

Synthesis a Dynameg Cellog Nanoronnau Poly(lactic-co-glycolic acid) yn Targeddu HER2 ar Gelloedd Canser y Fron

Carwyn Sion Hughes

Traethawd ymchwil a gyflwynwyd ar gyfer gradd
Doethur mewn Athroniaeth

Prifysgol Caerdydd

Medi 2025

Diolchiadau

Yn gyntaf, hoffwn ddiolch i'r Athro Arwyn T. Jones am ei gyngor, ei arweiniad a'i eiriau doeth i sicrhau fy mod yn cael y gorau o'r prosiect a hefyd allan ohonof fy hun. Diolch o galon am yr amynedd a'r gefnogaeth ddiddiwedd y mae wedi'i dangos dros y blynyddoedd.

Hoffwn ddiolch i'm cyd-oruchwyliwr, yr Athro Pete Watson, am ei sylwadau gwerthfawr yn ystod cyfarfodydd, ei gefnogaeth a hefyd ei gyngor. Hoffwn hefyd ddiolch iddo ef a Dr. Anthony Hayes am y data ar gyfer y prosiect hwn a gynhyrchwyd gan ddefnyddio meddalwedd Imaris.

Hoffwn ddiolch i aelodau presennol grŵp labordy Jones-Watson: Nourhan Mohammed, Liyan Chen, James Morewood a Davide Zappalà am eu cyfeillgarwch, eu mewnwelediad a'u cefnogaeth yn ystod y cyfnod ysgrifennu. Yn ogystal, rwy'n ddiolchgar iawn i gyn-aelodau'r grŵp Jones-Watson: Rhodri, Elena, Nicole, Annika, Danielle, Iwan, Saeed, Lyla, Freya, Manon, Fahad ac am eu harweiniad, eu cymorth a'u cefnogaeth yn ystod y prosiect, gyda diolch arbennig i Dr. Edd Sayers am ei hyfforddiant, ei amynedd a'i barodrwydd i'm helpu gydag unrhyw beth wrth ddechrau'r PhD.

Hoffwn ddiolch i'r Athro Andy Westwell a Dr. Sam Jones am eu cefnogaeth, y sgysiau bach hwyliog yn y coridor ac am fod digon parod i adael i mi holi am gyngor. Ar wahân i'r bobl hyn, rwy'n ddiolchgar iawn i bawb yn yr Ysgol Fferylliaeth am ei gwneud yn amgylchedd mor gynnes a chroesawgar i weithio ynddo a bod yn rhan ohono dros y 4 blynedd diwethaf.

Y tu allan i'r Ysgol, hoffwn ddiolch i Dr. Duncan Muir am ei gymorth a'i hyfforddiant o ran perfformio'r delweddu SEM ac i Ganolfan Ganser Felindre am roi'r Trastuzumab a ddefnyddiwyd yn y gwaith hwn. Rwy'n hynod ddiolchgar i'r Coleg Cymraeg Cenedlaethol am arianu'r gwaith, ni fyddai dim o hyn wedi bod yn bosibl heb eu cefnogaeth.

Hoffwn ddiolch yn arbennig i Alex Cusmano, Hannah Baird, Matt Colborne, Julia Spagnolello, Cait Bellamy, Alma Truys, Jared Whitehead a Sebastiano Rizzo y mae'n frain i mi fwynhau eu cyfeillgarwch ac rwy'n ddiolchgar iawn amdano. Mae eu cefnogaeth, eu cynhesrwydd a'u hiwmor wedi bod yn fendith llwyr.

Yn olaf, hoffwn ddiolch i'm teulu am eu cefnogaeth ac am wrando arnaf yn mwydro nhw am fy ngwaith. Rwyf hefyd yn ddiolchgar i'm chwaer Lows am yrru'r holl lluniau o Ned y ci.

Cynnwys

Diolchiadau	2
Allbynnau Ymchwil.....	7
Rhestr o Ffigyrau	8
Rhestr o Tablau	16
Crynodeb	17
Talfyriadau.....	19
1 Cyflwyniad	22
1.1 Canser	22
1.1.1 Difrod DNA	24
1.2 Canser y fron	26
1.2.1 Is-deipiau Canser y Fron	27
1.2.2 Graddio canser	29
1.3 Teulu HER2	31
1.3.1 HER2.....	33
1.3.2 Strwythur HER2.....	34
1.4 Triniaethau ar gyfer Canser y Fron HER2+	36
1.4.1 Cemotherapi.....	36
1.4.2 Doxorubicin	37
1.4.3 Atalyddion Moleciwl Bach	38
1.5 Gwrthgyrff	39
1.5.1 Trastuzumab / Herceptin.....	40
1.5.2 Cyfuniad Cyffur a Gwrthgorff (CCG) -Tz	41
1.5.3 Kadcylla	42
1.5.4 Enhertu	43
1.5.5 Disitamab Vedotin.....	45
1.6 Nanogronynnau a Nanofeddyginiaethau	46
1.6.1 Deunydd NGau	47
1.6.2 Targeddu â NGau.....	48
1.6.3 Targeddu Goddefol	49
1.6.4 Targeddu Actif	50

1.6.5	Cargo NGau	51
1.6.6	Nanogronnynnau mewn triniaeth canser y fron.....	52
1.7	Endocytosis.....	56
1.7.1	Llwybrau Endocytig	57
1.7.2	Endocytosis Clathrin-ddibynol	58
1.7.3	Endocytosis Annibynnol o Clathrin	59
1.8	Endocytosis NGau.....	60
1.8.1	Endocytosis HER2	62
1.8.2	Clystyru Derbynnnydd	64
1.9	Nôd ac Amcanion.....	66
1.10	Ffynonellau.....	68
2	Dull a Deunyddiau	85
2.1	Dulliau Cyffredinol	85
2.1.1	Llinellau Cell.....	85
2.1.2	Meithriniad Celloedd Rheolaidd	86
2.1.3	Storio a dadmer celloedd.....	86
2.1.4	Microsgop Leica SP5.....	87
2.2	Proffilio Endocytig	88
2.2.1	Fflwroleuedd Imiwno	88
2.2.2	Mynegiant HER2 a HER3 mewn llinellau cell	90
2.2.3	Puro Tz.....	91
2.2.4	Asesu'r Tz488	92
2.3	Astudio Rhwymo a Mewnoliad PLGA-Tz.....	93
2.3.1	Cynhyrchu Nanogronnynnau.....	93
2.3.2	Nodweddu'r Nanogronnynnau	94
2.3.3	Arbrofion clymu HER2.....	94
2.3.4	Endocytosis a cydleoli Dextran	95
2.3.5	Blotio Western	96
2.4	Dadansoddi Effaith Valens Nanogronnynnau ar y Bilen Blasma	100
2.4.1	Addasu falensau'r NGau i Tz.....	100
2.4.2	Delweddu actin â SiR Actin	102
2.4.3	Defnyddio Tz488 a NGau-Tz-488 i ddelweddu'r bilen blasma.....	102

