10 FBS, %1 L-glutamin ve %0.1 gentamisin içeren RPMI 1640 ve DMEM HG besi ortamlarında çoğaltıldılar.



Şekil 4.22. MCF-7(10X) ve MDA-MB-231(4X) hücre hatlarının ters faz ışık mikroskop görüntüleri

Serbest haldeki DOX HCl ve ICG, herhangi bir madde yüklü olmayan nanotaşıyıcılar (PANPs, BANPs ve EANPs), DOX HCl yüklü nanotaşıyıcılar (PADNPs, BADNPs ve EADNPs) ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların (PAINPs, BAINPs ve EAINPs) MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanserleri hücre hatları üzerindeki varsa sitotoksik etkileri ile hücreler üzerindeki antiproliferatif etkileri MTT analizi ile belirlendi.

MTT analizi kolorimetrik bir analiz yöntemi olup hücre canlılığı, DMSO da çözülmüş formazan tuzlarının 570 nm' deki absorbansı kullanılarak hesaplanabilmektedir. Öncelikle, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları, serbest haldeki DOX HCl ve ICG'nin 1250 ng/mL-19.5 ng/mL aralığında ardışık seyreltme ile elde edilen farklı derişimleri ile muamele edildi. Konsantrasyona karşı % canlılık sütun grafikleri (Şekil 4.23) 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen veriler kullanılarak GraphPad 8.1 yazılımı ile oluşturuldu.



Şekil 4.23. A: DOX HCl'in farklı konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24 s, 48 s ve 72 saat sonundaki % canlılıkları. B: ICG'nin farklı konsantrasyonlarda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde 24 s, 48 s ve 72 saat sonundaki % canlılıkları.

Bulgular, DOX HCl'in her iki hücre hattında da 72 saatlik inkübasyon süresinde daha düşük konsantrasyonlarda daha etkili olduğunu yani uzun sürede daha güçlü antiproliferatif etki sergilediğini ortaya koydu. Aynı zamanda MDA-MB-231 hücre hattının MCF-7 hücre hattına göre DOX HCl'e karşı daha dirençli olduğu görülmektedir. Burada fototerapi tedavisinde kullanılan ICG'nin karanlık antiproliferatif deneyleri sadece hücre alım aşamasında kullanılacak dozu belirlemek amacıyla gerçekleştirildi. Her ne kadar ışık ile uyarılmadığında sitotoksik bir etki sergilemediği bilinse de her maddenin toksik bir dozunun olduğu etkin doz değeri olması nedeniyle ICG için hücre canlılık analizi yapıldı.

Sonuçlar, uzun sürede toksisitenin artmadığını aksine 72. saat de etkin doz miktarının yüksek konsantrasyonlara ulaştığını gösterdi.

“IC50” olarak ifade edilen etkin doz miktarı, yani hücrelerin %50’sinin ölümüne neden olan değer, GraphPad programı ile hesaplanarak Tablo 4.33 de verildi.

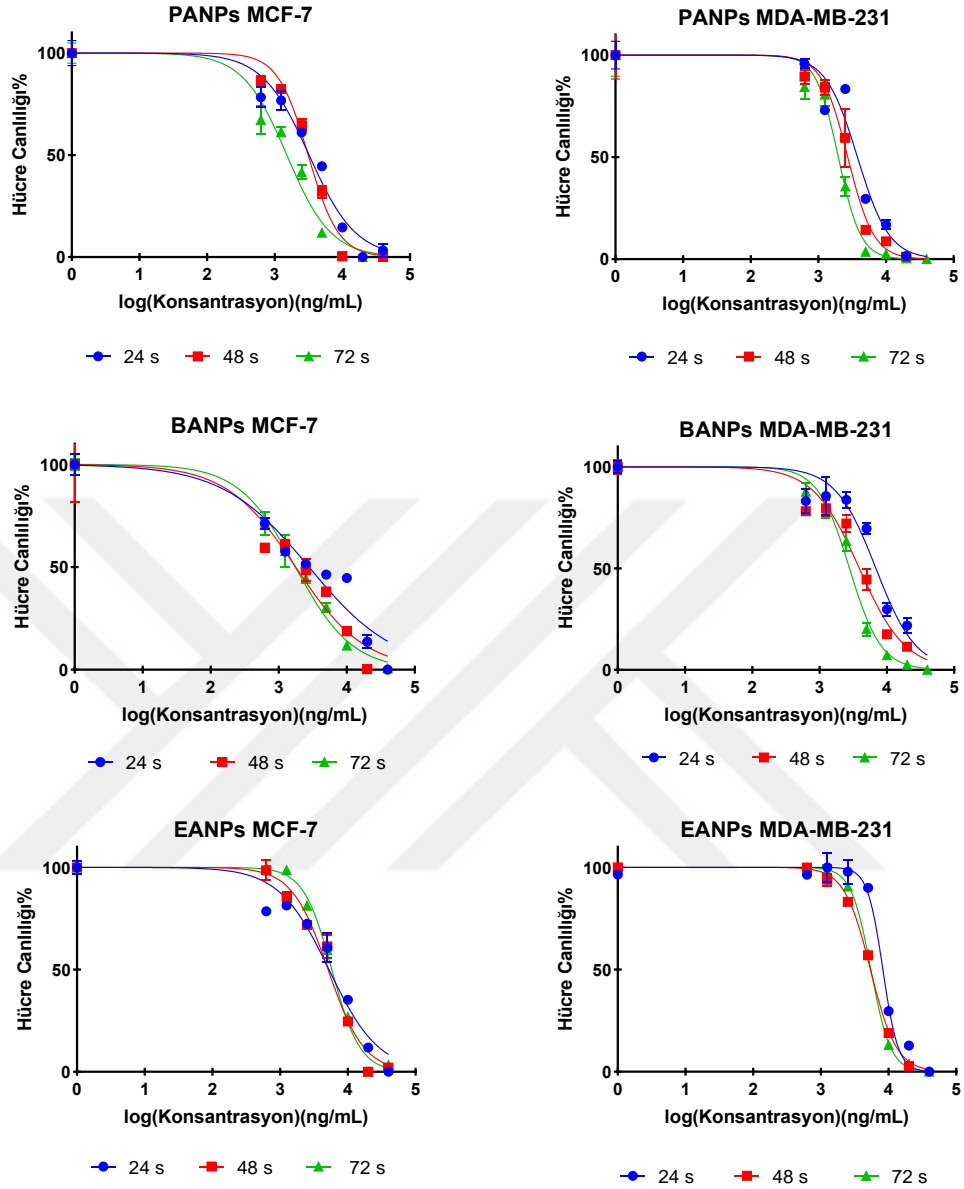
Tablo 4.33. DOX HCl ve ICG’nin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarındaki IC50 değerleri

Hücre hattı / inkübasyon süresi	IC50 (ng/mL)			Madde Adı
	24 s	48 s	72 s	
MCF-7	> 1250	267.8 ± 0.006	27.46 ± 0.006	DOX HCl
MDA-MB- 231	> 1250	332.6 ± 0.001	103.2 ± 0.006	
MCF-7	> 1250	> 1250	> 1250	ICG
MDA-MB- 231	> 1250	> 1250	> 1250	

Etkin doz belirleme analizi ile elde edilen bulgular, ICG’nin analizde kullanılan en yüksek konsantrasyonda dahi toksik etki göstermediğini yani etkin dozun IC50 değerinin 1250 ng/mL’ den daha büyük olduğu belirlendi. DOX HCl’in 72. saat de MCF-7 hücre hattı için IC50 değeri 27.46 ng/mL olarak hesaplanırken, yine 72. saat de MDA-MB-231 hücre hattı için IC50 değeri 103.2 ng/mL olarak hesaplandı.

Tez kapsamında çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenen polimerik nanotaşıyıcılar, PANPs, BANPs ve EANPs, biyouyumlu olan poliadipatların yine biyouyumlu olan mPEG-550 ile PEGilasyonu sonucu üretilen kopolimerler kullanılarak elde edildi. Bu nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki olası sitotoksik ve antiproliferatif etkileri başlangıç konsantrasyonu 40 µg/mL alınarak seri dilüsyon ile yedi farklı konsantrasyondaki hücre canlılıkları MTT analizi ile belirlendi. Bulgular, logaritmik konsantrasyona bağlı % canlılık grafikleri halinde Şekil 4. 24 de sunuldu.



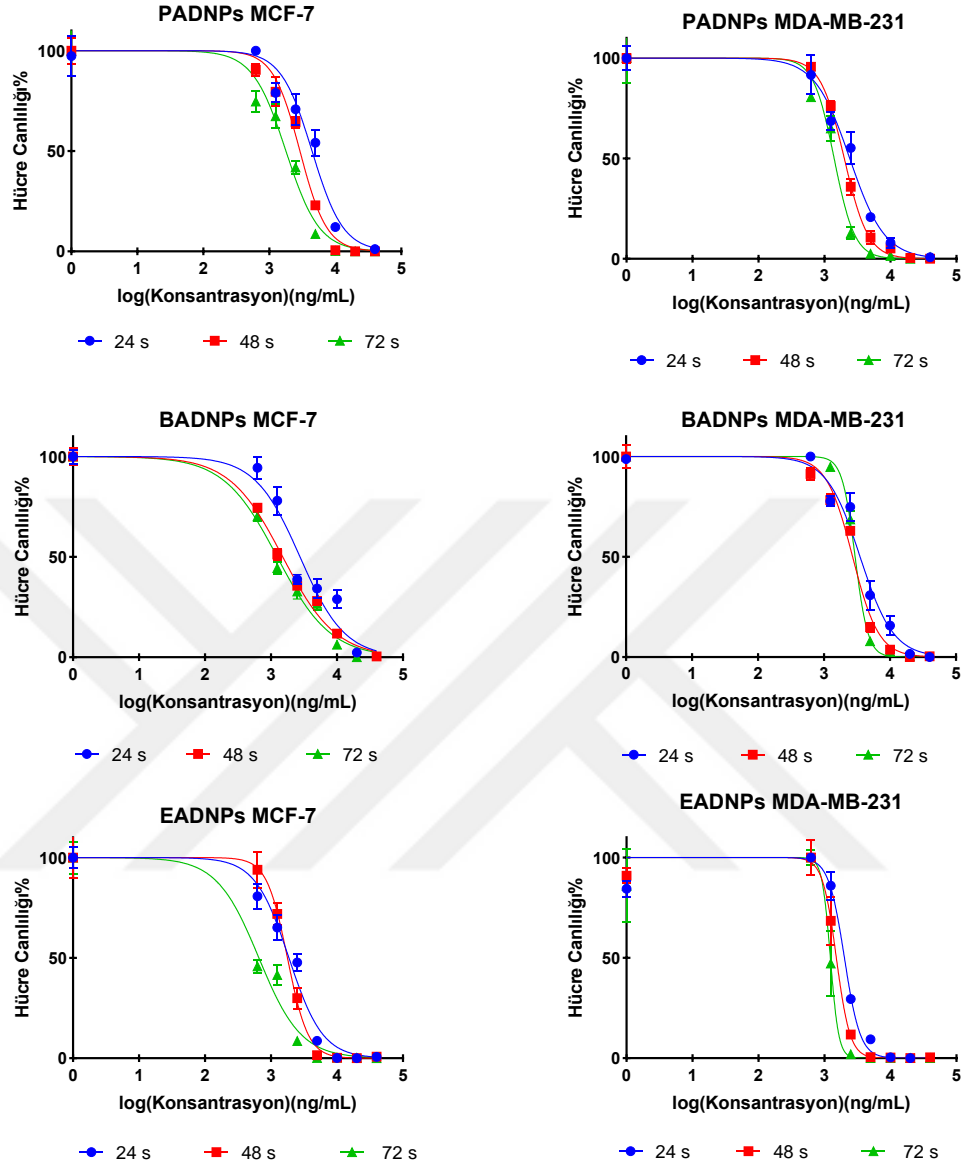


Şekil 4.24. PANPs, BANPs ve EANPs nanotaşıyıcılarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 s, 48 s ve 72 s deki antiproliferatif etkilerine ait logaritmik grafikleri

Şekil 4.24'te sunulan veriler incelendiğinde, üç farklı kopolimerden üretilen nanotaşıyıcıların hücre canlılıkları üzerindeki etkilerinin birbirinden çok farklı olmadığı görülmektedir. Ancak, PA kopolimerinden üretilen nanotaşıyıcıların, BA ve EA kopolimerlerinden üretilen nanotaşıyıcılara göre her iki hücre hattında da az da olsa daha yüksek sitotoksik etki gösterdiği sonucuna varılabilir.

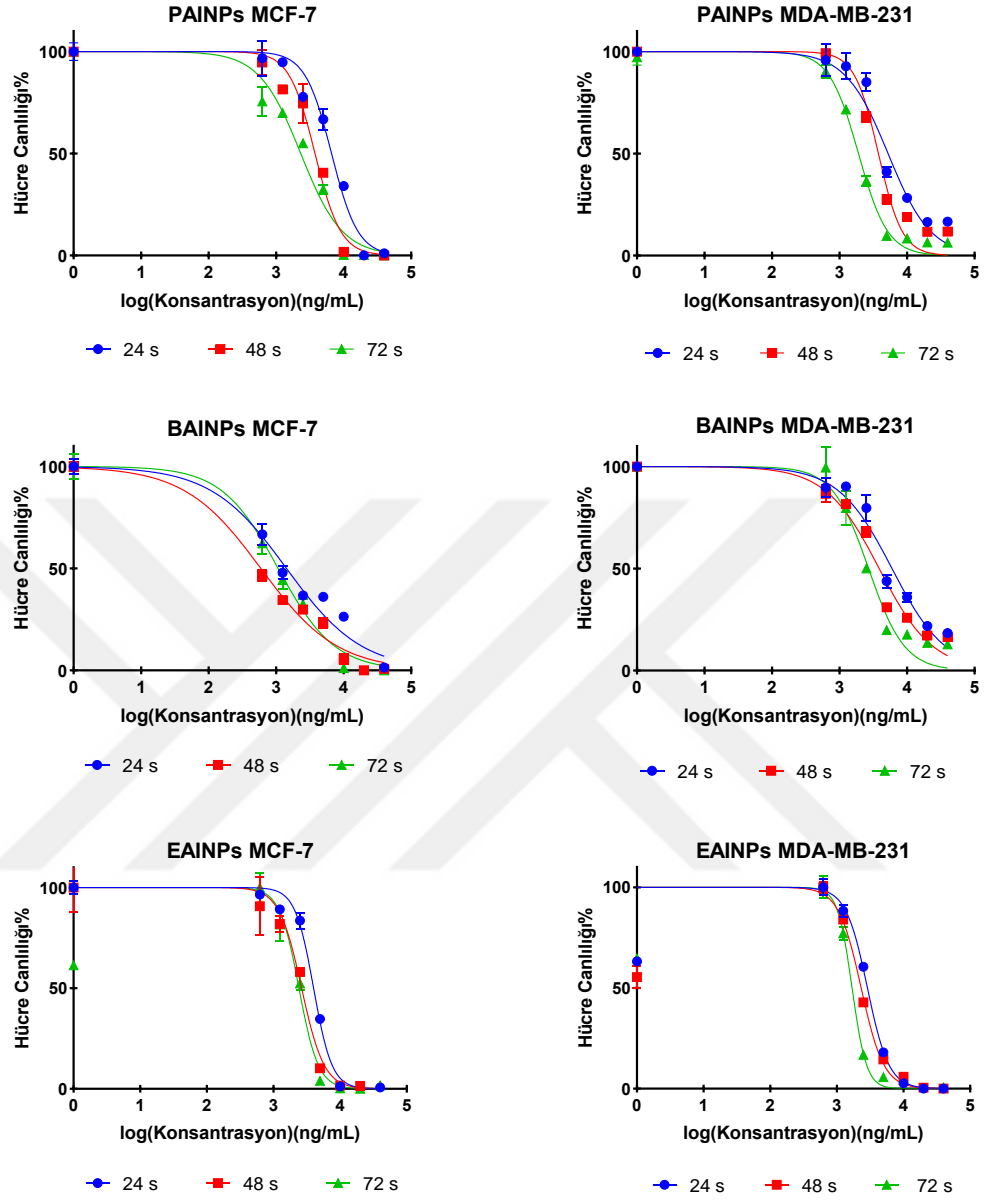
Bununla birlikte her iki hücre hattında da en düşük sitotoksik etkiye EANPs nanotaşıyıcılarının sahip olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre tez kapsamında üretilen PANPs, BANPs ve EANPs nanotaşıyıcılarının biyouyumlu olduğu ve ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirleri belirlendi.