2.4.4	Dadansoddi Crychu ar Gelloedd.....	103
2.4.5	Delweddu Crychau gyda Microsgob Electron Sganio (MES)	105
2.4.6	Hyfywdra Celloedd	105
2.5	Ffynonellau.....	107
3	Cynhyrchu Proffiliau Endocytig o Ein Modelau Cell	108
3.1	Cynhyrchu Tz-Alexa488.....	122
3.2	Trafodaeth	124
3.3	Ffynonellau.....	127
4	Astudio Rhwymo a Mewnoliad PLGA-Tz.....	128
4.1	Cymeriadaeth Ffisegol a Biolegol o NGau PLGA.....	128
4.2	Archwiliad in vitro o'r NGau	134
4.3	Astudiaethau Mewnoliaeth Cyntaf.....	137
4.4	Mewnoliaeth wedi 5 awr	138
4.5	Mewnoliaeth wedi 24 awr.....	141
4.6	Ailedrych ar gydleoliad NGau gyda Dextran647.....	146
4.7	Edrych ar cydleoliad Dextran488 a Dextran647	148
4.8	Mesur y Cydleoliad	150
4.9	Effaith y NGau ar fynegiant HER2.....	156
4.10	Mynegiant y Derbynnydd Transferrin	160
4.11	Trafodaeth	167
4.12	Ffynhonellau.....	179
5	Dadansoddi Effaith Valens Nanoronynnau ar Bilen Blasma	182
5.1	Addasu falens Tz ar y NGau	182
5.2	Arbrofion gyda'r staen actin byw SiR-Actin i ceisio mesur effaith ein NGau ar y bilen blasma	184
5.3	Delweddu'r bilen blasma gyda Tz488	194
5.4	Delweddu cydffocal o effaith y NGau ar y Bilen Blasma	196
5.5	Mesur effaith y crychio mewn 2D	205
5.6	Delweddu Celloedd mewn 3D	212
5.7	Prosesu Pellach	222
5.8	Defnyddio Microsgopeg Electron Sganio (MES) i archwilio strwythur yr crychau dros y bilen blasma.....	225

5.9	Effaith y NGau ar mynegiant HER2 mewn celloedd SKBR3.....	228
5.10	Effaith falens PLGA-Dox-Tz ar hyfywdra celloedd	229
5.11	Trafodaeth	236
5.12	Ffynonellau.....	245
6	Trafodaeth Gyffredinol.....	247
6.1	Ffynonellau.....	254
7	Atodiadau	257

Allbynnau Ymchwil

Mae gwaith a gynhyrchwyd o'r prosiect hwn wedi'i gyflwyno yn y cynadleddau canlynol:

- Cardiff Cancer Research Symposium 2023
- Cenhadled Wyddonol y Coleg Cymraeg Cenedlaethol 2023
- European Symposium on Controlled Drug Delivery (ESCDD) 2024
- United Kingdom and Ireland Controlled Release Society (UKICRS) Research Symposium 2024
- United Kingdom and Ireland Controlled Release Society (UKICRS) Online Symposium 2024
- International Nanomedicine and Drug Delivery Symposium (NanoDDS) 2024

Mae gwaith a gynhyrchwyd o'r prosiect hwn wedi'i cyhoeddi yn y papurau canlynol:

- Hughes CS, Tayeb S, Muir D, Hayes A, Watson P, Jones AT. Rapid Plasma Membrane Reorganisation and Endocytosis in HER2 Breast Cancer Cells Incubated with Trastuzumab Decorated Polymer Nanoparticles. RSC Pharmaceuticals. PM-ART-06-2025 000168 [Wedi dderbyn, o dan adolygiad 28/9/25]

Rhestr o Ffigyrau

Ffigur 1-1: Mae niwed i'r DNA gallu arwain tuag at gell afreolus a all datblygu i cancer os yw systemau eraill yn methu i delio a'r gell wreiddiol.....	22
Ffigur 1-2: Mae niwed i'r DNA gallu tarddu o sawl ffynonellau wahanol. Yn dibynnu ar y tarddle mae'r math o niwed sy'n cael ei wneud yn gwahaniaethu.....	25
Ffigur 1-3: Sgematig o sut mae cancer yn lledaenu yn y corff a sut mae on'n cael ei raddio o ganlyniad.....	30
Ffigur 1-4: Mae partneriaeth HER2 yn pennu natur y signalau sy'n deillio o'r parth kinase	32
Ffigur 1-5: Mae yna sawl triniaethau gwahanol sy'n targedu HER2 yn penodol. Mae trastuzumab a triniaethau sy'n seiledig arno'n rhwymo i parth IV y derbynydd tra bod pertuzumab yn rhwymo i parth II. Yn mewngellol mae lapatinib yn targedu'r parth cinas.	41
Ffigur 1-6: Yr wahaniaeth rhwng yr effaith cytotoxicig mae Enhertu a Kadcylla yn cael. Mae hyn o ganlyniad i'r wahaniaeth mewn athreiddedd y cyffuriau atodedig.....	44
Ffigur 1-7: : Strwythur Disitamab Vedotin a sut mae o'n gwahaniaethu o Kadcylla	45
Ffigur 1-8: Esiampl o sut mae amgylchedd lleol cancer yn effeithio ar y system gylchredol a sut mae hyn yn gallu caniatu i nanoronynnau ymledu i'r meinwe sy'n amgylchynu'r pibell waed	49
Ffigur 1-9: Mae sawl llwybr wahanol o fewnoli cargo. Yn tecst glas mae rhai o'r proteinau sy'n ymwneud a'r strwythurau penodol. Mae EEA1 (Early Endosome antigen 1) a Rab5 (Rabankyrin 5) er enghraifft wedi cyfoethogi ar bilen yr endosomau cynnar. Fel mae rhain yn aeddfedu i droi'n endosomau hwyr a wedyn lysosomau gwelir newid mewn protein ar draws y fesigl i weld cyfoethogiad o Rab7 (Rabankyrin7) a wedyn LAMP II (Lysosomal associated membrane protein II) i adlewyrchu'r newid mewn pwrpas y fesigl a sut mae angen wahanol proteinau i cwblhau hyn. Osy w fesiglau yn cael eu dosbarthu i'r Golgi maent yn uno gyda'r cis-Golgi, sydd wedi cyfoethi gyda GM130, tra bod fesiglau sy'n gadael yr Golgi o'r trans-Golgi sy'n gyfoethog mewn TGN46 (Trans-Golgi Network 46). I rhai fesiglau ar y llaw arall maent yn cael eu ailgylchu o'r endosomau cynnar gyda'r myengiant o Rab4 neu Rab11 yn dynodi os yw'r fesiglau yn cael eu ailgylchu'n sydyn neu yn araf. Drwy'r defnydd o technegau immiwnoffloroleuedd mae'n bosib cymeryd mantais o cyfoethogiad o'r proteinau hyn i amlygu'r strwythurau wahanol tu mewn i'r gell.....	57
Ffigur 1-10: Mae croesgysylltu HER2 yn arwain at y derbynnydd cael ei fewnoli i'r lysosomau.....	65
Ffigur 1-11: Rydym yn damcaniaethu y gallwn ddefnyddio PLGA-Dox-TZ NGau NGau i groesgysylltu'r derbynnydd HER2 ar yr wyneb a thrwy hynny ysgogi mewnoliad y cymhleth NGau -HER2 a masnachu mewn pobl ymhellach i'r lysosomau. Unwaith y byddant yn y lysosomau bydd y NGau NGau yn diraddio gan ryddhau'r doxorubicin i a fydd wedyn yn lladd y gell	67

Ffigur 2-1: Crynodeb o'r wahanol ddulliau a defnyddiwyd ar gyfer immwnoffloroleuedd a sut maent yn gwahaniaethu o'i gilydd.....	88
Ffigur 2-2: Crynodeb o sut cafodd ein NGau eu cynhyrchu. I ddechrau, roedd y toddiant aseton yn cael ei ychwanegu â llaw, ond er mwyn gwella cysondeb gwnaed hyn wedyn trwy ddisgyrchiant. Ar gyfer NGau RhB (Rhodamine B) ychwanegwyd 1mg o powdr RhB ymlaen llaw, ar gyfer NGau Dox 100µl o hydoddiant 10mg/ml (1). Ar ôl ychwanegu'r hydoddiant aseton gadawyd y fflasg i droi dros nos, y bore wedyn cafodd cynnwys y fflasg ei allgyrchu (14,000g, 10 munud) a'i olchi drosodd a drosodd (2). Er mwyn paratoi yr NGau am addurniad gyda Tz cafodd nhw ei sonicadu am 60 eiliad (30 eiliad dwywaith gyda seibiant 10 eiliad yn y canol) ar pŵer o 300W yn defnyddio Soniprep 150 (3). Yna gwnaethom hydoddi 5.7mg NHS, 19.2mg o EDC mewn fflasg oedd yn cynnwys 2ml o ddŵr a troellwr. Cadwyd y fflasg ar rew a'i fflysio'n barhaus â nitrogen. Yna ychwanegwyd yr NGau ochr yn ochr gyda 38µM Tz488 a chaniatawyd i'r adwaith cymysgu ar rhew am 3 awr mewn tywyllwch (4). Yn dilyn hyn cafodd cynnwys y flasg ei gasglu a'i allgyrchu a'i olchi fel ddisgrifir uchod (5). Cyn eu defnyddio wedyn cafodd nhw eu sonicadu fel disgrifir uchod (6).....	93
Ffigur 2-3: Sgematig o sut mae'r frechdan drosglwyddo'n cael ei gydosod o sawl haen wahanol	98
Ffigur 2-4: Esiampl o'r allddarllenid sydd yn cael ei cynhyrchu gyda Nanosight LM10. Yn yr achos yma cafodd 35.78×10^8 o NGau eu cyfri mewn hydoddiant oedd wedi ei wanedu 200x.....	101
Ffigur 3-1: Dosbarthiad actin (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron, gwelir fod o wedi crynodi ar y bilen fel dangosir gan y saethau melyn. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm	109
Ffigur 3-2: Dosbarthiad tiwbwlin (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron gyda'r saethau yn dangos esiamplau o tiwbwlin wedi crynodi ar bilen y celloedd. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm.....	110
Ffigur 3-3: Dosbarthiad EEA1/endosomau cynnar (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron, gelir endomsoau cynnar unigol wedi dynodi gan y saethau. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm	112
Ffigur 3-4: Ymdrechion gyda gwahanol osodyddion i optimeiddio staenio gyda gwrthgorff Rab7 / endosomau hwyr mewn celloedd SKBR3. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Bar raddfa 20µm.....	113
Ffigur 3-5: Dosbarthiad o'r lysosomau (gwyn) wedi'u staenio gyda LAMP II ar draws y modelau celloedd y fron, gwelir lysosomau penodol wedi'u dynodi gan saethau. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm	115

Ffigur 3-6: Dosbarthiad o'r lysosomau (gwyn) wedi'u staenio gyda LAMP III ar draws modelau celloedd y fron. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm	116
Ffigur 3-7: Dosbarthiad o'r Golgi-trans (gwyn), wedi staenio gyda gwrthgorff TGN46 ar draws modelau celloedd y fron. Lle posib dynodi'r gyda saethau. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm	117
Ffigur 3-8: Dosbarthiad o'r Golgi-cis (gwyn), wedi staenio gyda gwrthgorff G130 ar draws modelau celloedd y fron. Dynodir y Golgi gan saethau. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm	118
Ffigur 3-9: Dosbarthiad HER2 (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron. Dynodir y saethau HER2 wedi crynodi ar y gell bilen. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm ...	119
Ffigur 3-10: Dosbarthiad HER3 (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron, dangosir crynodiad ohono ar y gell bilen fel dangosir gan y saethau. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Bar raddfa 20µm	120
Ffigur 3-11: Mynegiant HER2 a HER3, BT474, SKBR3 ag MCF7 i gymharu gyda modelau canser y fron eraill. Cynhyrchir y graff gan defnyddio'r gwybodaeth cyhoeddus sydd ar gael gan DepMap. Doedd dim data ar gael ar gyfer y celloedd Clone5.	121
Ffigur 3-12: Celloedd MCF7 HER2- (Top) a SKBR3 HER2+ (Gwaelod) ar ôl cael eu trin gyda Tz488 (gwyn) am awr. Gwelir crynodiad of HER2 llawer uwch ar draws bilen y celloedd SKBR3. Bar raddfa 20µm	123
Ffigur 3-13: Celloedd Clone5 wedi'u trin gyda Tz488 (gwyn) am 1 awr. Gwelir fod y HER2 wedi crynodi ar draws y bilen plasma Bar raddfa 20µm	123
Ffigur 4-1: Gwahaniaeth mewn PDI ar ol addasu'r dull i cynhyrchu NGau. Mae pob dot yn cynrychioli mesuriad unigol a wneir trwy wasgariad golau deinamig. Mesurwyd pob fformiwleiddiad mewn drifflyg ($N \geq 6$).....	130
Ffigur 4-2: Dosbarthiad maint y gwahanol fformiwleiddiadau NGau a ddefnyddiwyd yn y traethawd ymchwil hwn. Mae pob pwynt ar y graff yn cynrychioli mesuriad unigol a wneir trwy wasgariad golau deinamig. $N \geq 3$	132
Ffigur 4-3: Celloedd wedi'u trin â 100µg/ml PLGA-RhB-Tz am 5 awr. Dangosir tafluniad mwyaf. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos NGau. Bar graddfa 20µm.....	135
Ffigur 4-4: Celloedd wedi'u trin â 500µg/ml PLGA-RhB-Tz am 5 awr. Dangosir tafluniad mwyaf. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos NGau. Bar graddfa 20µm.....	136
Ffigur 4-5: Celloedd BT474 a Clone5 wedi'u trin â 50µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 5 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm	139

Ffigur 4-6: Celloedd BT474 a Clone5 wedi'u trin â 20nM Transferrin647 cyn eu golchi a'u trin am 5 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar graddfa 20µm	140
Ffigur 4-7: Celloedd wedi'u trin â 50µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos NGau. Bar graddfa 20µm.....	141
Ffigur 4-8: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 75µg/ml Dextran488. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-2. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos cydleoli.....	143
Ffigur 4-9: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn tabl 4-3. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos cydleoliad.	145
Ffigur 4-10: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-3. Dangosir haen sengl gyda'r ardal sydd wedi chwyddo'n cael ei dynodi gan sgwâr gwyn, saethau yn dangos cydleoliad. Bar graddfa 20µm	147
Ffigur 4-11: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 75µg/ml Dextran488. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-5. Dangosir haen sengl gyda'r ardal sydd wedi chwyddo'n cael ei dynodi gan sgwâr gwyn, saethau yn dangos cydleoli. Bar graddfa 20µm.....	149
Ffigur 4-12: Esiamlau o fflwogramau sy'n dangos trothwyo llwyddiannus (dde) ac un aflwyddiannus (chwith) lle mae llawer fwy o'r cefndir yn cael ei cynnwys.	150
Ffigur 4-13 : Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 75µg/ml Dextran488. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-6. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos cydleoliad. Bar graddfa 20µm	152
Ffigur 4-14: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-7. Dangosir haen sengl gyda'r ardal sydd wedi chwyddo'n cael ei dynodi gan sgwâr gwyn, saethau yn dangos cydleoliad. Bar graddfa 20µm	154
Ffigur 4-15: Effaith wahanol triniaethau ar mynegiant HER2 ar ol 7 awr yn celloedd SKBR3. 1: Rheolydd, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz, 5: 500µg/ml PLGA-Tz-Dox. Defnyddir Tubulin fel rheolydd llwytho er mwyn gallu cymharu'r effaith ar mynegiant ar rhwng triniaethau.	157
Ffigur 4-16: Ymchwiliad i weld a oedd yn bosibl i wrthgorff oroesi'r broses o baratoi lysat. Cafodd celloedd SKBR3 eu trin â'r gwrthgorff cynradd cyn lysis ac yna eu trin â'r gwrthgorff eilaidd yn unig ar gyfer blotio.	159