DOX HCl yüklü nanotaşıyıcıların, (PADNPs, BADNPs ve EADNPs) MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki antiproliferatif etkilerini belirlemek için ilaç yüklü nanotaşıyıcıların konsantrasyon aralığı 40 µg/ mL- 0.625 µg/ mL olarak belirlendi ve hücre canlılıkları 24 s, 48 s ve 72 s de MTT analizi ile test edildi. GraphPad 8.1 programı yardımı ile PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarına ait logaritmik grafikler çizildi ve Şekil 4.25 de sunuldu.



Şekil 4.25. DOX HCl yüklü PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 s, 48 s ve 72 s deki antiproliferatif etkilerine ait logaritmik grafikleri

Bulgular, PADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının 72. saat de daha yüksek antiproliferatif etki gösterirken BADNPs'in 48. saat de en yüksek antiproliferatif etki sergilediğini ortaya koydu.



Şekil 4.26. ICG yüklü PAINPs, BAINPs ve EAINPs nano taşıyıcılarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 s, 48 s ve 72 s deki antiproliferatif etkilerine ait logaritmik grafikleri

Hüresel alım analizlerinde, nano taşıyıcıların hücre içine girip girmediklerini kanıtlamak için nano taşıyıcılara floresan boya olarak genellikle ICG yüklenmektedir.

Bu tez kapsamında üretilen nanotaşıyıcılara da ICG yüklenerek, ICG yüklü nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki 24. s, 48. s, ve 72. s'deki sitotoksik etkileri hücresel alım deneylerinde kullanılmak amacı ile hesaplandı ve sonuçlar logaritmik eğriler halinde Şekil 4.26 da verildi.

İlaç yüklü ve ilaç yüklü olmayan nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında gerçekleştirilen MTT analizi sonucu mikroyok okuyucu ile ölçülen veriler kullanılarak 24 s, 48 s ve 72 s deki IC50 değerleri GraphPad 8.1 yazılımı ile hesaplandı. Bulgular, MCF-7 için Tablo 4.34 de, MDA-MB-231 için ise Tablo 4.35 de verildi.

Tablo 4.34. Madde yüklü olmayan nanotaşıyıcılar, DOX HCl yüklü nanotaşıyıcılar ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların MCF-7 hücre hattında, 24 s, 48 s ve 72 s deki IC50 değerleri

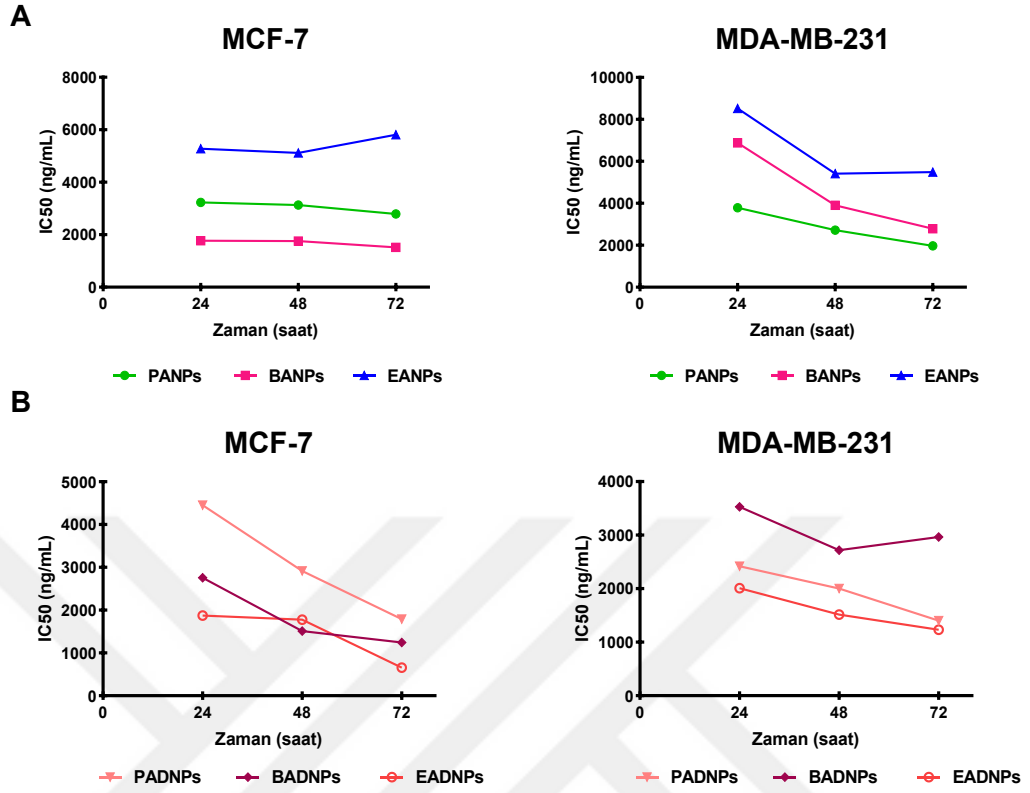
MCF-7	IC50 (ng/mL)		
Nanotaşıyıcı adı	24 s	48 s	72 s
PANPs	3230 ± 0.006	3128 ± 0.006	1514 ± 0.007
BANPs	2787 ± 0.008	1773 ± 0.009	1759 ± 0.005
EANPs	5277 ± 0.007	5116 ± 0.006	5809 ± 0.006
PADNPs	4450 ± 0.008	2915 ± 0.006	1789 ± 0.007
BADNPs	2757 ± 0.008	1509 ± 0.004	1243 ± 0.005
EADNPs	1874 ± 0.006	1778 ± 0.005	656.4 ± 0.006
PAINPs	6628 ± 0.006	3772 ± 0.007	2318 ± 0.008
BAINPs	1424 ± 0.007	594.1 ± 0.005	1073 ± 0.006
EAINPs	4006 ± 0.006	2648 ± 0.007	2417 ± 0.009

Tablo 4.35. İlaç yüklü olmayan nanotaşıyıcılar, DOX HCl yüklü nanotaşıyıcılar ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların MDA-MB-231 hücre hattında IC50 değerleri

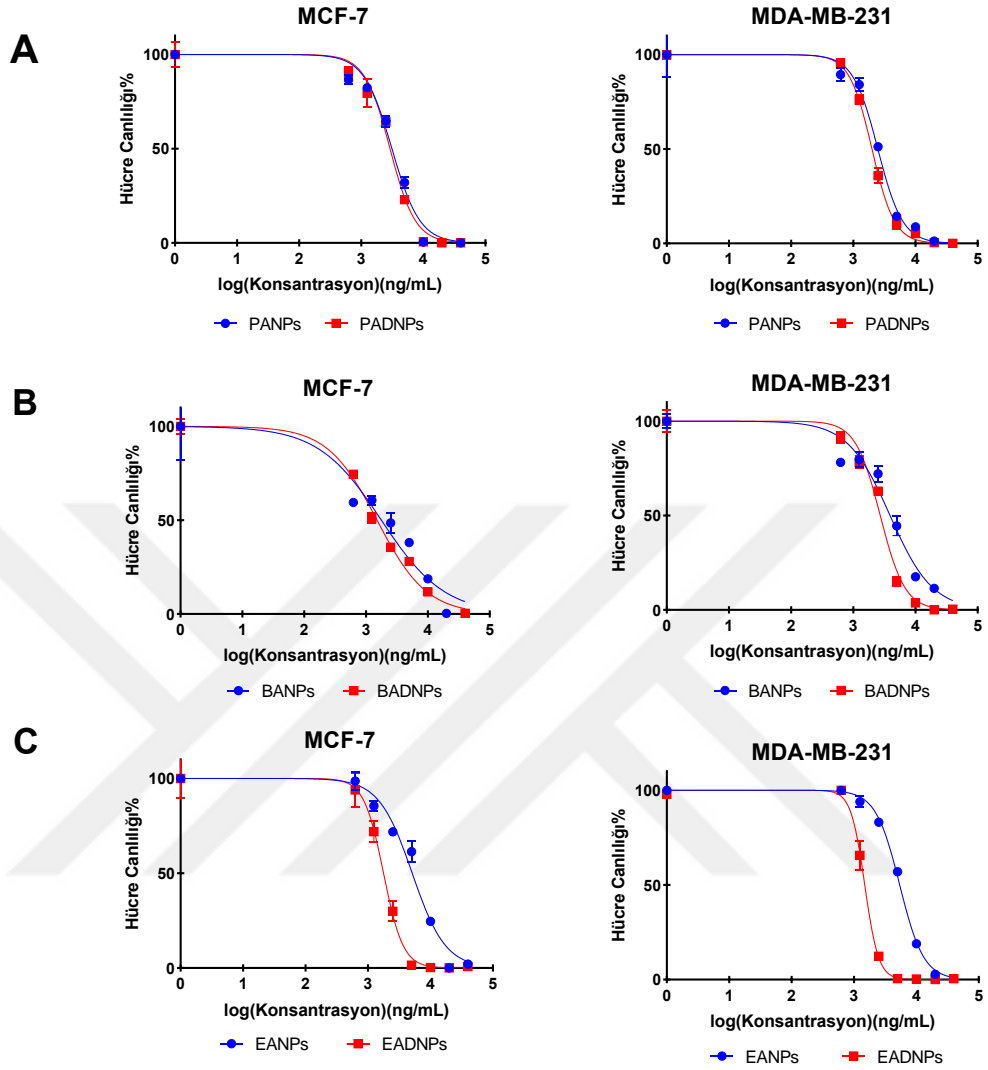
MDA-MB-231	IC50 (ng/mL)		
Nanotaşıyıcı adı	24 s	48 s	72 s
PANPs	3787 ± 0.008	2721 ± 0.007	1975 ± 0.006
BANPs	6879 ± 0.008	3907 ± 0.007	2788 ± 0.005
EANPs	8521 ± 0.005	5410 ± 0.002	5488 ± 0.001
PADNPs	2419 ± 0.006	2000 ± 0.002	1403 ± 0.006
BADNPs	3528 ± 0.007	2717 ± 0.005	2965 ± 0.002
EADNPs	2008 ± 0.007	1515 ± 0.006	1230 ± 0.009
PAINPs	5243 ± 0.008	3776 ± 0.009	1912 ± 0.004
BAINPs	6002 ± 0.006	3875 ± 0.009	2698 ± 0.008
EAINPs	2882 ± 0.009	2320 ± 0.009	1694 ± 0.008

İlaç yüklü olmayan nanotaşıyıcıların ve DOX HCl yüklü nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki zamana bağlı IC50 dozlarının değişimi Şekil 4.27 de grafiksel olarak özetlenmiştir. Buna göre, ilaç yüklü olmayan nanopartiküllerin MCF-7 hücre hattında zamana bağlı antiproliferatif etki değişimi keskin olmamakla birlikte de 72. saat de etkin doz miktarında az bir düşüş meydana gelirken EANPs de 72. saat de bir yükselme olduğu belirlendi. MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ise PANPs ve BANPs 'nin IC50 dozu zamana bağlı olarak azalırken EANPs'in IC50 dozunda önce lineer bir azalma ve bu azalmayı takiben 72. saat de ihmal edilebilecek düzeyde hafif bir yükselme olduğu gözlemlendi. DOX HCl yüklü nanotaşıyıcıların her biri kendine özgü zamana bağlı bir IC50 doz değişimi sergiledi.

MCF-7 hücre hattında PADNPs'in IC50 dozları zamana bağlı olarak doğrusal fakat keskin bir azalma gösterirken, BADNPs'in IC50 dozu, başlangıçta doğrusal bir düşüş ve ardından ihmal edilebilecek seviyede hafif bir azalma gösterdi ve EADNPs ise başlangıçta neredeyse ihmal edilebilecek bir azalmanın ardından keskin bir düşüş ile 72. saat de en düşük IC50 dozuna ulaştığı gözlemlendi. MDA-MB-231 hücre hattında, PADNPs ve EADNPs'in IC50 dozları zamana bağlı doğrusal bir azalma sergilerken, BADNPs'in IC50 dozunda başlangıçta lineer bir azalma ve ardından çok hafif bir artış olduğu görüldü.

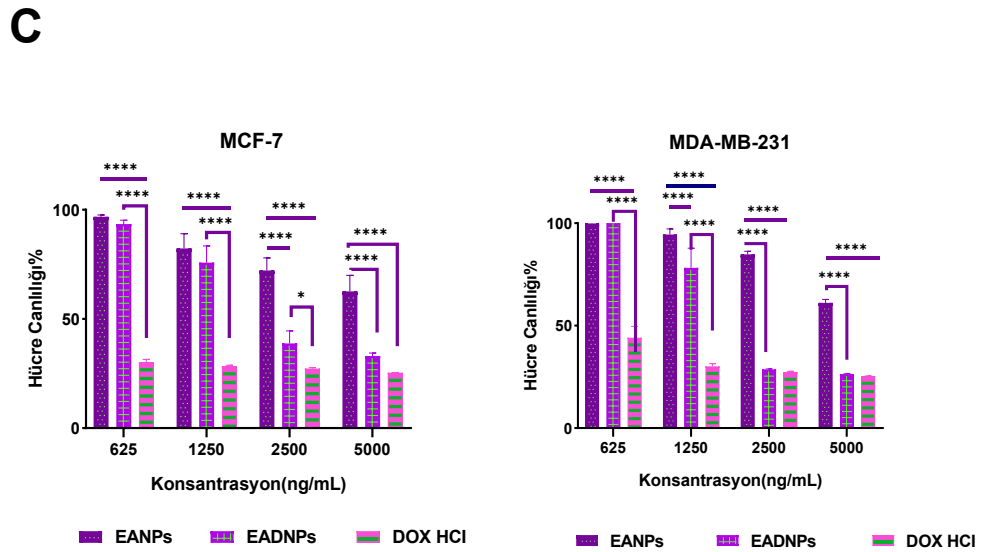
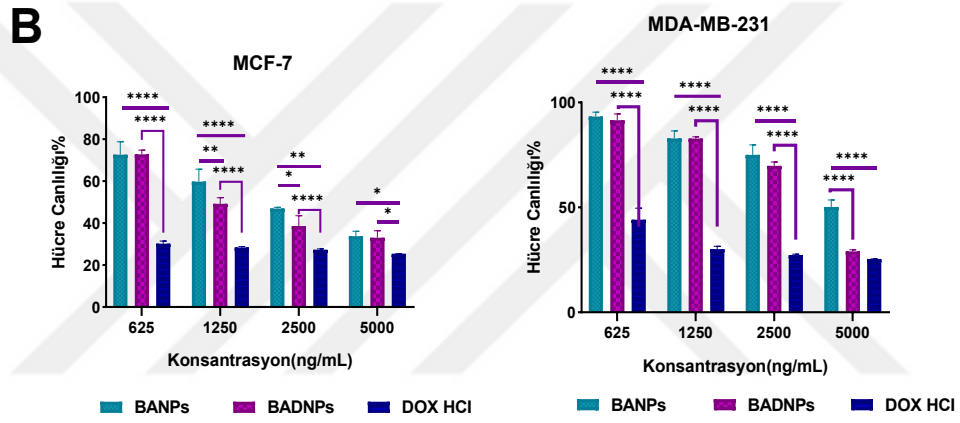
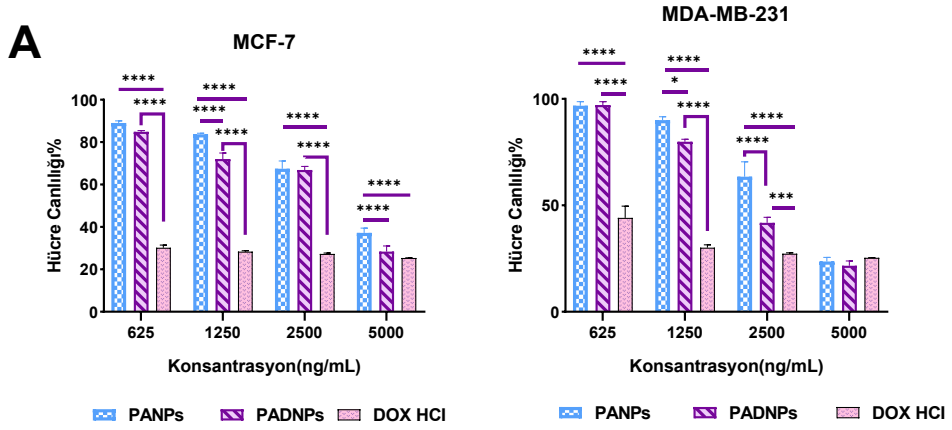


Şekil 4.27. IC<sub>50</sub> değerinin zamana bağlı değişimi. A: İlaç yüklü olmayan nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki zamana bağlı IC<sub>50</sub> değişimi. B: DOX HCl yüklü nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarındaki zamana bağlı IC<sub>50</sub> değişimi.