Ffigur 4-17: Gall ein NGau achosi gostyngiad mewn mynegiant HER2 o fewn celloedd SKBR3. N=3. 1: Rheolydd, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz. Graff yn dangos yr cyfartaledd gyda'r bariau cyfeiliornad yn dynodi'r gwyriad safonol	159
Ffigur 4-18: Tri dyblygiad annibynnol yn archwilio effaith ein NGau ar fynegiant HER2 mewn celloedd BT474 ochr yn ochr â'r densitometreg berthnasol a'r cyfartaledd wedi'i normaleiddio dros pob un ohonynt. Defnyddir Tubulin fel y rheolydd llwytho a'r derbynydd transferrin (TfR) fel marciwr i cadarnhau os oedd unrhyw effaith yn penodol i HER2 neu beidio. 1: Rheolydd, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz..	160
Ffigur 4-19: Tri dyblygiad annibynnol yn archwilio effaith ein NGau ar fynegiant HER2 mewn celloedd Clone5 ochr yn ochr â'r densitometreg berthnasol a'r cyfartaledd wedi'i normaleiddio dros pob un ohonynt. Defnyddir Tubulin fel y rheolydd llwytho a'r derbynydd transferrin (TfR) fel marciwr i cadarnhau os oedd unrhyw effaith yn penodol i HER2 neu beidio. 1: Rheolydd, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz..	163
Ffigur 4-20: Tri dyblygiad annibynnol yn archwilio effaith ein NGau ar fynegiant HER2 mewn celloedd SKBR3 ochr yn ochr â'r densitometreg berthnasol a'r cyfartaledd wedi'i normaleiddio dros pob un ohonynt. Defnyddir Tubulin fel y rheolydd llwytho a'r derbynydd transferrin (TfR) fel marciwr i cadarnhau os oedd unrhyw effaith yn penodol i HER2 neu beidio. 1: Control, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz	165
Ffigur 4-21: Tri dyblygiad annibynnol yn archwilio effaith ein NGau ar fynegiant HER2 mewn celloedd MCF7 ochr yn ochr â'r densitometreg berthnasol a'r cyfartaledd wedi'i normaleiddio dros pob un ohonynt. Defnyddir Tubulin fel y rheolydd llwytho a'r derbynydd transferrin (TfR) fel marciwr i cadarnhau os oedd unrhyw effaith yn penodol i HER2 neu beidio. 1: Control, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz	166
Ffigur 5-1: Celloedd SKBR3 di-serwm wedi cael eu staenio gyda 250µM SiR Actin ac wedyn ysgogi gyda 50nM EGF wrth ochr celloedd o grŵp rheolydd. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	185
Ffigur 5-2: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500 µg/ml NGau PLGA am 24 awr cyn staenio gyda 250 µM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	186
Ffigur 5-5: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-50Tz am 24 awr cyn staenio gyda 250µM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	188
Ffigur 5-6: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	189
Ffigur 5-7: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-10Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	189
Ffigur 5-10: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	191

Ffigur 5-12: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-30Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	192
Ffigur 5-11: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-10Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	192
Ffigur 5-13: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-50Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm	193
Ffigur 5-14 Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau am 10 munud cyn gosodi â PFA ag eu trin gyda 50nM Tz488 cyn delweddu. Bar Raddfa 20µm	195
Ffigur 5-15: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros y 10 munud. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo yn gwyn, saethau yn dynodi crychau. Bar Raddfa 20µm	197
Ffigur 5-16: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/mlNGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Hefyd dangosir cod lliwiau amserol sy'n dangos yn pa bryd mae'r actifedd yn digwydd yn ystod y 10 munud gyda'r lliwiau yn cyfateb a faint hir i fewn i'r recordiad mae'r actifedd yn digwydd. Bar Raddfa 20µm, saethau yn dangos esiamplau o crychau.....	198
Ffigur 5-17: Celloedd MCF7 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros y 10 munud. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo yn gwyn, saethau yn dynodi crychau. Bar Raddfa 20µm	199
Ffigur 5-18: Celloedd MCF7 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Hefyd dangosir cod lliwiau amserol sy'n dangos yn pa bryd mae'r actifedd yn digwydd yn ystod y 10 munud gyda'r lliwiau yn cyfateb a faint hir i fewn i'r recordiad mae'r actifedd yn digwydd. Bar Raddfa 20µm	200
Ffigur 5-19: Celloedd Clone5 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros y 10 munud. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo yn gwyn, saethau yn dynodi crychau. Bar Raddfa 20µm	201
Ffigur 5-20: Celloedd Clone5 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Hefyd dangosir cod lliwiau amserol sy'n dangos yn pa bryd mae'r actifedd yn digwydd yn ystod y 10 munud gyda'r lliwiau yn cyfateb a faint hir i fewn i'r recordiad mae'r actifedd yn digwydd. Bar Raddfa 20µm	202
Ffigur 5-21: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros y 10 munud. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo yn gwyn, saethau yn dynodi crychau. Bar Raddfa 20µm	203
Ffigur 5-22: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Hefyd dangosir cod lliwiau amserol sy'n dangos yn pa bryd mae'r actifedd yn digwydd yn	

ystod y 10 munud gyda'r lliwiau yn cyfateb a faint hir i fewn i'r recordiad mae'r actifedd yn digwydd. Bar Raddfa 20µm. saethau yn dangos esiamplau o crychau.....	204
Ffigur 5-23: Newid mewn arwynebedd y rheolydd BT474 yn ystod yr 10 munud (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).	206
Ffigur 5-24: Newid mewn arwynebedd y celloedd BT474 wedi trin â 500µg/ml NGau PLGA yn ystod yr 10 munud cyntaf ar ôl triniaeth (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).....	206
Ffigur 5-25: Newid mewn arwynebedd y celloedd BT474 wedi trin â 500µg/ml NGau PLGA-10Tz yn ystod yr 10 munud cyntaf ar ôl triniaeth (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).	207
Ffigur 5-26: Newid mewn arwynebedd y celloedd BT474 wedi trin â 500µg/ml NGau PLGA-30Tz yn ystod yr 10 munud cyntaf ar ôl triniaeth (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).	208
Ffigur 5-27: Newid mewn arwynebedd y celloedd BT474 wedi trin â 500µg/ml NGau PLGA-50Tz yn ystod yr 10 munud cyntaf ar ôl triniaeth (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).	208
Ffigur 5-28: Effaith yr wahanol driniaethau ar arwynebedd y celloedd BT474 a sut mae o'n newid yn ystod yr 10 munud.	210
Ffigur 5-29: Dangosir yr wahanol cryfder o crychio a mesurwyd mewn 3 ardal penodol o celloedd oedd wedi trin â PLGA-30Tz. Dynodir yr ardael lle cafodd y crychu ei fesur ynddo drwy defnyddio bocs melyn.	211
Ffigur 5-30: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml nanoronynnau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Saethau yn dangos crychu.	215
Ffigur 5-31: Celloedd Clone5 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Saethau yn dangos crychu.....	217
Ffigur 5-32: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Saethau yn dangos crychu.....	218
Ffigur 5-33: Celloedd MCF7 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Saethau yn dangos crychu.....	220
Ffigur 5-34: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud.	223
Ffigur 5-35: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-30Tza'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Dynodir yr ardal wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 10µm	224

Ffigur 5-36: Cell SKBR3 ar ôl y broses dadhydradu gwreiddiol. Gwelir diffyg manylder ar draws wyneb y gell. Bar Raddfa 1µm.....	225
Ffigur 5-37: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau am 10 neu 30 munud cyn eu gosodi a delweddu gyda SEM. Bar Raddfa 1µm.....	227
Ffigur 5-38: Celloedd MCF7 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau am 10 munud cyn eu gosodi a delweddu gyda SEM. Bar Raddfa 1µm.....	227
Ffigur 5-39: Mynegiant HER2 mewn celloedd SKBR3 ar ôl cael eu trin gyda crynodiadau gwahanol o NGau am 24 awr. Defnyddir Tiwbiwlin (Tub) fel yr rheolydd llwytho i ganiatau i ni allu normaleiddio'r mynegiant HER2 er mwyn i'w gymharu ar draws y crynodiadau wahanol	228
Ffigur 5-40: Hyfywdra modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol driniaethau am 24 awr. Dangosir yr ailadroddiad cyntaf. Dox = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Tz-Dox-50), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100	230
Ffigur 5-41: Hyfywdra modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol driniaethau am 24 awr. Dangosir yr ail ailadroddiad. Dox = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Tz-Dox-50), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100.....	230
Ffigur 5-42: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 10µM Dox rhydd neu'r gywerth o NGau PLGA-Dox am 24 awr. Bar raddfa 20µm.....	231
Ffigur 5-43: Hyfywdra ein modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol triniaethau am 48 awr. Dangosir yr ailadroddiad cyntaf. Rhe = Rheolydd, 0 = NGau PLGA-Dox, 10 = PLGA-Dox-10Tz, 30 = PLGA-Dox-30Tz, 50 = PLGA-Dox-50Tz, P = NGau PLGA, Ptz = NGau PLGA-Tz, Dx = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Dox-50Tz), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100.....	232
Ffigur 5-44: Hyfywdra ein modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol triniaethau am 48 awr. Dangosir yr ail ailadroddiad. Rhe = Rheolydd, 0 = NGau PLGA-Dox, 10 = PLGA-Dox-10Tz, 30 = PLGA-Dox-30Tz, 50 = PLGA-Dox-50Tz, P = NGau PLGA, Ptz = NGau PLGA-Tz, Dx = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Dox-50Tz), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100.....	233
Ffigur 5-45: Hyfywdra ein modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol triniaethau am 72 awr. Dangosir y canlyniadau am 3 ailadroddiad wedi normaleiddio. Dynodir y bariau cyfeiliornad safonol o'r cymedr. Mae'r sêr yn arwyddocâd o wahaniaeth arwyddocaol i'r rheolydd. Dox = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Dox-50Tz), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100.....	235

Rhestr o Tablau

<i>Tabl 1-1: Dadansoddiad o'r gwahanol isdeipiau canser y fron a sut maent yn wahanol i'w gilydd. ER = Derbynnydd estrogen. PR = Derbynnydd Progesteron. + yn dynodi gorfynegiant o'r derbynnydd, - yn dynodi dim gorfynegiant yn bresennol</i>	<i>27</i>
<i>Tabl 1-2: Crynodeb o rhai o'r ymdrechion sy'n defnyddio NGau i targedu canser HER2+</i>	<i>63</i>
<i>Tabl 2-1: Crynodeb o'r wahanol llinelloedd cell cafodd ei ddefnyddio yn y traethawd hwn</i>	<i>85</i>
<i>Tabl 2-2: Rhestr, a manylion, o'r gwrthgyrff a'r staeniau a defnyddiwyd wrth ochr y crynodiadau a defnyddiwyd</i>	<i>90</i>
<i>Tabl 2-3: Fformiwlau'r wahanol byfferau a chafodd eu ddefnyddio ar gyfer blottio</i>	<i>98</i>
<i>Tabl 4-1 Dosbarthiad maint, potensial zeta a PDI y gwahanol fformwleiddiadau NGau a ddefnyddiwyd yn y traethawd ymchwil hwn. $N \geq 3$ i bob grwp.....</i>	<i>132</i>
<i>Tabl 4-2: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-8.....</i>	<i>143</i>
<i>Tabl 4-3: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-9.....</i>	<i>145</i>
<i>Tabl 4-4: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-10 a 2 ardal delweddu arall o'r un arbrawf</i>	<i>147</i>
<i>Tabl 4-5: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-11</i>	<i>149</i>
<i>Tabl 4-6: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-13 ag un ardal arall a delweddir yn yr un arbrawf</i>	<i>152</i>
<i>Tabl 4-7: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-14 ag un ardal arall a delweddir yn yr un arbrawf</i>	<i>154</i>
<i>Tabl 4-8: Cyfernodau Cydleoli o Tabl 4-7 wedi normaleiddio'n defnyddio'r gwethoedd yn Tabl 4-6 er mwyn gallu cymharu'n fwy dêg rhwng y modelau celloedd</i>	<i>155</i>

Crynodeb

Mae'r ganrif hon yn dyst i ddatblygiadau arwyddocal mewn dealltwriaeth o ganser y fron a thriniaethau newydd sydd yn fwy effeithiol. Er hyn mae'r cyflwr, yn fydol, yn cynrychioli'r cancer fwyaf cyffredin ac yn flynyddol yn achosi >500,000 o farwolaethau . Mae gwir angen triniaethau newydd a rhai sydd yn benodol dargedu celloedd cancer y fron. I geisio ateb y galw yma mae ymchwil yn datblygu nanoronynnau (NGau) sy'n targedu celloedd cancer y fron ac yn gydredol gludo amrywiaeth o gyffuriau. Yn anffodus dyw trawsfudiad NGau o'r labordy i'r clinig ddim yn effeithiol ac mae galw am ddealltwriaeth dyfnach o gydberthynas NGau a'r celloedd, o'r cyffyrddiad cyntaf i'r effaith olaf.

Yn y traethawd hwn datblygwyd NGau polymeraidd Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), wedi ei addurno â Trastuzumab (PLGA-Tz) . Dangosodd astudiaethau microsgopeg cydffocal fod y PLGA-Tz yn benodol glymu i linellau cell cancer y fron Her2+ ac yn mewtleoli cyn teithio i'r lysosomau. Dangosodd arbrofion pellach fod modd crynhoi y cuffur doxorubicin yn y NGau oedd wedi ei fewnleoli yn benodol i gelloedd HER2+. Profodd arbrofion hyfywedd fod effaith y doxorubicin ar y celloedd hefyd yn ddibynol ar fynegiant HER2 a'r nifer o wrthgyrff oedd ynghlwm i bob gronyn. Drwy ddefnyddio microsgopeg sganio electron cafodd y ddamcaniaeth fod PLGA-Tz yn croeslynnu HER2 ac ysgogi macropinosytosis ei brofi'n gywir. O fewn 10 munud o gyflwyno y PLGA-Tz i'r celloedd roedd crychu sylweddol ar wyneb y gell . I astudio crychu mewn celloedd byw datblygwyd techeneg delweddu cydffocal-3D. Yn sgil y gwaith gellir rhagdybio fod astudiaethau cynnar o gydberthynas NGau a chelloedd roi dealltwriaeth pwysig o ddigwyddiadau angenrheidiol i alluogi iddynt gael mynediad a hefyd roi gwybodaeth ar

sut i greu NGau mwy effeithiol yn erbyn canser y fron HER2 a mathau eraill o ganser sydd â derbynnyr i'w targedu ar y bilen blasma.