Şekil 4.28. İlaç yüklü olmayan nanotaşıyıcılar PANPs, BANPs ve EANPs ile DOX HCl yüklü PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 48 s antiproliferatif etkilerine ait logaritmik grafikleri

PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcıları her iki hücre hattı üzerinde PANPs, BANPs ve EANPs nanotaşıyıcılarından daha yüksek antiproliferatif etki sergilediler. Söz konusu bulgular, kapsüllenmiş DOX HCl sayesinde daha yüksek dozlara daha az yan etki (ilaç direnci, sistemik toksisite, vb.) ile çıkılabileceğini ve dolayısıyla kanser tedavisinde klinik anlamda avantaj sağlanabileceğini düşündürmektedir.



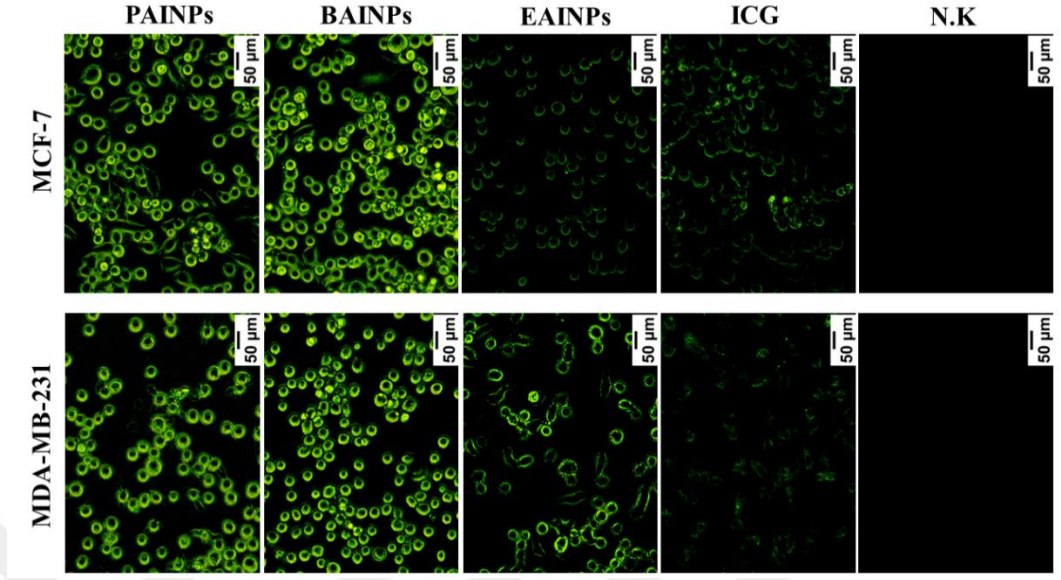
Şekil 4.29. 48 saat boyunca serbest DOX HCl ve DOX HCl yüklü NP'lerle muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin farklı konsantrasyondaki % hücre canlılıklarının değerlendirilmesi ( $p < 0.005$ )

Bu veriler ışığında, ilaç yüklü olmayan nanotaşıyıcılar (PANPs, BANPs ve EANPs) DOX HCl yüklü nanotaşıyıcılar (PADNPs, BADNPs ve EADNPs) ile serbest formdaki DOX HCl'in 48. s deki dört farklı derişimlere bağlı % hücre canlılık verileri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.29 de sunuldu.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri DOX HCl yüklü nanotaşıyıcılara karşı farklı davranışlar sergiledi. Bununla birlikte serbest haldeki DOX HCl ile DOX yüklü nanotaşıyıcıların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri birbirleriyle uyumlu sonuçlar ortaya koydu. Her iki hücrede DOX HCl ile muamele edildiğinde, MDA-MB-231 hücre hattı MCF-7 ye göre daha dirençli iken DOX HCl yüklü nanotaşıyıcılar ile muamele edildiklerinde de MDA-MB-231 daha fazla direnç sergiledi. Serbest formdaki DOX HCl daha düşük dozlarda antiproliferatif etki sergilerken, nanotaşıyıcılar tarafından enkapsüle edildiğinde daha yüksek dozlarda antiproliferatif etki sergilemektedir. Dolayısıyla, tez kapsamında üretilen nanotaşıyıcılar, tümör bölgesine daha yüksek miktarda DOX HCl sağlıklı hücrelerde herhangi bir yan etki oluşturmadan taşıyabilir ve böylelikle yüksek doz ilaç kullanımından kaynaklanan ilaç direnci oluşumunu da engelleyebilen nanotaşıyıcılar olabilme potansiyeline sahiptirler.

#### **4.4.2. *In vitro* hücresel alım analiz bulguları**

Nanotaşıyıcıların hücresel alımlarını değerlendirmek için floresan boya olarak ICG kullanıldı ve elde edilen sonuçları anlamlandırmak için negatif kontrol olarak herhangi bir maddenin uygulanmadığı MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının floresan mikroskop görüntüleri ile serbest halde ICG ile muamele edilen hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri ve ICG yüklü nanotaşıyıcıların floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.30 da verildi.



Şekil 4.30. Nanotaşıyıcıların MCF-7 ve MDA-MB- 231 hücre hatlarında hücresel alımlarının floresan mikroskop ile değerlendirilmesi

Hücresel alım analizi, meme kanseri hücre hatlarının PAINPs, BAINPs, EAINPs ve ICG'nin 48. saatteki IC50 dozlarını içeren DPBS ile 4 saat inkübe edilmelerini takiben alınan floresans mikroskop görüntülerinin kaydedilmesiyle gerçekleştirildi. Burada floresans mikroskop altında yeşil renkte ışımaya yapan hücreler içerisinde nanopartiküllerin alındığını ifade etmektedir. Şekil 4.30' a göre negatif kontrole karşılaştırıldığında PAINPs ve BAINPs nanotaşıyıcılarının hücresel alım oranı EAINPs'lara kıyasla çok daha yüksektir. Serbest haldeki ICG'nin hücresel alımı oranı ise en düşük olmaktadır (S. Chen ve ark., 2018). Burada elde edilen sonuçlar, nanotaşıyıcıların partikül boyut ve boyut dağılımları ile doğru orantılıdır. EAINPs partikül boyutunun diğer nanotaşıyıcılardan yaklaşık %27 daha büyük olmasının ve partikül boyut dağılımının diğer nanotaşıyıcıların boyut dağılımından yüksek olmasının hücresel alım oranının daha düşük olmasına neden olduğu düşünülmektedir.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Meme kanseri vakalarında, son beş yıl içerisinde hayatta kalma oranı hala %25'in altındadır ve bu durum meme kanseri tedavisinde yeni ve etkili terapötik stratejilere duyulan ihtiyacı gözler önüne sermektedir. Geleneksel meme kanseri tedavi seçenekleri arasında cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyasyon terapisi veya bu seçeneklerin bir kombinasyonu bulunmaktadır. Konvansiyonel kemoterapi, öncelikle hızla büyüyen ve bölünen kanser hücrelerinin ölümüne yol açan DNA sentezi ve mitozuna müdahale ederek çalışmaktadır. Kemoterapi yönteminde kullanılan ajanlar, seçici olmamaları nedeniyle sağlıklı normal dokulara zarar verebilmektedir. Aynı zamanda bu ajanların kan dolaşımında hızlı eliminasyona uğramaları yüksek dozlarda kullanımı gerektirmektedir. Yüksek dozda kullanılan kemoterapötik ajanlar hem sağlıklı dokularda ciddi toksik etki oluşturmaktadırlar, üstelik kısa sürede kanser hücreleri ilaca bir direnç geliştirmektedir. Bulantı ve iştahsızlık gibi beklenmeyen ve istenmeyen olumsuz yan etkilere de neden olabilmektedirler (Costa ve ark., 2020).

Aslında, kemoterapötik ilaçların sağlıklı dokular ve organlar üzerinde meydana getirdiği ağır yan etkiler, kanser hastalarının yüksek ölüm oranlarının arkasındaki ana nedenlerden biridir. Bu ilaçların tümör bölgesine biyo-erişebilirliğinin zayıf olması, daha yüksek dozların kullanımını gerektirmektedir ve bu durum normal sağlıklı dokularda ve hücrelerde toksisitenin ve çoklu ilaç direncinin artmasına neden olmaktadır (Damyanov ve ark., 2018). Bu nedenle, tümör hücrelerini hedef alabilen, terapötik etkiyi artırırken, olumsuz yan etkileri azaltan yeni nesil yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Nanoteknolojinin ortaya çıkışı ile birlikte son yirmi yılda yapılan çalışmalar genel olarak klinik terapötikler üzerinde derin bir etki oluşturmuştur. Geleneksel kemoterapötik ajanlarla karşılaştırıldığında, nano ölçekli ilaç taşıyıcılar, aktif hücresel alım, arttırılmış geçirgenlik ve tutma etkisi tümörlerdeki yüksek selektif birikim gibi özelliklerinden dolayı normal hücrelerde oluşan toksisiteyi önleyip tedavi etkinliğini artırarak bu zorlukların bazılarını aşabilme potansiyeli olduğunu göstermiştir (Senapati ve ark., 2018a).

Kanser terapisindeki başarısız vakaların çoğundan sorumlu olan kanser kemorezistansı başlangıçta bir antikanser ilacı tarafından baskılanan kanser hücrelerinin, belirli bir süre sonra bu ilaca karşı direnç geliştirdiği bir olgudur. Bu nedenle, kanser oluşumunu önleme, yan etkilerin baskılanması ve kanser kemoterapisine bağlı ağrı yönetiminde daha iyi hedefleme yeteneğine sahip yeni ilaç taşıyıcı sistemler gerekmektedir (Senapati ve ark., 2018)

Günümüzde nano ölçekli ilaç taşıyıcılar, kanser terapötiklerin geliştirilmesi amacıyla, sentetik polimerler, proteinler, lipitler ve organik ve inorganik bileşikler kullanılarak oluşturulmaktadır. Kemoterapötik ilaçların doğrudan uygulanması ile karşılaştırıldığında, bir taşıyıcı içerisinde ilacın kapsüllemesi, kan dolaşımındaki bozulmaya karşı koruma, daha iyi ilaç çözünürlüğü, arttırılmış ilaç stabilitesi, hedefli ilaç dağıtımı, azaltılmış toksik yan etkiler ve geliştirilmiş farmakokinetik ve farmakodinamik ilaç özellikleri gibi bir dizi avantaj sunmaktadır (Rajan ve ark., 2016).

Polimerik nanopartiküller, nano ölçekli boyutlarda, biyoyumlu, koloidal ve çoğunlukla biyobozunur sistemlerdir. Polimerik nanopartiküller, kolay sentezlenmeleri ve nanopartikül içerisinde istenen özelliklerin inşa edilebilmesini sağlayan kolay yapısal modifikasyonların oluşturulması gibi özelliklerinden dolayı nanotıp uygulamalarında en yaygın kullanılan materyallerden biridir (Aghebati-Maleki ve ark., 2020).

Polimerik nanopartiküller, sentetik polimerler, örneğin PLA, PCL, PLGA, HPMMA ve SMA gibi kopolimerler veya jelatin, dekstran, guar zımkı, kitosan ve kollajen gibi doğal polimerler kullanılarak üretilebilmektedir (Chaturvedi ve ark., 2019). İlaçlar polimer matrisinde dispersiyon yoluyla veya polimer moleküllerine tutunma/konjugasyon yolu ile kolay bir şekilde kapsüllenebilmektedirler.

Sentetik polimerlerden üretilen nanopartiküllerin sürekli ilaç salım süresi günler, haftalar gibi uzun bir periyoda sahipken doğal polimerlerden üretilen nanopartiküllerin ilaç salım sürelerinin çok daha kısa olması, doğal polimerler için bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Sürekli ilaç salım periyodunun uzun olması yanında organik çözücülerin kullanılması ve kapsülleme için gerekli olan genel koşulların kolay bir şekilde sağlanabilmesi gibi avantajlarından dolayı, FDA onaylı PLA ve PLGA gibi biyobozunur polimerik nanopartiküllerin klinik çalışmalarını da içeren, polimerik nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistemler olarak son yıllarda araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Fan ve ark., 2019).

Doğal bir polimer olan dekstran ile kemoterapötik bir ilaç olan DOX konjuge edilmiş ve mikroemülsiyon tekniği kullanılarak hidrojel içine kapsüllenmiştir. Bu şekilde ilacın kapsülленerek uygulanması, ilacın katı tümör üzerindeki terapötik etkinliği artırdığı ve aynı zamanda yan etkileri de azalttığı rapor edilmiştir (Mitra ve ark., 2001).

Tamoksifen (Tmx) gömülü PLGA nanopartikülleri (PLGA-Tmx), Dalton lenfoma asit (DLA) hücreleri ve MDA-MB231 meme kanseri hücreleri kullanılarak daha iyi DNA bölünme potansiyelini, sitotoksitesini değerlendirmek için hazırlanmış ve hazırlanan PLGA-Tmx nanoparçacıklarının sürekli salım kinetiği, gelişmiş DNA bölünme potansiyeli ve nükleer parçalanma yoluyla çok daha iyi antikanser etkinliği gösterdiği rapor edilmiştir (Pandey ve ark., 2016). Bununla birlikte etkili bir kanser tedavisi için nanopartiküllerden ilaç salımının kapsamı ve seviyesi, ilaç/ polimer oranı, moleküler ağırlık ve polimerin doğası dikkatli bir şekilde manipüle edilerek ayarlanmalıdır.

Amfifilik blok kopolimerlerin sulu bir çözelti içinde kendiliğinden katlanabilmesiyle elde edilen, hidrofobik bir çekirdek ve hidrofilik bir kabuk ile oluşturulan küresel veya küre şeklinde kolloidal nano ölçekli polimerik nanopartiküller polimerik miseller olarak tanımlanmaktadır. Miseller, belirli sıcaklıklar altında kendiliğinden oluşabilen bir amfifilik kolloid grubuna aittir.

Hidrofobik çekirdek, hidrofobik ilaçlar için bir rezervuar görevi görürken hidrofilik kabuk, hidrofobik çekirdeği stabilize eder ve aynı zamanda hem polimeri hem de hidrofobik ilaçları suda çözünür hale getirerek intravenöz uygulamalar için uygun bir aday haline dönüştürmektedir.

İlaçlar, fiziksel, kimyasal veya elektrostatik etkileşimler yoluyla polimerik bir misel içine dâhil edilebilmektedir (Park ve ark., 2008).

mPEG-PLGA blok kopolimer vezikülleri, meme kanseri tedavisi için terapötik miktarda DOX taşımak üzere geliştirilmiştir. DOX yüklü nanopartiküller pH gradyan yöntemiyle hazırlanmıştır. DOX yüklü nanopolimerzomların antitümör etkinliğini ve biyolojik dağılımını değerlendirmek için BALB/c farelerinde murin meme tümörleri oluşturulmuş ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin bir murin meme kanseri tümör modeline karşı oldukça etkili olduğunu ve gelişmiş bir geçirgenlik ve tutma mekanizması yoluyla tümör bölgesinde başarılı bir şekilde biriktiğini göstermiştir. Ayrıca *in vivo* çalışmalar DOX yüklü nanopolimerzomların kan dolaşımında stabil olduğunu ortaya koymuştur (Alibolandi ve ark., 2015).

Bir başka çalışmada, ilaç taşıyıcı sistem, farklı moleküler ağırlıklara sahip PPA ve mPEG kopolimerizasyonu ile sentezlenen yeni polimerik malzemeler kullanılarak çekirdek-kabuk nanoparçacıkları şeklinde hazırlanmış ve paklitaksel yüklü mPEG-PPAd nanoparçacıklarının HepG2 ve HeLa kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik etki sergilemiştir. Ayrıca farklı sıcaklıklardaki etkileri değerlendirildiğinde, termodyvarlı antikanser ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi için mPEG-PPAd nanoparçacıklarının potansiyel kullanılabilirliğe sahip oldukları bildirilmiştir (Karavelidis ve ark., 2015)

Katyonik 1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum propan/ mPEG içine DOX kapsülendirilerek oluşturulan ve intravenöz uygulama olarak kullanılması amaçlanan misellerin mesane kanserine karşı bir antikanser etki gösterdiği rapor edilmiştir (Jin ve ark., 2016).

Kolesterol ile modifiye edilmiş mPEG-PLA misellerine (mPEG-PLA-Ch) kurkumin yüklenerek serbest formdaki kurkuminin anti-kanser etkinliği ile kıyaslanmıştır. Kurkumin yüklü mPEG-PLA-Ch miselleri murine melanoma (B16F10) kanser hücrelerinde ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında daha yüksek bir sitotoksik etki sergilemelerinin yanı sıra serbest formdaki kurkumine kıyasla B16F10-ksenografıtlı tümör taşıyan farelerde tümör hacminde daha yüksek oranda azalma göstermiştir (Kumari ve ark., 2017).

Nanopartiküllerin üretimi süreci, nanotaşıyıcının verimliliğini, güvenliğini, biyolojik dağılımını ve nihai kullanılabilirliğini etkileyen önemli bir faktördür.

Nanoemülsiyon yöntemi ile polimerik nanopartiküllerin tasarımı, güvenli ve çok yönlü bir teknik olarak dikkat çekmektedir. Nanoemülsiyonlar, tipik olarak 20–200 nm aralığında damlacık boyutlarına sahip emülsiyonlardır. Nanopartikül boyutunun, sistemin içsel fizikokimyasal özellikleri ile kontrol edildiği düşük enerjili emülsifikasyon yöntemleri kullanılarak hazırlanması, daha küçük ve daha üniform damlacıkların oluşumuna izin vermektedir (Y. Singh ve ark., 2017).

Polimerik nanopartiküller, nanoemülsiyonlardan, ya dağılmış fazdaki *in situ* monomer polimerizasyonu yoluyla ya da nanoemülsiyonun dağılmış fazı olarak önceden oluşturulmuş bir polimer çözeltisinin su fazı içinde dağıtılarak ardından çözücü buharlaştırması ile elde edilebilmektedir. Önceden oluşturulmuş biyoyumlu polimerlerin kullanılması, başlatıcı veya yan ürün gibi reaktif maddelerin varlığından kaçınılması sistemin biyoyumluluğunun artırılması ve saflaştırma aşamasının azaltılmasını sağladığı için *in situ* monomer polimerizasyon yöntemine göre daha avantajlıdır (Fornaguera ve ark., 2015).

Nano ölçekli çift emülsiyonlar, nanotıp alanında, hidrofilik moleküllerin hedeflenmiş olarak verilebilmesi gibi önemli zorlukları çözebilmektedir.

Sulu sürekli fazda (örneğin çoğu farmasötik formülasyonda) bir nanopartikül dispersiyonu hedeflendiğinde, çift emülsiyonlar su içinde yağ içinde su tipi (Y/S/Y) olacak şekilde formüle edilmektedir ve bu sistemler tek basamaklı veya iki basamaklı bir yöntem ile yapılabilmektedir.

Tek basamaklı yöntemde, iç ve dış su fazları aynı bileşime sahiptir ve bu yöntem ek bir kütle saflaştırma aşaması (örneğin, nanoboyutlu taşıyıcılar durumunda bir tuz giderme kolonu yoluyla) gerektirebilir. İki basamaklı yöntemde iç ve dış su fazları farklı bileşime sahiptir. S1/Y/S2 emülsiyonları hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşiklerin birlikte kapsüllenmesini sağlayabilen taşıyıcı sistemlerdir, ancak sınırlı bir kararlılığa sahiptirler. Birincil emülsiyonun su/yağ ara yüzünde bir silika membran sentezi ile çift emülsiyonları stabilize etmek için yenilikçi bir yaklaşımla iç su içindeki hidrofilik malzemelerin etkin bir şekilde kapsüllenmesini sağlanmıştır. Bu yenilikçi yaklaşım, yalnızca kararlı mikrometrik çift emülsiyonlar (yaklaşık 10 µm) oluşturmayı değil, aynı zamanda çapı <130 nm olan çift nano damlacıkları da formüle etmeyi mümkün kılmıştır (Akram ve ark., 2019).

HER2'yi aşırı eksprese eden meme kanseri hücreleri için, ışın ve kemoterapinin birlikte kullanıldığı, bir çeşit anti-HER2 ICG-DOX yüklü PEI kaplı perflorokarbon çift nanoemülsiyonlar üretilmiştir. Çift nano-emülsiyon yöntemi ile oluşturulan nanopartikül dış su fazından sonra PEI ile kaplanarak stabilize edilmiştir. Üretilen nanoemülsiyonlar, azaltılmış kemotoksosite ile HER2 göğüs kanseri terapisinde kullanım için yüksek bir potansiyel sergilemiştir ve eşit miktarda serbest ICG ve / veya DOX ile karşılaştırıldığında gelişmiş ICG stabilitesi, bağlanma özgüllüğü ve arttırılmış antikanser etkinliği gösterdiği rapor edilmiştir (Y. H. Lee & Ma, 2017). Nanotaşıyıcılar içine terapötik moleküllerin (örneğin, küçük molekül inhibitörleri, kemoterapi, RNAi, vb.) enkapsülasyonu, terapötik moleküllerin çözünürlüklerinin ve biyoyararlanımlarının artmasını ve biyolojik dağılımlarını değiştirmesinin yanı sıra hedef hücreye girişini de kolaylaştırabilmektedir.

Gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisini kullanan “pasif” hedefli nanotaşıyıcılar, kanseri sistematik olarak hedeflemek için en kapsamlı araştırılan stratejidir. Pasif hedefleme yaklaşımı büyük terapötik potansiyele sahip olmasına rağmen EPR etkisinin heterojenliği ve bununla ilişkili fizyolojik engellerle sınırlanmaktadır.

Nanotaşıyıcıların tümör lokalizasyonunu iyileştirmek için pasif olarak hedeflenen nanotaşıyıcıları tamamlayıcı bir strateji olarak aktif hücrel hedefleme geliştirilmiştir. Aktif hedefleme stratejisi ile nanotaşıyıcıların yüzeyine hedef hücreye özgü ligandlar ve antijenler dâhil edilerek hedefleme verimliliği ve hedef bölgedeki alıkoymalar artırılmaktadır. Aktif olarak hedeflenen nanotaşıyıcılar, hematolojik malignitelerin tedavisinde büyük avantajlar sunabilmektedir. Aktif hedefleme stratejileri pasif yaklaşımlardan çok daha karmaşıktır. Fizyolojik engeller ve tümör heterojenliği ile ilgili zorluklara ek olarak, bu sistemlerin karmaşık tasarımı ve mühendisliği, ilaç üretimini ve iyi üretim uygulamalarını ve tedavinin maliyetini önemli ölçüde arttırabilecek önemli bir zorluktur (Rosenblum ve ark., 2018).

Bu tez kapsamında meme kanseri tedavisinde kullanılan ve kemoterapötik bir ajan olan doksorubisin'i enkapsüle edebilecek polimerik ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Böylelikle, söz konusu ilacın etkinliğini artırma, yan etkilerini azaltma ve hedeflenebilme özelliği kazanmasını sağlama gibi terapötik avantajlar elde etme amaçlanmıştır. İlgili amaçlar doğrultusunda yürütülen deneysel süreç sonunda, aşağıda özetlenen bulgulara ulaşılmıştır.

- Polimerik nanopartiküllerin üretiminde amfifilik kopolimerler kullanıldığında, özellikle hidrofobik polimerler PEGlendiğinde kan dolaşımında kalma sürelerinin uzadığı bilinmektedir (L. Zhang ve ark., 2013). Dolayısıyla tez süreci bu çerçevede şekillendirilmiştir.
- Hidrofobik polimer olarak, biyoyumlu ve biyobozunur olduğu bilinen poliesterlerden poliadipatlar, polisüksinatlar ve polioksalatlar çözücü ve katalizör kullanılmadan vakum altında sentezlenmiş ve başarı sağlanmıştır.

- Sentezlenen poliadipatların, pPAd, pBAd ve pEAd, mPEG-550 kullanılarak PEGilenmesi sonucu kopolimerler elde edilmiştir.
- Nano-çöktürme ve tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma metodu ile üretilen partiküllerin hem nano boyutta olmadıkları hem de stabil özellik göstermedikleri belirlenmiştir.
- Stabilizasyon sorununun nedeni olarak amfifilik kopolimerlerin gövdesini oluşturan hidrofobik poliadipatların moleküler zincir uzunluğu, mPEG-550 hidrofilik polimerin moleküler zincir uzunluğundan çok daha büyük olması, hidrofobik grupların bir araya gelerek agregat oluşturmuş olmaları düşünülmektedir. Bu nedenle, ilerleyen deneysel basamaklarda, zincir uzunluğu daha kısa yani moleküler ağırlığı küçük olan poliadipatların sentezlenmesine karar verilmiştir.
- Poliadipatların polimerizasyonu, kondenzasyon polimerizasyonu olduğu için moleküler ağırlığı zamana bağlı olarak ayarlanabilmektedir. Polimerizasyon süresi kısaltılarak moleküler ağırlığı düşük poliadipatlar sentezlenmiştir.
- Düşük moleküler ağırlıklı poliadipatların PEGilasyonu sonucu sentezlenen kopolimerlerden tekli emülsiyon yöntemi ile üretilen polimerik partiküllerin stabilizasyon sorunu çözülmesine rağmen partiküllerin boyutunun istenilen düzeyde olmadığı görülmüştür.

Nano boyutta partiküller üretebilmek için çeşitli çözüm önerileri ortaya konulmuş ve bunlardan biri olan mPEG yerine nanopartiküllerin yüzey yükünü pozitif kılacak PEI kullanılması ile nanopartikül oluşturulmasına karar verilmiştir.

- poliadipat:PEI karışımından nano-çöktürme ve tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemleri ile elde edilen nanopartiküllerin nano düzeyde olmalarına rağmen stabil olmamaları nedeniyle başka bir yöntem olan PEI kaplama yöntemi denenmiştir.
- PEI kaplama yönteminde, PEI kullanımının arzu edilen nanotaşıyıcıların üretilmesine izin vermediği tespit edilmiştir. Burada poliadipat:PEI karışımından nanopartikül üretiminde çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak istenilen boyutta nanopartiküllerin oluşması sağlanmıştır.

- PEGilasyon oranı nanopartiküllerin stabilitesini ve boyutunu etkileyen bir yöntem olup PEGilasyon oranı arttıkça boyut büyürken stabilite artmaktadır (Suk ve ark., 2016). Bu bilgi ışığında, düşük moleküler ağırlıklı poliadiptatların PEGilasyonu sonucu elde edilen kopolimerlerden üretilen nanopartiküllerin boyutlarını nano düzeye çekmek için PEGilasyon oranı %10' düşürülmüştür.
- PEGilasyon oranı düşük kopolimerler, PA, BA ve EA, kullanılarak çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen nanotaşıyıcıların, PANPs, BANPs ve EANPs boyutları sırasıyla 169.2 nm, 164.9 nm ve 197.6 nm olarak DLS cihazında ölçülmüştür.
- DOX yüklü nanotaşıyıcıların enkapsülasyon verimi ise spektrofloreometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DOX yüklü nanotaşıyıcıların PADNPs, BADNPs ve EADNPs enkapsülasyon verimi sırasıyla %57, %58 ve %44.5 olarak hesaplanmıştır. Burada en düşük moleküler ağırlığa sahip poliadiptatın enkapsülasyon veriminin en yüksek olduğu belirlenmiştir. DOX'un ilaç taşıyıcı sistemler tarafından enkapsüle edilebildiği UV ışık altında alınan görüntüler ve FTIR analiz sonuçları ile kanıtlanmıştır. Bu süreçte üretilen nanopartiküller yapıların floresan özelliğe sahip olmasından faydalanılmıştır.
- Serbest formdaki DOX, ilaç yüklü olmayan nanotaşıyıcılar ve ilaç yüklü nanotaşıyıcıların *in vitro* antiproliferatif analizleri meme kanseri hücre hatlarında, (MCF-7 ve MDA-MB-231) gerçekleştirilmiştir.
- Antiproliferatif aktivitenin analiz edildiği deneylerin verileri incelendiğinde, PA kopolimerinden üretilen nanotaşıyıcıların, BA ve EA kopolimerlerinden üretilen nanotaşıyıcılara göre her iki hücre hattında da (MCF-7 ve MDA-MB-231) daha yüksek antiproliferatif etki sergilediğini ortaya koymuştur. Bu sonuç, PA kopolimerinden üretilen nanopartiküllerin HER2 açısından bir spesifite göstermediğini, dolayısıyla çeşitli meme kanseri türlerinde yaygın olarak kullanılabilir nitelikte olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte her iki hücre hattında da en düşük antiproliferatif etkiye EANPs nanotaşıyıcılarının sahip olduğu belirlendi.
- Serbest formdaki DOX HCl'in, PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarına göre daha toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Serbest haldeki

DOX HCl ile PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının hücreler üzerindeki antiproliferatif etkileri birbirleriyle uyumlu sonuçlar ortaya koymuştur. Her iki hücre de DOX HCl ile muamele edildiğinde, MDA-MB-231 hücre hattı MCF-7 ye göre daha dirençli iken aynı şekilde PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılar ile muamele edildiklerinde de MDA-MB-231 daha fazla direnç sergilemiştir.

- PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcılarının PANPs, BANPs ve EANPs nanotaşıyıcılarına kıyasla daha yüksek anti-proliferatif etki sergiledikleri belirlendi. Söz konusu bulgular, kapsüllenmiş DOX HCl sayesinde daha yüksek dozlara daha az yan etki (ilaç direnci, sistemik toksisite, vb.) ile çıkılabileceğini ve dolayısıyla kanser tedavisinde klinik anlamda avantaj sağlanabileceğini düşündürmektedir.
- Hücresel alım analizi için ICG yüklü PAINPs, BAINPs ve EAINPs nanotaşıyıcıları kullanıldı. Hücresel alım analizi sonuçları, PAINPs ve BAINPs nanotaşıyıcılarının ICG'nin serbest formuna göre hücreye girişinin daha yüksek oranda olduğu floresan mikroskop görüntüleri ile ortaya konulmuştur. Hücresel alım sonuçları aynı zamanda DLS sonuçları ile uyumludur yani daha küçük boyutlu nanotaşıyıcıların hücresel alım oranı daha yüksektir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında üretilen DOX yüklü PADNPs, BADNPs ve EADNPs nanotaşıyıcıların fiziksel, kimyasal ve hücre kültürü çıktıları değerlendirildiğinde, bu nanotaşıyıcıların meme kanseri tedavisinde kullanılacak yeni ilaç taşıyıcı sistemler olabilme niteliği taşıdıkları ortaya konulmuştur. ICG enkapsüle edebilmeleri ve hücresel alımları değerlendirildiğinde, tez kapsamında üretilen bu nanotaşıyıcıların fotodinamik terapide de kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu açıktır. Bununla birlikte bu tez kapsamında üretilen nanopartiküller modifiye edilebilme özellikleri sayesinde farklı hedefleme yöntemleri kullanılarak gelecekte üretilebilecek hedeflendirilmiş nanotaşıyıcılar için alt yapı niteliği taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abamor, E., Allahverdiyev, A., Tosyali, O., Bagirova, M., Acar, T., Mustafaeva, Z. & Derman, S. (2019). Evaluation of in vitro and in vivo immunostimulatory activities of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with soluble and autoclaved *Leishmania infantum* antigens: A novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 12(8), 353–364. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.262564>
- Adam, H. K., Patterson, J. S. & Kemp, J. V. (1980). Studies on the metabolism and pharmacokinetics of tamoxifen in normal volunteers. *Cancer Treatment Reports*, 64(6–7), 761–764.
- Aghebati-Maleki, A., Dolati, S., Ahmadi, M., Baghbanzhadeh, A., Asadi, M., Fotouhi, A., Yousefi, M. & Aghebati-Maleki, L. (2020). Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 1962–1972. <https://doi.org/10.1002/jcp.29126>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Akram, S., Wang, X., Vandamme, T. F., Collot, M., Rehman, A. U., Messaddeq, N., Mély, Y. & Anton, N. (2019). Toward the Formulation of Stable Micro and Nano Double Emulsions through a Silica Coating on Internal Water Droplets. *Langmuir*, 35(6), 2313–2325. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03919>
- Al Faraj, A., Shaik, A. P. & Shaik, A. S. (2015). Magnetic single-walled carbon nanotubes as efficient drug delivery nanocarriers in breast cancer murine model: noninvasive monitoring using diffusion-weighted magnetic resonance imaging as sensitive imaging biomarker. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 157–168. <https://doi.org/10.2147/IJN.S75074>
- Alibolandi, M., Sadeghi, F., Abnous, K., Atyabi, F., Ramezani, M. & Hadizadeh, F. (2015). The chemotherapeutic potential of doxorubicin-loaded PEG-b-PLGA nanopolymerosomes in mouse breast cancer model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94, 521–531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.07.005>
- Amin, A. R. M. R., Karpowicz, P. A., Carey, T. E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z. G., Dong, J.-T., Kucuk, O., Khan, G. N., Huang, G. S., Mi, S., Lee, H.-Y., Reichrath, J., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C. S., ... Shin, D. M. (2015). Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S55–S77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.005>
- Anton, N. & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978–985. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>
- Araújo, J., Vega, E., Lopes, C., Egea, M. A., Garcia, M. L. & Souto, E. B. (2009). Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 48–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.028>
- Ashique, S., Sandhu, N. K., Chawla, V. & Chawla, P. A. (2021). Targeted Drug Delivery: Trends and Perspectives. *Current Drug Delivery*, 18(10), 1435–1455. <https://doi.org/10.2174/1567201818666210609161301>
- Ataollahi, M. R., Sharifi, J., Paknahad, M. R. & Paknahad, A. (2015). Breast cancer and associated factors: a review. *Journal of Medicine and Life*, 8(Spec Iss 4), 6–11.
- Atlan, M. & Neman, J. (2019). Targeted Transdermal Delivery of Curcumin for Breast Cancer Prevention. İçinde *International Journal of Environmental Research and Public Health* (C. 16, Sayı 24). <https://doi.org/10.3390/ijerph16244949>

- Aydın, A. A. (2012). Diesters of high-chain dicarboxylic acids with 1-tetradecanol as novel organic phase change materials for thermal energy storage. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, *104*, 102–108.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.solmat.2012.04.030>
- Babazadeh, A., Zeinali, M. & Hamishehkar, H. (2018). Nano-Phytosome: A Developing Platform for Herbal Anti-Cancer Agents in Cancer Therapy. *Current Drug Targets*, *19*(2), 170–180.  
<https://doi.org/10.2174/1389450118666170508095250>
- Badawy, A., Mosbah, A. & Shady, M. (2008). RETRACTED: Anastrozole or letrozole for ovulation induction in clomiphene-resistant women with polycystic ovarian syndrome: a prospective randomized trial. *Fertility and Sterility*, *89*(5), 1209–1212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.010>
- Baghaban-Eslaminejad, M., Oryan, A., Kamali, A. & Moshiri, A. (2017). Chapter 25 - The role of nanomedicine, nanotechnology, and nanostructures on oral bone healing, modeling, and remodeling. İçinde E. Andronescu & A. M. B. T.-N. for O. M. Grumezescu (Ed.), *Micro and Nano Technologies* (ss. 777–832). Elsevier.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8.00026-2>
- Banihashem, S., Nikpour Nezhati, M., Panahi, H. A. & Shakeri-Zadeh, A. (2020). Synthesis of novel chitosan-g-PNVCL nanofibers coated with gold-gold sulfide nanoparticles for controlled release of cisplatin and treatment of MCF-7 breast cancer. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *69*(18), 1197–1208. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1683557>
- Banik, B. L., Fattahi, P. & Brown, J. L. (2016). Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *8*(2), 271–299.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wnan.1364>
- Barkley, C. R., Ligibel, J. A., Wong, J. S., Lipsitz, S., Smith, B. L. & Golshan, M. (2008). Mucinous breast carcinoma: a large contemporary series. *The American Journal of Surgery*, *196*(4), 549–551.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2008.06.013>
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E. & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, *84*, 106535.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>
- Baskaran, B., Muthukumarasamy, A., Chidambaram, S., Sugumaran, A., Ramachandran, K. & Rasu Manimuthu, T. (2017). Cytotoxic potentials of biologically fabricated platinum nanoparticles from *Streptomyces* sp. on MCF-7 breast cancer cells. *IET Nanobiotechnology*, *11*(3), 241–246.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0040>
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C. & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, *46*(14), 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>
- Bhagwat, R. R. & Vaidhya, I. S. (2013). Novel Drug Delivery Systems: An Overview. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences and Research*, *4*(3), 970–982.
- Bianco, A. & Da Ros, T. (2007). Chapter 10 Biological Applications of Fullerenes. İçinde *Fullerenes: Principles and Applications* (ss. 301–328). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847557711-00301>
- Bikiaris, D. N., Papageorgiou, G. Z., Papadimitriou, S. A., Karavas, E. & Avgoustakis, K. (2009). Novel biodegradable polyester poly(propylene succinate): Synthesis and application in the preparation of solid dispersions and nanoparticles of a water-soluble drug. *AAPS PharmSciTech*, *10*(1), 138–146.  
<https://doi.org/10.1208/s12249-008-9184-z>
- Bilati, U., Allémann, E. & Doelker, E. (2005). Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues. *AAPS PharmSciTech*, *6*(4), E594–E604.

- <https://doi.org/10.1208/pt060474>
- Bines, J., Dienstmann, R., Obadia, R. M., Branco, L. G. P., Quintella, D. C., Castro, T. M., Camacho, P. G., Soares, F. A. & Costa, M. E. F. (2014). Activity of megestrol acetate in postmenopausal women with advanced breast cancer after nonsteroidal aromatase inhibitor failure: a phase II trial†. *Annals of Oncology*, 25(4), 831–836. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/annonc/mdu015>
- Bivas-Benita, M., Romeijn, S., Junginger, H. E. & Borchard, G. (2004). PLGA-PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 58(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.008>
- Bohrey, S., Chourasiya, V. & Pandey, A. (2016). Polymeric nanoparticles containing diazepam: preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study. *Nano Convergence*, 3(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40580-016-0061-2>
- Bombelli, F. B., Webster, C. A., Moncrieff, M. & Sherwood, V. (2014). The scope of nanoparticle therapies for future metastatic melanoma treatment. *The Lancet Oncology*, 15(1), e22–e32. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70333-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70333-4)
- Brown, S. & Khan, D. R. (2012). The treatment of breast cancer using liposome technology. *Journal of Drug Delivery*, 2012, 212965. <https://doi.org/10.1155/2012/212965>
- Bruckman, M. A., Czapar, A. E., VanMeter, A., Randolph, L. N. & Steinmetz, N. F. (2016). Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 231, 103–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.045>
- Budak, M. & Segmen, H. (2022). Cancer Genes and Breast Cancers. İçinde H. S. E.-P. D. M. B. E.-D. R. Rajkumar (Ed.), *Molecular Mechanisms in Cancer [Working Title]* (s. Ch. 5). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104801>
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N. & Khan, W. (2017). Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. İçinde *Pharmaceutics* (C. 9, Sayı 2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Bunggulawa, E. J., Wang, W., Yin, T., Wang, N., Durkan, C., Wang, Y. & Wang, G. (2018). Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0403-9>
- Cañadas, C., Alvarado, H., Calpena, A. C., Silva, A. M., Souto, E. B., García, M. L. & Abrego, G. (2016). In vitro, ex vivo and in vivo characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 511(2), 719–727. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.055>
- Caon, I., Bartolini, B., Parnigoni, A., Caravà, E., Moretto, P., Viola, M., Karousou, E., Vigetti, D. & Passi, A. (2020). Revisiting the hallmarks of cancer: The role of hyaluronan. *Seminars in Cancer Biology*, 62, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.007>
- Castro, R. I., Forero-Doria, O. & Guzmán, L. (2018). Perspectives of dendrimer-based nanoparticles in cancer therapy. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2), 2331–2346. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170387>
- Caulfield, S. E., Davis, C. C. & Byers, K. F. (2019). Olaparib: A Novel Therapy for Metastatic Breast Cancer in Patients With a BRCA1/2 Mutation. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 10(2), 167–174.
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N. & Karliner, J. S. (2010). Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 115(2), 155–162. <https://doi.org/10.1159/000265166>
- Chaturvedi, V. K., Singh, A., Singh, V. K. & Singh, M. P. (2019). Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Current*

- Drug Metabolism*, 20(6), 416–429.  
<https://doi.org/10.2174/1389200219666180918111528>
- Chaudhary, A. K., Beckman, E. J. & Russell, A. J. (1997). Biocatalytic polyester synthesis: Analysis of the evolution of molecular weight and end group functionality. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(1), 227–239.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970705\)55:1<227::AID-BIT23>3.0.CO;2-H](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970705)55:1<227::AID-BIT23>3.0.CO;2-H)
- Chavez, K. J., Garimella, S. V & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 32(1–2), 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- Chen, S., Liu, Y., Zhu, S., Chen, C., Xie, W., Xiao, L., Zhu, Y., Hao, L., Wang, Z., Sun, J. & Chang, S. (2018). Dual-mode imaging and therapeutic effects of drug-loaded phase-transition nanoparticles combined with near-infrared laser and low-intensity ultrasound on ovarian cancer. *Drug Delivery*, 25(1), 1683–1693.  
<https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1507062>
- Chen, Z., Yang, J., Li, S., Lv, M., Shen, Y., Wang, B., Li, P., Yi, M., Zhao, X., Zhang, L., Wang, L. & Yang, J. (2017). Invasive lobular carcinoma of the breast: A special histological type compared with invasive ductal carcinoma. *PLOS ONE*, 12(9), e0182397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182397>
- Chidambaram, M. & Krishnasamy, K. (2014). Modifications to the conventional nanoprecipitation technique: an approach to fabricate narrow sized polymeric nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(2), 205–208.  
<https://doi.org/10.5681/apb.2014.030>
- Cho, H., Lai, T. C., Tomoda, K. & Kwon, G. S. (2015). Polymeric Micelles for Multi-Drug Delivery in Cancer. *AAPS PharmSciTech*, 16(1), 10–20.  
<https://doi.org/10.1208/s12249-014-0251-3>
- Choi, S.-W. & Kim, J.-H. (2007). Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone. *Journal of Controlled Release*, 122(1), 24–30.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.06.003>
- Chopra, S. & Davies, E. L. (2020). Breast cancer. *Medicine*, 48(2), 113–118.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.009>
- Chuaychai, A. & Sriplung, H. (2022). A rapid rise in hormone receptor-positive and HER2-positive breast cancer subtypes in Southern Thai women: A population-based study in Songkhla. *PLOS ONE*, 17(3), e0265417.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265417>
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M. & Raica, M. (2015). The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154.
- Costa, B., Amorim, I., Gärtner, F. & Vale, N. (2020). Understanding Breast cancer: from conventional therapies to repurposed drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 151, 105401.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105401>
- Cree, I. A. (2011). Cancer biology. İçinde I. A. Cree (Ed.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (C. 731, ss. 1–11). Humana Press.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_1)
- Crucho, C. I. C. & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 771–784.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>
- Cuzick, J., Sestak, I., Forbes, J. F., Dowsett, M., Cawthorn, S., Mansel, R. E., Loibl, S., Bonanni, B., Evans, D. G. & Howell, A. (2020). Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 395(10218), 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32955-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32955-1)
- Damyanov, C. A., Maslev, I. K. & Pavlov, V. S. (2018). Conventional Treatment of

- Cancer Realities and Problems. *Annals of Complementary and Alternative Medicine*, 1(1), 1–9.
- Danafar, H., Sharafi, A., Kheiri Manjili, H. & Andalib, S. (2017). Sulforaphane delivery using mPEG–PCL co-polymer nanoparticles to breast cancer cells. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(5), 642–651. <https://doi.org/10.3109/10837450.2016.1146296>
- Davis, M. E., Chen, Z. (Georgia) & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(9), 771–782. <https://doi.org/10.1038/nrd2614>
- Debnath, S., Saloum, D., Dolai, S., Sun, C., Averick, S., Raja, K. & Fata, E. J. (2013). Dendrimer-Curcumin Conjugate: A Water Soluble and Effective Cytotoxic Agent Against Breast Cancer Cell Lines. İçinde *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* (C. 13, Sayı 10, ss. 1531–1539). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/18715206113139990139>
- Decuzzi, P., Pasqualini, R., Arap, W. & Ferrari, M. (2008). Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter? *Pharmaceutical Research*, 26(1), 235. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9697-x>
- Deng, Z. J., Morton, S. W., Ben-Akiva, E., Dreaden, E. C., Shropsowitz, K. E. & Hammond, P. T. (2013). Layer-by-Layer Nanoparticles for Systemic Codelivery of an Anticancer Drug and siRNA for Potential Triple-Negative Breast Cancer Treatment. *ACS Nano*, 7(11), 9571–9584. <https://doi.org/10.1021/nn4047925>
- DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Goding Sauer, A., Kramer, J. L., Smith, R. A. & Jemal, A. (2016). Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 31–42. <https://doi.org/10.3322/caac.21320>
- Desgouilles, S., Vauthier, C., Bazile, D., Vacus, J., Grossiord, J.-L., Veillard, M. & Couvreur, P. (2003). The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study. *Langmuir*, 19(22), 9504–9510. <https://doi.org/10.1021/la034999q>
- Ding, D. & Zhu, Q. (2018). Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 1041–1060. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.036>
- Donahue, N. D., Acar, H. & Wilhelm, S. (2019). Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 143, 68–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>
- Elzoghby, A. O., El-Lakany, S. A., Helmy, M. W., Abu-Serie, M. M. & Elgindy, N. A. (2017). Shell-crosslinked zein nanocapsules for oral codelivery of exemestane and resveratrol in breast cancer therapy. *Nanomedicine*, 12(24), 2785–2805. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0247>
- Emdad, L., Bhoopathi, P., Talukdar, S., Pradhan, A. K., Sarkar, D., Wang, X.-Y., Das, S. K. & Fisher, P. B. (2020). Recent insights into apoptosis and toxic autophagy: The roles of MDA-7/IL-24, a multidimensional anti-cancer therapeutic. *Seminars in Cancer Biology*, 66, 140–154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.013>
- Esfandiarpour-Boroujeni, S., Bagheri-Khoulenjani, S., Mirzadeh, H. & Amanpour, S. (2017). Fabrication and study of curcumin loaded nanoparticles based on folate-chitosan for breast cancer therapy application. *Carbohydrate Polymers*, 168, 14–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.031>
- Esmaeili, F., Atyabi, F. & Dinarvand, R. (2007). Preparation of PLGA nanoparticles using TPGS in the spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Journal of Experimental Nanoscience*, 2(3), 183–192. <https://doi.org/10.1080/17458080701393137>
- Fan, X., Yang, J., Loh, X. J. & Li, Z. (2019). Polymeric Janus Nanoparticles: Recent Advances in Synthetic Strategies, Materials Properties, and Applications.