Talfyriadau

ACT	Atalyddion Cinas Tyrosin
ARF6	<i>ADP-Ribosylation Factor 6</i>
ATP	Adenosine Triphosphate
	<i>Biolmaging and Optics Platform: Just Another Colocalization</i>
BIOP JACoP	<i>Plugin</i>
BRCA	<i>Breast Cancer susceptibiity protein</i>
BSA	Albwmin Serwm Buchol / <i>Bovine Serum Albumin</i>
Cav	Cafeolin
CCG	Cyfuniad Cyffur a Gwrthgorff
CCGGD	Cytotocsigedd Cell-Gyfryngol Gwrthgorff-Ddibynnol
COOH	Grŵp Carboxyl
CTB	CellTiter Blue
DCT	Derbynydd Cinas Tyrosin
DEF	Drawsnewidiad Epithelial Fesenchymal
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DU	Deyrnas Unedig
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMA	Asiantaeth Medyginaehta Ewropeaidd
EPR	Enhanced Permeation and Retention
ER	Derbynnnydd Estrogen
ErbB	Erythroblastic oncogene B
FBS	<i>Foetal Bovine Syndrome</i>
FC	<i>Fragment Crystallizable</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
GM130	<i>Golgi Matrix Protein 130</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HMDS	Hexamethyldisilazane
HPMA	N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide
IGF-1R	<i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i>
KI67	Antigen Kiel-67

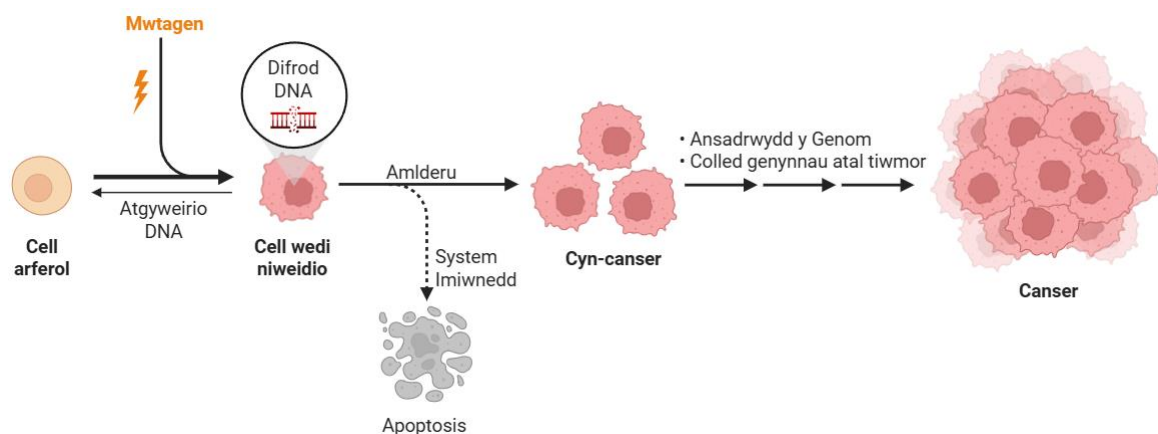
LAMP	<i>Lysosome-Associated Membrane Protein</i>
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LNP	<i>Lipid Nanoparticle</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MES	Microscop electron sgannio
MMAE	Monomethyl Auristatin E
mPEG PDLLA	Polyethylene glycol-poly(D,L-lactide)
NCG	Nifer o Cyffur ar pob Gwrthgorff
NGau	Nanoronynnau
PAC	Pant Araen Clathrin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDI	Polydispersity Index
PEG	Polyethylene glycol
PFA	Paraformaldehyde
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinases
PLC γ	Phospholipase C gamma
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)
PR	Derbynydd Progesteron
PVA	Polyvinyl alcohol
Rab	Rabankaryin
RGY	Rhwyrstr Gwaed yr Ymenydd
RhB	RhodamineB
RNA	Ribonucleic acid
scFC	<i>Single chain Fragment Variable</i>
TDM1	ado-Trastuzumab Emtansine
T-Dxd	Trastuzumab Deruxtecan
Tf	Transferrin
Tf647	Transferrin-Alexa647
TfR	Derbynydd Transferrin
TGN	<i>Trans-Golgi Network</i>
TNBC	Caanser y fron negyddol drifflyg
TNFR	<i>Tumour Necrosis Factor Receptor</i>
TNF α	<i>Tumour Necrosis Factor Alpha</i>
TNM	Tiwmor, Nod, Metastasis

TOPO	Topoisomerase
Tub	Tiwbiwlin
Tx-100	TritonX-100
Tz	Trastuzumab
Tz488	Trastuzumab-Alexa488
UE	Undeb Ewropeaidd
UV	Uwchfioled
UV-Vis	Ultraviolet-Visible

1 Cyflwyniad

1.1 Canser

Mae cancer yn glefyd a nodweddir gan gelloedd yn colli eu gallu i hunan-reoleiddio mitosis gan arwain at dwf afreolus o gelloedd yn datblygu a all, dros amser, oresgyn meinweoedd eraill (Ffigur 1-1), yn bennaf mae'n effeithio ar y fron, yr ysgyfaint a'r colon ond all datblygu o unrhyw feinwe yn y corff, yn cynnwys y gwaed (1). Er y gwahaniaethau mewn celloedd amrywiol sy'n ffurfio'r organau hŷn a'u prif swyddogaethau, mae'r ffordd y mae cancer yn dechrau, yn datblygu ac yn cydio yn parhau'n gyson. O fewn meinwe iach mae gan y celloedd systemau adeiledig sy'n cadw eu sefydlogrwydd genomig, er y swm mawr o ddifrod genetig sy'n cael ei wneud bob dydd. Gall y systemau hyn naill ai atgyweirio difrod DNA neu os yw'r difrod yn anadferadwy, gorfodi'r gell i fynd drwy apoptosis.



Ffigur 1-1: Mae niwed i'r DNA gallu arwain tuag at gell afreolus a all datblygu i cancer os yw systemau eraill yn methu i delio a'r gell wreiddiol

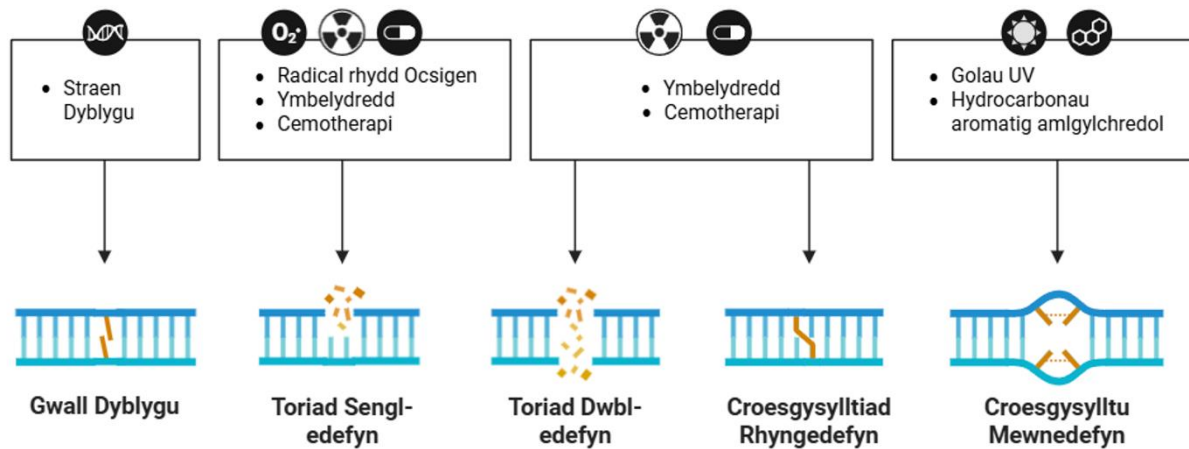
Fodd bynnag, gall mwtaniadau penodol analluogi'r systemau hyn gan ganiatáu i gell sydd wedi'i niweidio'n enetig oroesi (2,3). Er mwyn i ganser ddatblygu mae'n rhaid bod croniad digonol o ddifrod genetig sy'n caniatáu ar gyfer twf afreolus cell ddiffygiol (4). Fodd bynnag, mae tarfu ar y systemau atgyweirio DNA yn arwain at ansefydlogrwydd genetig o fewn y gell sy'n dod yn fwy difrifol dros amser wrth i'r mwtaniadau hel (5). Wrth i'r boblogaeth ddiffygiol hon o gelloedd dyfu maent yn dechrau gwahaniaethu'n genetig i'w gilydd, oherwydd y gwahanol mwtaniadau a helir dros amser ac yn ffurfio tiwmor heterogenaidd a fydd yn parhau i dyfu a mwstanu'n bellach (6,7). Dros amser, wrth i'r tiwmor hwn dyfu'n bellach, bydd yn atafaelu mwy o faetholion yn y corff ac yn rhoi straen cynyddol ar organau'r corff, gan amharu ar weithrediad arferol.