- Macromolecular Rapid Communications*, 40(5), e1800203.  
<https://doi.org/10.1002/marc.201800203>
- Farokhzad, O. C. & Langer, R. (2009). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>
- Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppapalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C. & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77–106.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>
- Fernald, K. & Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology*, 23(12), 620–633. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.07.006>
- Ferrari, N., Mohammed, Z. M. A., Nixon, C., Mason, S. M., Mallon, E., McMillan, D. C., Morris, J. S., Cameron, E. R., Edwards, J. & Blyth, K. (2014). Expression of RUNX1 Correlates with Poor Patient Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. *PLOS ONE*, 9(6), e100759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100759>
- Fornaguera, C., Dols-Perez, A., Calderó, G., García-Celma, M. J., Camarasa, J. & Solans, C. (2015). PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 211, 134–143.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.06.002>
- Foroozandeh, P. & Aziz, A. A. (2018). Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 13(1), 339.  
<https://doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>
- Friedman, G. D., Udaltsova, N., Chan, J., Quesenberry, C. P. J. & Habel, L. A. (2009). Screening pharmaceuticals for possible carcinogenic effects: initial positive results for drugs not previously screened. *Cancer Causes & Control: CCC*, 20(10), 1821–1835. <https://doi.org/10.1007/s10552-009-9375-2>
- Gener, P., Montero, S., Xandri-Monje, H., Díaz-Riascos, Z. V., Rafael, D., Andrade, F., Martínez-Trucharte, F., González, P., Seras-Franzoso, J., Manzano, A., Arango, D., Sayós, J., Abasolo, I. & Schwartz, S. (2020). Zileuton<sup>TM</sup> loaded in polymer micelles effectively reduce breast cancer circulating tumor cells and intratumoral cancer stem cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 24, 102106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102106>
- Gong, C., Shi, S., Dong, P., Kan, B., Gou, M., Wang, X., Li, X., Luo, F., Zhao, X., Wei, Y. & Qian, Z. (2009). Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. *International Journal of Pharmaceutics*, 365(1), 89–99.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.027>
- Greene, M. K., Johnston, M. C. & Scott, C. J. (2021). Nanomedicine in Pancreatic Cancer: Current Status and Future Opportunities for Overcoming Therapy Resistance. *Çinde Cancers* (C. 13, Sayı 24).  
<https://doi.org/10.3390/cancers13246175>
- Grumezescu, A. M. (2017). *Design and Development of New Nanocarriers* (A. M. Grumezescu (ed.); 1st Editio). William Andrew Publishing.
- Gulfam, M., Kim, J., Lee, J. M., Ku, B., Chung, B. H. & Chung, B. G. (2012). Anticancer Drug-Loaded Gliadin Nanoparticles Induce Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Langmuir*, 28(21), 8216–8223. <https://doi.org/10.1021/la300691n>
- Guney Eskiler, G., Cecener, G., Dikmen, G., Egeli, U. & Tunca, B. (2018). Solid lipid nanoparticles: Reversal of tamoxifen resistance in breast cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 120, 73–88. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.04.040>
- Guo, X.-L., Kang, X.-X., Wang, Y.-Q., Zhang, X.-J., Li, C.-J., Liu, Y. & Du, L.-B. (2019). Co-delivery of cisplatin and doxorubicin by covalently conjugating with polyamidoamine dendrimer for enhanced synergistic cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 84, 367–377.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.007>
- Guterres, S. S., Alves, M. P. & Pohlmann, A. R. (2007). Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*, 2(1 SE-Review). <https://doi.org/10.33393/dti.2007.1300>
- Haley, B. & Frenkel, E. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 26(1), 57–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2007.03.015>
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, L., Batist, G., Belt, R., Rovira, D., Navari, R., Azarnia, N., Welles, L. & Winer, E. (2002). Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 94(1), 25–36. <https://doi.org/10.1002/cncr.10201>
- Hashemzahi, M., Behnam-Rassouli, R., Hassanian, S. M., Moradi-Binabaj, M., Moradi-Marjaneh, R., Rahmani, F., Fiuji, H., Jamili, M., Mirahmadi, M., Boromand, N., Piran, M., Jafari, M., Sahebkar, A., Avan, A. & Khazaei, M. (2018). Phytosomal-curcumin antagonizes cell growth and migration, induced by thrombin through AMP-Kinase in breast cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(7), 5996–6007. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcb.26796>
- Hassanpour, S. H. & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>
- Holen, I., Speirs, V., Morrissey, B. & Blyth, K. (2017). In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. *Disease Models & Mechanisms*, 10(4), 359–371. <https://doi.org/10.1242/dmm.028274>
- Hoy, S. M. (2018). Talazoparib: First Global Approval. *Drugs*, 78(18), 1939–1946. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1026-z>
- Huang, Y.-P., Hung, C.-M., Hsu, Y.-C., Zhong, C.-Y., Wang, W.-R., Chang, C.-C. & Lee, M.-J. (2016). Suppression of Breast Cancer Cell Migration by Small Interfering RNA Delivered by Polyethylenimine-Functionalized Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters*, 11(1), 247. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1463-0>
- Ibrahim, H., Ibrahim, M. & Temerk, Y. (2019). A novel megestrol acetate electrochemical sensor based on conducting functionalized acetylene black-CeO(2)NPs nanohybrids decorated glassy carbon microspheres. *Talanta*, 200, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.029>
- Jadidi-Niaragh, F., Atyabi, F., Rastegari, A., Kheshtchin, N., Arab, S., Hassannia, H., Ajami, M., Mirsanei, Z., Habibi, S., Masoumi, F., Noorbakhsh, F., Shokri, F. & Hadjati, J. (2017). CD73 specific siRNA loaded chitosan lactate nanoparticles potentiate the antitumor effect of a dendritic cell vaccine in 4T1 breast cancer bearing mice. *Journal of Controlled Release*, 246, 46–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.012>
- Jadon, R. S. & Sharma, M. (2019). Docetaxel-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for breast cancer therapeutics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 475–484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.039>
- Jain, A., Sharma, G., Ghoshal, G., Kesharwani, P., Singh, B., Shivhare, U. S. & Katare, O. P. (2018). Lycopene loaded whey protein isolate nanoparticles: An innovative endeavor for enhanced bioavailability of lycopene and anti-cancer activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 546(1), 97–105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.061>
- Jain, A., Sharma, G., Kushwah, V., Garg, N. K., Kesharwani, P., Ghoshal, G., Singh, B., Shivhare, U. S., Jain, S. & Katare, O. P. (2017). Methotrexate and beta-carotene loaded-lipid polymer hybrid nanoparticles: a preclinical study for breast cancer. *Nanomedicine*, 12(15), 1851–1872. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017->

0011

- Jain, S., Hirst, D. G. & O'Sullivan, J. M. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *The British Journal of Radiology*, 85(1010), 101–113. <https://doi.org/10.1259/bjr/59448833>
- Jenjob, R., Phakkeeree, T., Seidi, F., Theerasilp, M. & Crespy, D. (2019). Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*, 19(6), 1900063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mabi.201900063>
- Jeyaraj, M., Sathishkumar, G., Sivanandhan, G., MubarakAli, D., Rajesh, M., Arun, R., Kapildev, G., Manickavasagam, M., Thajuddin, N., Premkumar, K. & Ganapathi, A. (2013). Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, 86–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.027>
- Jin, X., Zhang, P., Luo, L., Cheng, H., Li, Y., Du, T., Zou, B. & Gou, M. (2016). Efficient intravesical therapy of bladder cancer with cationic doxorubicin nanoassemblies. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4535–4544. <https://doi.org/10.2147/IJN.S103994>
- Jose, S., Sowmya, S., Cinu, T. A., Aleykutty, N. A., Thomas, S. & Souto, E. B. (2014). Surface modified PLGA nanoparticles for brain targeting of Bacoside-A. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63, 29–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.06.024>
- Joseph, B., Jack, M., Alan, H. & Edna, K. (2017). Secretory Carcinoma of the Breast: An Elusive Presentation of This Rare Pathology. *International Journal of Oncology Research*, 1(1), 2–5. <https://doi.org/10.23937/ijor-2017/1710002>
- Kabanov, A. V & Gendelman, H. E. (2007). Nanomedicine in the diagnosis and therapy of neurodegenerative disorders. *Progress in Polymer Science*, 32(8–9), 1054–1082. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.014>
- Kamińska, M., Ciszewski, T., Łopacka-Szatan, K., Miotła, P. & Starosławska, E. (2015). Breast cancer risk factors. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny*, 14(3), 196–202. <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>
- Kang, K. W., Chun, M.-K., Kim, O., Subedi, R. K., Ahn, S.-G., Yoon, J.-H. & Choi, H.-K. (2010). Doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 210–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.12.006>
- Kanter, P. M., Bullard, G. A., Pilkiewicz, F. G., Mayer, L. D., Cullis, P. R. & Pavelic, Z. P. (1993). Preclinical toxicology study of liposome encapsulated doxorubicin (TLC D-99): comparison with doxorubicin and empty liposomes in mice and dogs. *In Vivo (Athens, Greece)*, 7(1), 85–95.
- Kaplan, Ö., Gökşen Tosun, N., Özgür, A., Erden Tayhan, S., Bilgin, S., Türkecul, İ. & Gökce, İ. (2021). Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using crude extracts of *Boletus edulis* and *Coriolus versicolor*: Characterization, anticancer, antimicrobial and wound healing activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 64, 102641. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102641>
- Karabulutlu, E. Y., Avcı, İ. A., Karayurt, Ö., Gürsoy, A., Köşgeroğlu, N., Tuna, A., Ersin, F., Arıkan, F. & Karaman, S. (2019). Evaluation of Illness Perception of Women with Breast Cancer in Turkey. *European Journal of Breast Health*, 15(2), 98–104. <https://doi.org/10.5152/ejbh.2019.4317>
- Karakas, C. (2011). Paget's disease of the breast. *Journal of Carcinogenesis*, 10. <https://doi.org/10.4103/1477-3163.90676>
- Karavelidis, V., Bikiaris, D. & Avgoustakis, K. (2015). New thermosensitive nanoparticles prepared by biocompatible pegylated aliphatic polyester block copolymers for local cancer treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(2), 215–230. <https://doi.org/10.1111/jphp.12337>

- Katiyar, S. S., Muntimadugu, E., Rafeeqi, T. A., Domb, A. J. & Khan, W. (2016). Co-delivery of rapamycin- and piperine-loaded polymeric nanoparticles for breast cancer treatment. *Drug Delivery*, 23(7), 2608–2616. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1039667>
- Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M. & Mozafari, M. (2018). Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 8013–8024.
- Kikuchi, H., Yuan, B., Hu, X. & Okazaki, M. (2019). Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *American Journal of Cancer Research*, 9(8), 1517–1535.
- Kim, C., Cho, E. C., Chen, J., Song, K. H., Au, L., Favazza, C., Zhang, Q., Cobley, C. M., Gao, F., Xia, Y. & Wang, L. V. (2010). In Vivo Molecular Photoacoustic Tomography of Melanomas Targeted by Bioconjugated Gold Nanocages. *ACS Nano*, 4(8), 4559–4564. <https://doi.org/10.1021/nn100736c>
- Kimiz-Gebologlu, I., Gulce-Iz, S. & Biray-Avci, C. (2018). Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2935–2940. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4427-x>
- Kızılbey, K. (2019). Optimization of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles Synthesized by Single-Emulsion Solvent Evaporation Method. *ACS Omega*, 4(1), 555–562. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02767>
- Kotecki, N., Gombos, A. & Awada, A. (2019). Adjuvant therapeutic approaches of HER2-positive breast cancer with a focus on neratinib maleate. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 19(6), 447–454. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1613892>
- Krishnamoorthy, K. & Mahalingam, M. (2015). Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: multi-criteria decision making approach. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(1), 57–67. <https://doi.org/10.5681/apb.2015.008>
- Küçükzeybek, Y., Bolat Küçükzeybek, B. & Demir, C. (2010). HER2 Pozitif Metastatik Meme Kanserlerinde Trastuzumab İçeren Kemoterapi İle Progresyon Sonrasında Tedavi Seçenekleri. *Van Tıp Dergisi*, 17(4), 164–169.
- Kumar, A., Lale, S. V, Mahajan, S., Choudhary, V. & Koul, V. (2015). ROP and ATRP Fabricated Dual Targeted Redox Sensitive Polymersomes Based on pPEGMA-PCL-ss-PCL-pPEGMA Triblock Copolymers for Breast Cancer Therapeutics. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(17), 9211–9227. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01731>
- Kumar, K., Teotia, D. & Al-kaf, A. G. A. (2018). *Clinical application of perilla oil in breast cancer*. 6, 59–63.
- Kumar, S., Dilbaghi, N., Saharan, R. & Bhanjana, G. (2012). Nanotechnology as Emerging Tool for Enhancing Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. *BioNanoScience*, 2(4), 227–250. <https://doi.org/10.1007/s12668-012-0060-7>
- Kumari, P., Muddineti, O. S., Rompicharla, S. V. K., Ghanta, P., B B N, A. K., Ghosh, B. & Biswas, S. (2017). Cholesterol-conjugated poly(D, L-lactide)-based micelles as a nanocarrier system for effective delivery of curcumin in cancer therapy. *Drug Delivery*, 24(1), 209–223. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1245365>
- Kurashina, Y., Imashiro, C., Hirano, M., Kuribara, T., Totani, K., Ohnuma, K., Friend, J. & Takemura, K. (2019). Enzyme-free release of adhered cells from standard culture dishes using intermittent ultrasonic traveling waves. *Communications Biology*, 2(1), 393. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0638-5>
- Laderian, B. & Fojo, T. (2017). CDK4/6 Inhibition as a therapeutic strategy in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Seminars in Oncology*, 44(6), 395–403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.03.006>
- Lee, J. E., Kim, M. G., Jang, Y. L., Lee, M. S., Kim, N. W., Yin, Y., Lee, J. H., Lim, S.