Unwaith y bydd yn ddigon datblygedig gall tiwmor oresgyn meinweoedd cyfagos dros amser trwy fynd trwy broses a elwir yn drawsnewidiad epithelaidd fesencymal (DEF) lle gall celloedd canser ddatgysylltu oddi wrth corff y prif diwmor a symud i safleoedd eraill yn y corff a creu tiwmorau eilaidd sy'n rhoi straen pellach ar y corff (8,9). O safbwynt clinigol, gall y tiwmorau eilaidd hyn gyflwyno heriau therapiwtig oherwydd gall celloedd fetastaseiddio i leoliadau na all y triniaethau eu cyrraedd, h.y. mae'r rhwystr gwaed-ymennydd (RGY) yn rhwystro llawer o driniaethau rhag cyrraedd tiwmorau eilaidd yn yr ymennydd, neu oherwydd heterogenedd gall y tiwmorau eilaidd newydd fod yn dangos gwahaniaeth genetig i'r tiwmor cynradd a all ddylanwadu ar effeithiolrwydd cyffuriau (10,11). Er nad yw'r broses DEF yn cael ei ddeall yn llawn, yn gyffredinol, mae ychydig o'r celloedd o fewn y tiwmor yn mynd trwy gyfres o newidiadau genetig sy'n lleihau eu mynegiant o proteinau angori gan ganiatáu iddynt ddatgysylltu oddi wrth y tiwmor a chael eu cludo trwy llif y gwaed neu lymff i fannau pell o fewn y corff. Yn y pen draw, mae'r celloedd rhydd yma'n sefydlu eu hunain mewn wahanol organau / meinweoedd

gan arwain tuag at twf tiwmorau eilaidd, neu fetastatig (12). Yn ddiddorol, mae gwahanol ganserau yn fwy tebygol o fetastasiseiddio i wahanol leoliadau eilaidd o fewn y corff, mae canserau'r fron er enghraifft yn metastasiseiddio'n gyffredin i'r ysgyfaint a'r esgyrn (13).

1.1.1 Difrod DNA

Gall niwed i'r DNA ddod o ffynonellau alldarddol ac mewndarddol, yn dibynnu ar ba ffynonellau mae'r niwed yn ymddangos yn wahanol (Ffigur 1-2). Mae ffynonellau mewndarddol yn cynnwys mathau o ocsigen rhydweithiol sy'n cael eu cynhyrchu fel sgil-gynhyrchion prosesau metabolaidd rheolaidd, a hefyd gwallau sy'n deillio o ddyblygiad DNA anghywir. Er bod y system imiwneidd yn chwarae rhan pwysig iawn mewn atal canser, gall hefyd gyfrannu ato gan y gall llid cronig ysgogi amlhau gormodol a chreu amgylchedd gwrthimiwneidd, sy'n cynyddu'r tebygolrwydd y bydd tiwmor yn datblygu (14,15). Yn ogystal, gall rhai pobl fod â thueddiad genetig i ddatblygu canser, yr enghraifft fwyaf nodedig o hyn fyddai'r sydd â mwtaniad yn un o'u genynnau BRCA. Mae BRCA1 a BRCA2 yn cael eu adnabod fel genynnau atal tiwmor ac, fel y mae'r enw'n awgrymu, mae'r rhain yn chwarae rhan bwysig mewn llwybrau atgyweirio DNA (16). Mae mwtaniadau yn y naill enyn neu'r llall yn eu hatal rhag cyflawni eu rôl arfaethedig mewn atgyweirio DNA a all, o ganlyniad, gynyddu'n fawr y risg o ddatblygu canser, yn enwedig canser y fron, mewn dynion a menywod (17,18).



Ffigur 1-2: Mae niwed i'r DNA gallu tarddu o sawl ffynonellau wahanol. Yn dibynnu ar y tarddle mae'r math o niwed sy'n cael ei wneud yn gwahaniaethu

Mae ffynonellau alldarddol yn cynnwys rhai mathau o ymbelydredd, megis pelydrau UV, a chemegau mwtagenig. Mae'r rhan fwyaf o'r amlygiad i'r rhain yn cael eu dylanwadu gan ffordd o fyw unigolyn, ac mae yfed alcohol a statws ysmegu yn ffactorau risg mawr ar gyfer datblygu rhai canserau (19,20). Mae'n bwysig nodi bod difrod DNA a mwtaniadau yn digwydd fel rhan o fywyd dydd i ddydd ac nid yw'n gwarantu bod cancer yn datblygu ond mae'r difrod cronus dros amser yn gyffredinol yn cynyddu'r risg a dyna pam mae oedran yn ffactor risg mawr ar gyfer cancer (21). Gan fod pobl yn gyffredinol yn byw i oedran hŷn nag o'r blaen amcangyfrifir y bydd y cynnydd mewn disgwyliad oes yn cyd-fynd â chynnydd mewn diagnosis o ganser gyda'r amcanestyniad y bydd hanner poblogaeth y DU yn datblygu cancer ar ryw adeg yn eu bywydau (22). Yng Nghymru, cancer sy'n gyfrifol am chwarter yr holl farwolaethau, gan barhau i fod y prif achos marwolaethau, ac yn 2024 roedd yn gyfrifol am 9,123 o farwolaethau dros y flwyddyn (23).

1.2 Canser y fron

Yn y DU y math mwyaf cyffredin o ganser yw canser y fron. Mae tua 55,900 o bobl yn cael diagnosis bob blwyddyn, sef 15% o achosion canser newydd yn y DU, ac o'r rhain mae tua 0.7% o'r achosion ymhlith dynion (24). Fel y soniwyd eisoes, mae nifer o ffactorau risg a rhagueddiadau genetig sy'n gwneud canser y fron yn fwy tebygol o ddatblygu. Un o'r prif ffactorau risg yw amlygiad oes i estrogen gyda menywod hŷn yn llawer mwy tebygol o ddatblygu canser y fron o ganlyniad (25). Mae hyn hefyd yn golygu bod y rhai sy'n dechrau cael misglwyf yn gynharach mewn bywyd, sy'n cael menopos yn ddiweddarach mewn bywyd neu'r rhai sy'n cael therapi amnewid hormonau, hefyd yn fwy tebygol o ddatblygu canser y fron oherwydd y cysylltiad cronol ag estrogen yn ystod eu hoes. Gall ffactorau amgylcheddol a ffyrdd o fyw hefyd gynyddu'r tebygolrwydd o ddatblygu canser y fron gydag yfed alcohol a gordewdra yn ffactorau risg mawr (26). Gyda'i gilydd, credir mai'r ffactorau risg hyn yw'r prif reswm dros 16% o achosion (27,28). Fel y sonir yn flaenorol, gall ffactorau genetig hefyd gynyddu'r tebygolrwydd o ddatblygu canser y fron yn fawr gyda'r genynnau BRCA yr enghraifft fwyaf adnabyddus. Fel arfer mae'r genynnau hyn i fod i weithredu o fewn prosesau rheoleiddio'r corff sy'n atal twf celloedd annormal ond mewn tua 0.1-0.2% o bobl mae naill ai'r genyn BRCA1 neu BRCA2 yn gamweithredol oherwydd mwtaniad genyn (29). O ganlyniad i'r camweithrediad hwn, mae'n llawer mwy tebygol y bydd mwtaniad oncogenig yn digwydd ac i diwmor ddatblygu.