- Y., Park, J. W., Kim, J., Lee, D. S., Kim, S. H. & Jeong, J. H. (2018). Self-assembled PEGylated albumin nanoparticles (SPAN) as a platform for cancer chemotherapy and imaging. *Drug Delivery*, 25(1), 1570–1578. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1489430>
- Lee, J. S. & Feijen, J. (2012). Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 473–483. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.005>
- Lee, K. S., Chung, H. C., Im, S. A., Park, Y. H., Kim, C. S., Kim, S.-B., Rha, S. Y., Lee, M. Y. & Ro, J. (2008). Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 108(2), 241–250. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9591-y>
- Lee, Y. H. & Ma, Y. T. (2017). Synthesis, characterization, and biological verification of anti-HER2 indocyanine green-doxorubicin-loaded polyethyleneimine-coated perfluorocarbon double nanoemulsions for targeted photochemotherapy of breast cancer cells. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0274-5>
- Levine, A. J., Hu, W. & Feng, Z. (2008). *Chapter 3 - Tumor Suppressor Genes* (J. Mendelsohn, P. M. Howley, M. A. Israel, J. W. Gray, & C. B. B. T.-T. M. B. of C. (Third E. Thompson (ed.); ss. 31–38). W.B. Saunders. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-141603703-3.10003-2>
- Li, H., Wang, K., Yang, X., Zhou, Y., Ping, Q., Oupicky, D. & Sun, M. (2017). Dual-function nanostructured lipid carriers to deliver IR780 for breast cancer treatment: Anti-metastatic and photothermal anti-tumor therapy. *Acta Biomaterialia*, 53, 399–413. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.070>
- Li, L. & Li, W. (2015). Epithelial–mesenchymal transition in human cancer: Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacology & Therapeutics*, 150, 33–46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.004>
- Lim, K. & Hamid, Z. A. A. (2018). 10 - Polymer nanoparticle carriers in drug delivery systems: Research trend. İçinde Inamuddin, A. M. Asiri & A. B. T.-A. of N. M. in D. D. Mohammad (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Biomaterials* (ss. 217–237). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813741-3.00010-8>
- Limaiem, F. & Mlika, M. (2021). *Medullary Breast Carcinoma*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <http://europepmc.org/abstract/MED/31194432>
- Liu, C., Gao, H., Zhao, Z., Rostami, I., Wang, C., Zhu, L. & Yang, Y. (2019). Improved tumor targeting and penetration by a dual-functional poly(amidoamine) dendrimer for the therapy of triple-negative breast cancer. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(23), 3724–3736. <https://doi.org/10.1039/C9TB00433E>
- Liu, T., Romanova, S., Wang, S., Hyun, M. A., Zhang, C., Cohen, S. M., Singh, R. K. & Bronich, T. K. (2019). Alendronate-Modified Polymeric Micelles for the Treatment of Breast Cancer Bone Metastasis. *Molecular Pharmaceutics*, 16(7), 2872–2883. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01343>
- Liu, Y., Yang, G., Zou, D., Hui, Y., Nigam, K., Middelberg, A. P. J. & Zhao, C.-X. (2020). Formulation of Nanoparticles Using Mixing-Induced Nanoprecipitation for Drug Delivery. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59(9), 4134–4149. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b04747>
- Liu, Z., Lv, D., Liu, S., Gong, J., Wang, D., Xiong, M., Chen, X., Xiang, R. & Tan, X. (2013). Alginic Acid-Coated Chitosan Nanoparticles Loaded with Legumain DNA Vaccine: Effect against Breast Cancer in Mice. *PLOS ONE*, 8(4), e60190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060190>
- Logie, J., Owen, S. C., McLaughlin, C. K. & Shoichet, M. S. (2014). PEG-Graft Density Controls Polymeric Nanoparticle Micelle Stability. *Chemistry of Materials*, 26(9), 2847–2855. <https://doi.org/10.1021/cm500448x>

- Lu, B., Xiong, S.-B., Yang, H., Yin, X.-D. & Chao, R.-B. (2006). Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 86–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.01.001>
- M Deshpande, T., Pandey, A. & Shyama, S. (2017). Review: Breast cancer and etiology. *Trends in Medicine*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.15761/tim.1000110>
- Mahanta, S. & Paul, S. (2015). Bovine  $\alpha$ -lactalbumin functionalized graphene oxide nano-sheet exhibits enhanced biocompatibility: A rational strategy for graphene-based targeted cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, 178–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.06.061>
- Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights. Pathology*, 8, 23–31. <https://doi.org/10.4137/CPath.S31563>
- Marcu, A., Pop, S., Dumitrache, F., Mocanu, M., Niculite, C. M., Gherghiceanu, M., Lungu, C. P., Fleaca, C., Ianchis, R., Barbut, A., Grigoriu, C. & Morjan, I. (2013). Magnetic iron oxide nanoparticles as drug delivery system in breast cancer. *Applied Surface Science*, 281, 60–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.02.072>
- Marta, T., Luca, S., Serena, M., Luisa, F. & Fabio, C. (2016). What Is the Role of Nanotechnology in Diagnosis and Treatment of Metastatic Breast Cancer? Promising Scenarios for the Near Future. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 5436458. <https://doi.org/10.1155/2016/5436458>
- Martínez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Galindo Rodríguez, S. A., Román, R. A., Fessi, H. & Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 66–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>
- Mavratzas, A., Seitz, J., Smetanay, K., Schneeweiss, A., Jäger, D. & Fremd, C. (2019). Atezolizumab for use in PD-L1-positive unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. *Future Oncology*, 16(3), 4439–4453. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0468>
- McCrudden, C. M. & McCarthy, H. O. (2014). Current status of gene therapy for breast cancer: progress and challenges. *The Application of Clinical Genetics*, 7, 209–220. <https://doi.org/10.2147/TACG.S54992>
- McGuire, S. (2016). World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Advances in Nutrition*, 7(2), 418–419. <https://doi.org/10.3945/an.116.012211>
- McNamara, J. (1923). The etiology of cancer. *British Medical Journal*, 2(3274), 586–587. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.3274.586-a>
- Meng, H., Mai, W. X., Zhang, H., Xue, M., Xia, T., Lin, S., Wang, X., Zhao, Y., Ji, Z., Zink, J. I. & Nel, A. E. (2013). Codelivery of an optimal drug/siRNA combination using mesoporous silica nanoparticles to overcome drug resistance in breast cancer in vitro and in vivo. *ACS Nano*, 7(2), 994–1005. <https://doi.org/10.1021/nn3044066>
- Miele, E., Spinelli, G. P., Miele, E., Tomao, F. & Tomao, S. (2009). Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 4, 99–105. <https://doi.org/10.2147/ijn.s3061>
- Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P. C. & Maitra, A. N. (2001). Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *Journal of Controlled Release*, 74(1), 317–323. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00342-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00342-X)
- Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V. & Ravi Kumar, M. N. V. (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo.

- Journal of Controlled Release*, 119(1), 77–85.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.016>
- Miyai, K., Schwartz, M. R., Divatia, M. K., Anton, R. C., Park, Y. W., Ayala, A. G. & Ro, J. Y. (2014). Adenoid cystic carcinoma of breast: Recent advances. *World Journal of Clinical Cases*, 2(12), 732–741.  
<https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.732>
- Mosqueira, V. C. F., Legrand, P., Morgat, J. L., Vert, M., Mysiakine, E., Gref, R., Devissaguet, J. P. & Barratt, G. (2001). Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: Effects of PEG chain length and density. *Pharmaceutical Research*, 18(10), 1411–1419.  
<https://doi.org/10.1023/A:1012248721523>
- Moy, B., Kirkpatrick, P., Kar, S. & Goss, P. (2007). Lapatinib. İçinde *Nature reviews. Drug discovery* (C. 6, Sayı 6, ss. 431–432). <https://doi.org/10.1038/nrd2332>
- Mughees, M., Sadaf, M., Khan, S., Rasheed, A., Daniel, K. & Gelani, H. E. (2020). Impact of Shading, Dust Accumulation and Temperature rise on the Performance of Solar PV: The Case of Pakistan. *2020 International Symposium on Recent Advances in Electrical Engineering & Computer Sciences (RAEE & CS)*, 5, 1–6.  
<https://doi.org/10.1109/RAEECS50817.2020.9265837>
- Najafi-Hajivar, S., Zakeri-Milani, P., Mohammadi, H., Niazi, M., Soleymani-Goloujeh, M., Baradaran, B. & Valizadeh, H. (2016). Overview on experimental models of interactions between nanoparticles and the immune system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 1365–1378.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.060>
- Nakamura, K. & Smyth, M. J. (2020). Myeloid immunosuppression and immune checkpoints in the tumor microenvironment. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0306-1>
- Nanaki, S., Barmplexis, P., Papakonstantinou, Z., Christodoulou, E., Kostoglou, M. & Bikiaris, D. N. (2018). Preparation of New Risperidone Depot Microspheres Based on Novel Biocompatible Poly(Alkylene Adipate) Polyesters as Long-Acting Injectable Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(11), 2891–2901.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.07.029>
- Nelemans, L. C. & Gurevich, L. (2020). Drug Delivery with Polymeric Nanocarriers- Cellular Uptake Mechanisms. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(2).  
<https://doi.org/10.3390/ma13020366>
- Nenclares, P. & Harrington, K. J. (2020). The biology of cancer. *Medicine*, 48(2), 67–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.001>
- Ngamcherdrakul, W. & Yantasee, W. (2019). siRNA therapeutics for breast cancer: recent efforts in targeting metastasis, drug resistance, and immune evasion. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 214, 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.08.005>
- Nguyen, Q. D. & He, J. (2021). Invasive Ductal Carcinoma NST and Special Subtypes: Radiology-Pathology Correlation. *Current Breast Cancer Reports*, 13(4), 347–364.  
<https://doi.org/10.1007/s12609-021-00436-w>
- Nicolas, S., Bolzinger, M.-A., Jordheim, L. P., Chevalier, Y., Fessi, H. & Almouazen, E. (2018). Polymeric nanocapsules as drug carriers for sustained anticancer activity of calcitriol in breast cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 550(1), 170–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.022>
- Nindrea, R. D., Aryandono, T. & Lazuardi, L. (2017). Breast Cancer Risk From Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors among Women in Southeast Asia: A Meta-Analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 18(12), 3201–3206. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.12.3201>
- Niza, E., Božik, M., Bravo, I., Clemente-Casares, P., Lara-Sanchez, A., Juan, A., Klouček, P. & Alonso-Moreno, C. (2020). PEI-coated PLA nanoparticles to enhance the antimicrobial activity of carvacrol. *Food Chemistry*, 328, 127131.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127131>

- Olusanya, T. O. B., Haj Ahmad, R. R., Ibegbu, D. M., Smith, J. R. & Elkordy, A. A. (2018). Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. İçinde *Molecules* (C. 23, Sayı 4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>
- Onaca, O., Enea, R., Hughes, D. W. & Meier, W. (2009). Stimuli-Responsive Polymersomes as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *Macromolecular Bioscience*, 9(2), 129–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mabi.200800248>
- Özgür, A., Kara, A., Gökşen Tosun, N., Tekin, Ş. & Gökçe, İ. (2021). Debio-0932, a second generation oral Hsp90 inhibitor, induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Molecular Biology Reports*, 48(4), 3439–3449. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06392-z>
- Pal, S. K., Lau, S. K., Kruper, L., Nwoye, U., Garberoglio, C., Gupta, R. K., Paz, B., Vora, L., Guzman, E., Artinyan, A. & Somlo, G. (2010). Papillary carcinoma of the breast: an overview. *Breast Cancer Research and Treatment*, 122(3), 637–645. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0961-5>
- Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P. & Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(06), 228–234.
- Palmerston Mendes, L., Pan, J. & Torchilin, V. P. (2017). Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. İçinde *Molecules* (C. 22, Sayı 9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091401>
- Pandey, S. K., Patel, D. K., Maurya, A. K., Thakur, R., Mishra, D. P., Vinayak, M., Haldar, C. & Maiti, P. (2016). Controlled release of drug and better bioavailability using poly(lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 99–110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.065>
- Park, J. H., Lee, S., Kim, J.-H., Park, K., Kim, K. & Kwon, I. C. (2008). Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Progress in Polymer Science*, 33(1), 113–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.09.003>
- Periasamy, V. S., Athinarayanan, J. & Alshatwi, A. A. (2016). Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of Nigella sativa L. essential oil on human breast cancer cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 449–455. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.035>
- Perrault, S. D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H. C. & Chan, W. C. W. (2009). Mediating Tumor Targeting Efficiency of Nanoparticles Through Design. *Nano Letters*, 9(5), 1909–1915. <https://doi.org/10.1021/nl900031y>
- Petros, R. A. & DeSimone, J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(8), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>
- Phromviyo, N., Swatsitang, E. & Chompoosor, A. (2014). Effect of a surface stabilizer on the formation of polyoxalate nanoparticles and their release profiles. *Vacuum*, 107, 208–212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2014.02.004>
- Piazza, R. D., Brandt, J. V., Gobo, G. G., Tedesco, A. C., Primo, F. L., Marques, R. F. C. & Junior, M. J. (2018). mPEG-co-PCL nanoparticles: The influence of hydrophobic segment on methotrexate drug delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 555, 142–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.06.076>
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro António J. & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Prabhu, R. H., Patravale, V. B. & Joshi, M. D. (2015). Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1001–1018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56932>
- Pullan, J. E., Confeld, M. I., Osborn, J. K., Kim, J., Sarkar, K. & Mallik, S. (2019). Exosomes as Drug Carriers for Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 16(5),

- 1789–1798. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00104>
- Qi, H., Li, Z., Du, K., Mu, K., Zhou, Q., Liang, S., Zhu, W., Yang, X. & Zhu, Y. (2014). Transferrin-targeted magnetic/fluorescence micelles as a specific bi-functional nanoprobe for imaging liver tumor. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 595. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-595>
- Rajan, M., Murugan, M., Ponnamma, D., Sadasivuni, K. K. & Munusamy, M. A. (2016). Poly-carboxylic acids functionalized chitosan nanocarriers for controlled and targeted anti-cancer drug delivery. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 83, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.026>
- Ramaswamy, S. V. P., Narendhran, S. & Sivaraj, R. (2016). Potentiating effect of ecofriendly synthesis of copper oxide nanoparticles using brown alga: Antimicrobial and anticancer activities. *Bulletin of Materials Science*, 39(2), 361–364. <https://doi.org/10.1007/s12034-016-1173-3>
- Rao, J. P. & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.01.001>
- Rasheed, M., Ali, A., Kanwal, S., Ismail, M., Sabir, N. & Amin, F. (2019). Synergy of green tea reduced tamoxifen-loaded silver nanoparticles exhibit ogt downregulation in breast cancer cell line. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 14(3), 695–704.
- Raza, K., Thotakura, N., Kumar, P., Joshi, M., Bhushan, S., Bhatia, A., Kumar, V., Malik, R., Sharma, G., Guru, S. K. & Katare, O. P. (2015). C60-fullerenes for delivery of docetaxel to breast cancer cells: A promising approach for enhanced efficacy and better pharmacokinetic profile. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(1), 551–559. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.016>
- Ren, P., Ren, X., Cheng, L. & Xu, L. (2018). Frankincense, pine needle and geranium essential oils suppress tumor progression through the regulation of the AMPK/mTOR pathway in breast cancer. *Oncology Reports*, 39(1), 129–137. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6067>
- Rokade, S. S., Joshi, K. A., Mahajan, K., Patil, S., Tomar, G., Dubal, D. S., Parihar, V. S., Kitture, R., Bellare, J. R. & Ghosh, S. (2018). Gloriosa superba Mediated Synthesis of Platinum and Palladium Nanoparticles for Induction of Apoptosis in Breast Cancer. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 4924186. <https://doi.org/10.1155/2018/4924186>
- Rosenblum, D., Joshi, N., Tao, W., Karp, J. M. & Peer, D. (2018). Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Çinde Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03705-y>
- Roudsari, L. C. & West, J. L. (2016). Studying the influence of angiogenesis in in vitro cancer model systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 250–259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.004>
- Rugo, H. S., Finn, R. S., Diéras, V., Ettl, J., Lipatov, O., Joy, A. A., Harbeck, N., Castellon, A., Iyer, S., Lu, D. R., Mori, A., Gauthier, E. R., Bartlett, C. H., Gelmon, K. A. & Slamon, D. J. (2019). Palbociclib plus letrozole as first-line therapy in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer with extended follow-up. *Breast Cancer Research and Treatment*, 174(3), 719–729. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05125-4>
- Sabatier, R., Sabiani, L., Zemmour, C., Taix, S., Chereau, E., Gonçalves, A., Jalaguier-Coudray, A., Charafe-Jauffret, E., Resbeut, M., Extra, J.-M., Viens, P. & Tallet, A. (2016). Invasive ductal breast carcinoma with predominant intraductal component: Clinicopathological features and prognosis. *The Breast*, 27, 8–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.12.003>
- Sabzichi, M., Hamishehkar, H., Ramezani, F., Sharifi, S., Tabasinezhad, M., Pirouzpanah, M., Ghanbari, P. & Samadi, N. (2014). Luteolin-loaded phytosomes sensitize human breast carcinoma MDA-MB 231 cells to doxorubicin by

- suppressing Nrf2 mediated signalling. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 15(13), 5311–5316.  
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.13.5311>
- Sailaja, A. K., Amareshwar, P. & Chakravarty, P. (2010). Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences Chitosan nanoparticles as a drug delivery system. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 1(3), 474–484.
- Salatin, S., Barar, J., Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Kiafar, F. & Jelvehgari, M. (2017). Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.199041>
- Sánchez-López, E., Egea, M. A., Cano, A., Espina, M., Calpena, A. C., Ettcheto, M., Camins, A., Souto, E. B., Silva, A. M. & García, M. L. (2016). PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen—in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 145, 241–250.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.054>
- Sánchez-López, Elena, Egea, M. A., Davis, B. M., Guo, L., Espina, M., Silva, A. M., Calpena, A. C., Souto, E. M. B., Ravindran, N., Ettcheto, M., Camins, A., García, M. L. & Cordeiro, M. F. (2018). Memantine-Loaded PEGylated Biodegradable Nanoparticles for the Treatment of Glaucoma. *Small*, 14(2), 1701808.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.201701808>
- Sánchez-López, Elena, Ettcheto, M., Egea, M. A., Espina, M., Cano, A., Calpena, A. C., Camins, A., Carmona, N., Silva, A. M., Souto, E. B. & García, M. L. (2018). Memantine loaded PLGA PEGylated nanoparticles for Alzheimer’s disease: in vitro and in vivo characterization. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 32.  
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0356-z>
- Sariego, J., Zrada, S., Byrd, M. & Matsumoto, T. (1995). Breast cancer in young patients. *The American Journal of Surgery*, 170(3), 243–245.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(05\)80007-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9610(05)80007-8)
- Schmidt, T. P., Goetz, C., Huemer, M., Schneider, G. & Wessler, S. (2016). Calcium binding protects E-cadherin from cleavage by Helicobacter pylori HtrA. *Gut Pathogens*, 8, 29. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0112-6>
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S. & Maiti, P. (2018a). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S. & Maiti, P. (2018b). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K. & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
- Shah, A., Bloomquist, E., Tang, S., Fu, W., Bi, Y., Liu, Q., Yu, J., Zhao, P., Palmby, T. R., Goldberg, K. B., Chang, C. J. G., Patel, P., Alebachew, E., Tilley, A., Pierce, W. F., Ibrahim, A., Blumenthal, G. M., Sridhara, R., Beaver, J. A. & Pazdur, R. (2018). FDA Approval: Ribociclib for the Treatment of Postmenopausal Women with Hormone Receptor–Positive, HER2–Negative Advanced or Metastatic Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 24(13), 2999–3004.  
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2369>
- Shah, D. R., Tseng, W. H. & Martinez, S. R. (2012). Treatment Options for Metaplastic Breast Cancer. *ISRN Oncology*, 2012(di), 1–4.  
<https://doi.org/10.5402/2012/706162>
- Shaikh, M. A., Hussain, S., Gilhotra, R., Singh, S. K., Rawat, S., Singh, Y., Satija, S., Mehta, M., Dua, K. & Gupta, G. (2021). *Chapter 1 - Introduction to cancer cell biology* (K. Dua, M. Mehta, T. de Jesus Andreoli Pinto, L. G. Pont, K. A.

- Williams, & M. J. B. T.-A. D. D. S. in the M. of C. Rathbone (ed.); ss. 1–7). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85503-7.00013-4>
- Shaker, D. S., Shaker, M. A. & Hanafy, M. S. (2015). Cellular uptake, cytotoxicity and in-vivo evaluation of Tamoxifen citrate loaded niosomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 493(1), 285–294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.041>
- Shareef, M., Ashraf, M. A. & Sarfraz, M. (2016). Natural cures for breast cancer treatment. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(3), 233–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.018>
- Sharma, A. K., Prasher, P., Aljabali, A. A., Mishra, V., Gandhi, H., Kumar, S., Mutalik, S., Chellappan, D. K., Tambuwala, M. M., Dua, K. & Kapoor, D. N. (2020). Emerging era of “somes”: polymersomes as versatile drug delivery carrier for cancer diagnostics and therapy. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(5), 1171–1190. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00789-2>
- Sharma, N., Madan, P. & Lin, S. (2016). Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 404–416. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.09.004>
- Shenoy, D. B. & Amiji, M. M. (2005). Poly(ethylene oxide)-modified poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 293(1), 261–270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.12.010>
- Shirjang, S., Mansoori, B., Asghari, S., Duijf, P. H. G., Mohammadi, A., Gjerstorff, M. & Baradaran, B. (2019). MicroRNAs in cancer cell death pathways: Apoptosis and necroptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 139, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.017>
- Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(1), 11–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21166>
- Singh, A. K. (2016). *Chapter 1 - Introduction to Nanoparticles and Nanotoxicology* (A. K. B. T.-E. N. Singh (ed.); ss. 1–18). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801406-6.00001-7>
- Singh, Y., Meher, J. G., Raval, K., Khan, F. A., Chaurasia, M., Jain, N. K. & Chourasia, M. K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Soo Choi, H., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J. P., Ity Ipe, B., Bawendi, M. G. & Frangioni, J. V. (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology*, 25(10), 1165–1170. <https://doi.org/10.1038/nbt1340>
- Souto, E. B., Souto, S. B., Campos, J. R., Severino, P., Pashirova, T. N., Zakharova, L. Y., Silva, A. M., Durazzo, A., Lucarini, M., Izzo, A. A. & Santini, A. (2019). Nanoparticle Delivery Systems in the Treatment of Diabetes Complications. *Içinde Molecules* (C. 24, Sayı 23). <https://doi.org/10.3390/molecules24234209>
- Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99(Pt A), 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
- Sun, M., Nie, S., Pan, X., Zhang, R., Fan, Z. & Wang, S. (2014). Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 15–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.032>
- Suri, S., Ruan, G., Winter, J. & Schmidt, C. E. (2013). *Chapter 1.2.19 - Microparticles and Nanoparticles* (B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, & J. E. B. T.-B. S. (Third E. Lemons (ed.); ss. 360–388). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00034-6>

- Sussell, J. A., Roth, J. A., Meyer, C. S., Fung, A. & Hansen, S. A. (2022). Assessment of the Cost-Effectiveness of HER2-Targeted Treatment Pathways in the Neoadjuvant Treatment of High-Risk HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer. *Advances in Therapy*, 39(3), 1375–1392. <https://doi.org/10.1007/s12325-022-02047-y>
- Szczęch, M. & Szczepanowicz, K. (2020). Polymeric Core-Shell Nanoparticles Prepared by Spontaneous Emulsification Solvent Evaporation and Functionalized by the Layer-by-Layer Method. İçinde *Nanomaterials* (C. 10, Sayı 3). <https://doi.org/10.3390/nano10030496>
- Tanaka, T., Decuzzi, P., Cristofanilli, M., Sakamoto, J. H., Tasciotti, E., Robertson, F. M. & Ferrari, M. (2009). Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomedical Microdevices*, 11(1), 49–63. <https://doi.org/10.1007/s10544-008-9209-0>
- Teixeira, R. A. R., Lataliza, A. A. B., Raposo, N. R. B., Costa, L. A. S. & Sant'Ana, A. C. (2018). Insights on the transport of tamoxifen by gold nanoparticles for MCF-7 breast cancer cells based on SERS spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170, 712–717. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.001>
- Torresano, L., Nuevo-Tapióles, C., Santacatterina, F. & Cuezva, J. M. (2020). Metabolic reprogramming and disease progression in cancer patients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165721. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165721>
- Tran, L. A. & Wilson, L. J. (2011). Nanomedicine: making controllable magnetic drug delivery possible for the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(2), 303. <https://doi.org/10.1186/bcr2830>
- Tripathi, Chandra B, Parashar, P., Arya, M., Singh, M., Kanoujia, J., Kaithwas, G. & Saraf, S. A. (2020). Biotin anchored nanostructured lipid carriers for targeted delivery of doxorubicin in management of mammary gland carcinoma through regulation of apoptotic modulator. *Journal of Liposome Research*, 30(1), 21–36. <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1579839>
- Tripathi, Chandra Bhushan, Parashar, P., Arya, M., Singh, M., Kanoujia, J., Kaithwas, G. & Saraf, S. A. (2018). QbD-based development of  $\alpha$ -linolenic acid potentiated nanoemulsion for targeted delivery of doxorubicin in DMBA-induced mammary gland carcinoma: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*, 8(5), 1313–1334. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0525-5>
- Upadhyay, K. K., Bhatt, A. N., Mishra, A. K., Dwarakanath, B. S., Jain, S., Schatz, C., Le Meins, J.-F., Farooque, A., Chandraiah, G., Jain, A. K., Misra, A. & Lecommandoux, S. (2010). The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly( $\gamma$ -benzyl l-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials*, 31(10), 2882–2892. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.043>
- Urbina-Jara, L. K., Rojas-Martinez, A., Martinez-Ledesma, E., Aguilar, D., Villarreal-Garza, C. & Ortiz-Lopez, R. (2019). Landscape of Germline Mutations in DNA Repair Genes for Breast Cancer in Latin America: Opportunities for PARP-Like Inhibitors and Immunotherapy. İçinde *Genes* (C. 10, Sayı 10). <https://doi.org/10.3390/genes10100786>
- Vauthier, C. & Bouchemal, K. (2009). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26(5), 1025–1058. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>
- Vega-Vásquez, P., Mosier, N. S. & Irudayaraj, J. (2020). Nanoscale Drug Delivery Systems: From Medicine to Agriculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00079>
- Verma, M. (2004). Biomarkers for Risk Assessment in Molecular Epidemiology of Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 3(5), 505–514. <https://doi.org/10.1177/153303460400300512>
- Vieira, R., Souto, S. B., Sánchez-López, E., López Machado, A., Severino, P., Jose, S.,

- Santini, A., Fortuna, A., García, M. L., Silva, A. M. & Souto, E. B. (2019). Sugar-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome—Review of Classical and New Compounds: Part-I. İçinde *Pharmaceuticals* (C. 12, Sayı 4). <https://doi.org/10.3390/ph12040152>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185–S198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
- Vinod, B. S., Nair, H. H., Vijayakurup, V., Shabna, A., Shah, S., Krishna, A., Pillai, K. S., Thankachan, S. & Anto, R. J. (2015). Resveratrol chemosensitizes HER-2-overexpressing breast cancer cells to docetaxel chemoresistance by inhibiting docetaxel-mediated activation of HER-2-Akt axis. *Cell Death Discovery*, 1, 15061. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.61>
- Vivek, R., Nipun Babu, V., Thangam, R., Subramanian, K. S. & Kannan, S. (2013). pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 117–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.05.018>
- Vogel, C. L., Johnston, M. A., Capers, C. & Braccia, D. (2014). Toremifene for Breast Cancer: A Review of 20 Years of Data. *Clinical Breast Cancer*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clbc.2013.10.014>
- Vranic, S., Feldman, R. & Gatalica, Z. (2017). Apocrine carcinoma of the breast: A brief update on the molecular features and targetable biomarkers. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 17(1 SE-Reviews), 9–11. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2016.1811>
- Wang, J., Feng, S.-S., Wang, S. & Chen, Z. (2010). Evaluation of cationic nanoparticles of biodegradable copolymers as siRNA delivery system for hepatitis B treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 400(1), 194–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.08.026>
- Wang, Y., Li, P., Truong-Dinh Tran, T., Zhang, J. & Kong, L. (2016). Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. İçinde *Nanomaterials* (C. 6, Sayı 2). <https://doi.org/10.3390/nano6020026>
- Weiner, L. M., Surana, R. & Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 10(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nri2744>
- Wilson, B. K. & Prud'homme, R. K. (2021). Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 604, 208–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.04.081>
- Wu, X., Zheng, Y., Yang, D., Chen, T., Feng, B., Weng, J., Wang, J., Zhang, K. & Zhang, X. (2019). A strategy using mesoporous polymer nanospheres as nanocarriers of Bcl-2 siRNA towards breast cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(3), 477–487. <https://doi.org/10.1039/C8TB02463D>
- Xia, T., Kovoichich, M., Liong, M., Meng, H., Kabehie, S., George, S., Zink, J. I. & Nel, A. E. (2009). Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS Nano*, 3(10), 3273–3286. <https://doi.org/10.1021/nn900918w>
- Xu, R., Wang, J., Xu, J., Song, X., Huang, H., Feng, Y. & Fu, C. (2020). Rhynchophylline Loaded-mPEG-PLGA Nanoparticles Coated with Tween-80 for Preliminary Study in Alzheimer's Disease. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 1149–1160. <https://doi.org/10.2147/IJN.S236922>
- Xu, Y.-Q., Chen, W.-R., Tsosie, J. K., Xie, X., Li, P., Wan, J.-B., He, C.-W. & Chen,

- M.-W. (2016). Niosome Encapsulation of Curcumin: Characterization and Cytotoxic Effect on Ovarian Cancer Cells. *Journal of Nanomaterials*, 2016, 6365295. <https://doi.org/10.1155/2016/6365295>
- Yamasaki, N., Matsuo, A., Hatakeyama, T. & Funatsu, G. (1990). Some properties of ricin d modified with a methoxypolyethylene glycol derivative. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(10), 2635–2640. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870356>
- Yang, B., Song, B.-P., Shankar, S., Guller, A. & Deng, W. (2021). Recent advances in liposome formulations for breast cancer therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 78(13), 5225–5243. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03850-6>
- Yang, C., Xue, Z., Liu, Y., Xiao, J., Chen, J., Zhang, L., Guo, J. & Lin, W. (2018). Delivery of anticancer drug using pH-sensitive micelles from triblock copolymer MPEG-b-PBAE-b-PLA. *Materials Science and Engineering: C*, 84, 254–262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.003>
- Yazdi, M. H., Mahdavi, M., Varastehmoradi, B., Faramarzi, M. A. & Shahverdi, A. R. (2012). The Immunostimulatory Effect of Biogenic Selenium Nanoparticles on the 4T1 Breast Cancer Model: an In Vivo Study. *Biological Trace Element Research*, 149(1), 22–28. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9402-0>
- Yilmaz, O. & Yorgancioglu, A. (2019). Chapter 8 - Nanocoatings: Preparation, Properties, and Biomedical Applications. İçinde C. B. T.-P. N. in N. Vasile (Ed.), *Micro and Nano Technologies* (ss. 299–331). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813932-5.00008-X>
- You, J., Cui, F., Han, X., Wang, Y., Yang, L., Yu, Y. & Li, Q. (2006). Study of the preparation of sustained-release microspheres containing zedoary turmeric oil by the emulsion–solvent-diffusion method and evaluation of the self-emulsification and bioavailability of the oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48(1), 35–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.12.011>
- Yuan, J.-D., ZhuGe, D.-L., Tong, M.-Q., Lin, M.-T., Xu, X.-F., Tang, X., Zhao, Y.-Z. & Xu, H.-L. (2018). pH-sensitive polymeric nanoparticles of mPEG-PLGA-PGLu with hybrid core for simultaneous encapsulation of curcumin and doxorubicin to kill the heterogeneous tumour cells in breast cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 302–313. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1423495>
- Zhang, Chengwei, Zhao, X., Guo, S., Lin, T. & Guo, H. (2017). Highly effective photothermal chemotherapy with pH-responsive polymer-coated drug-loaded melanin-like nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1827–1840. <https://doi.org/10.2147/IJN.S130539>
- Zhang, Chunzhi, Moore, L. M., Li, X., Yung, W. K. A. & Zhang, W. (2013). IDH1/2 mutations target a key hallmark of cancer by deregulating cellular metabolism in glioma. *Neuro-Oncology*, 15(9), 1114–1126. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not087>
- Zhang, J., Sun, H. & Ma, P. X. (2010). Host–Guest Interaction Mediated Polymeric Assemblies: Multifunctional Nanoparticles for Drug and Gene Delivery. *ACS Nano*, 4(2), 1049–1059. <https://doi.org/10.1021/nn901213a>
- Zhang, L., Zhao, Z.-L., Wei, X.-H. & Liu, J.-H. (2013). Preparation and in vitro and in vivo characterization of cyclosporin A-loaded, PEGylated chitosan-modified, lipid-based nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 601–610. <https://doi.org/10.2147/IJN.S39685>
- Zhang, R., Qin, X., Kong, F., Chen, P. & Pan, G. (2019). Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane. *Drug Delivery*, 26(1), 328–342. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1582730>
- Zhang, X.-G., Miao, J., Dai, Y.-Q., Du, Y.-Z., Yuan, H. & Hu, F.-Q. (2008). Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 361(1), 239–244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.06.002>

- Zhao, X., Wu, D., Ma, X., Wang, J., Hou, W. & Zhang, W. (2020). Exosomes as drug carriers for cancer therapy and challenges regarding exosome uptake. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 128, 110237.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110237>
- Zhu, X., Anquillare, E. L. B., Farokhzad, O. C. & Shi, J. (2014). *Chapter 22 - Polymer- and Protein-Based Nanotechnologies for Cancer Theranostics* (X. Chen & S. B. T.-C. T. Wong (ed.); ss. 419–436). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407722-5.00022-0>
- Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A. & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(16).  
<https://doi.org/10.3390/molecules25163731>



## **EKLER**