1.2.1 Is-deipiau Canser y Fron

Ar ôl cael diagnosis, un o'r pethau pwysicaf i'w adnabod ynghylch canser y fron yw'r isdeip. Y 4 prif isdeip o ganser y fron yw Luminal A, Luminal B, Canser y Fron Negyddol Driphlyg (TNBC) a gorfynegi HER2 (HER2+, Tabl 1-1)) (30,31). Luminal A yw'r mwyaf cyffredin sy'n cynrychioli tua 50-60% a nodweddir y math hwn o ganser gan lefelau isel o'r ffactor mynegiant niwclear Ki-67 a gorfynegiant derbynyddion estrogen a progesteron (32). Mae canser y fron luminal A yn tueddu i ymateb yn well i driniaeth na'r isdeipiau eraill ac mae'n tyfu'n gymharol arafach fel awgrymir gan y lefelau is o Ki-67 (33).

Tabl 1-1: Dadansoddiad o'r gwahanol isdeipiau canser y fron a sut maent yn wahanol i'w gilydd. ER = Derbynnnydd estrogen. PR = Derbynnnydd Progesteron. + yn dynodi gorfynegiant o'r derbynnnydd, - yn dynodi dim gorfynegiant yn bresennol

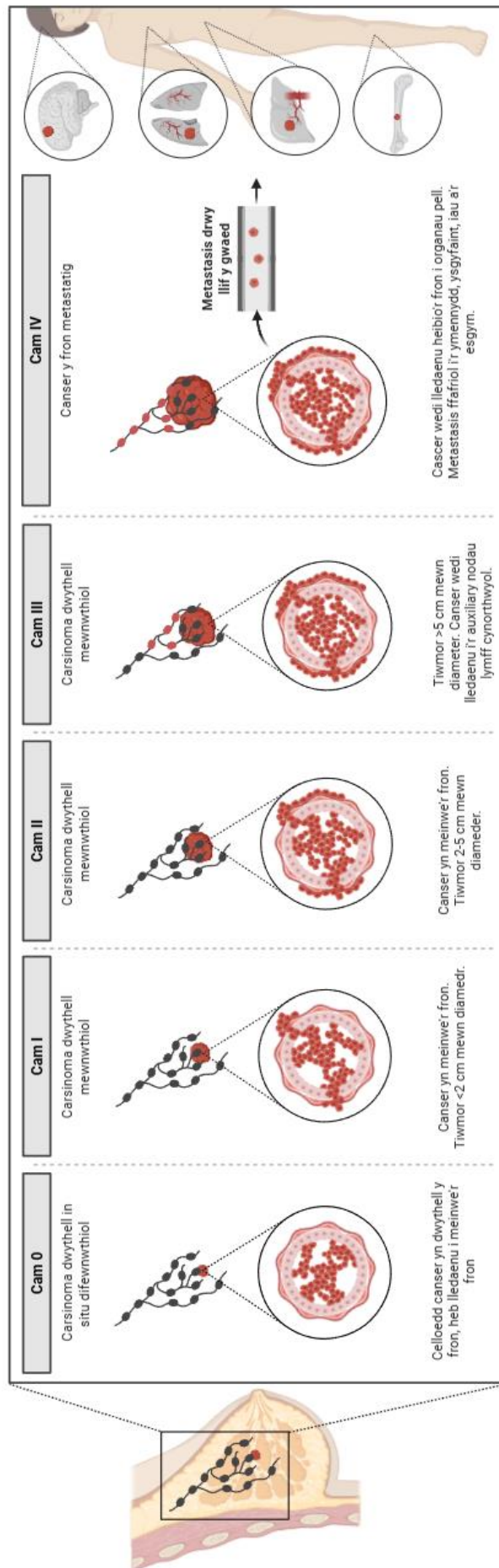
Is-deip	Mynegiant ER	Mynegiant PR	Mynegiant HER2	Mynegiant Ki67
Luminal A	+	+	-	Isel
Luminal B	+	+	+/-	Uchel
HER2+	-	-	+	Uchel
Negyddol Driphlyg	-	-	-	Uchel

Mae canser y fron luminal B yn llai cyffredin, sef tua 15-20% o achosion, ond mae'n fwy ymosodol ac mae ganddo prognosis gwaeth na chanserau Luminal A (34). Yn yr un modd â chanserau Luminal A maent yn gorfynegi derbynyddion estrogen a progesteron, ond mae ganddynt lefelau llawer uwch o Ki-67, sy'n arwyddedig o canser sy'n tyfu'n

gyflymach ac sy'n fwy ymosodol, a gallent hefyd or-fynegi'r derbynnydd HER2 (35). Gan fod rhai o'r rhain yn HER2+ mae'n gwneud therapi hormonaidd yn llai effeithiol gan nad yw'r tiwmor yn hollol ddibynnol ar signalau estrogen / progesteron ar gyfer twf ac felly mae angen strategaethau aml-therapiwtig ar gyfer triniaeth effeithiol. Mae tua 15-20% o achosion yn cael eu diagnosio fel HER2+, sef y prif isdeip o ddiddordeb ar gyfer y traethawd ymchwil hwn. Yn ogystal â gorfynegiant HER2, nodweddir yr isdeip hwn gan lefelau uchel o Ki-67 a all hefyd or-fynegi'r derbynnyddion hormonaidd ER a PR (36). O'i gymharu ag luminal A a B, mae canserau'r fron HER2+ yn tueddu i fod yn fwy ymosodol â phrognosis cyffredinol gwaeth (37). Mae'n werth nodi bod nifer o wahanol therapiwteg wedi'u datblygu sy'n targedu'r derbynnydd HER2, gan fanteisio ar ei orfynegiant, ond mae ymwrthedd i driniaeth yn parhau i fod yn her gyson sy'n eu gwneud yn aneffeithiol dros amser. TNBC yw'r isdeip mwyaf ymosodol sy'n cynrychioli tua 20% o achosion. Mae'r isdeip hwn yn ennill ei enw oherwydd nid yw'n gorfynegi ER, PR neu HER2 sydd o ganlyniad yn golygu bod diffyg amlwg o therapïau wedi'u targedu ar gael ar gyfer y canserau hyn (38). Fodd bynnag, oherwydd eu natur ymosodol a twf gyflym maent yn tueddu i fod yn fwy ymatebol i gemotherapiwtegau gan fod y cyffuriau hyn yn effeithio'n bennaf ar y celloedd sy'n tyfu gyflymaf yn y corff ond yn anffodus maent yn gwneud hyn heb wahaniaethu gan arwain at effeithiau andwyol gwaradwyddus fel alopesia, cyfog a chlefyd melyn (39). Yn gyffredinol mae cleifion sy'n datblygu canser y fron HER2+ yn tueddu i fod yn iau a wedi cael plant yn hwyrach, gyda'r tiwmorau yn tueddu i fod yn fwy datblygedig erbyn i nhw derbyn diagnosis (37). Mae hil hefyd yn chwarae rhan gyda fwy o achosion o canser y fron HER2+ mewn cymunedau Gwyn, Asiaidd a Sbaenaidd i gymharu a cymunedau Du sydd yn lle yn gweld cyfraddau lot uwch o TNBC (37).

1.2.2 Graddio cancer

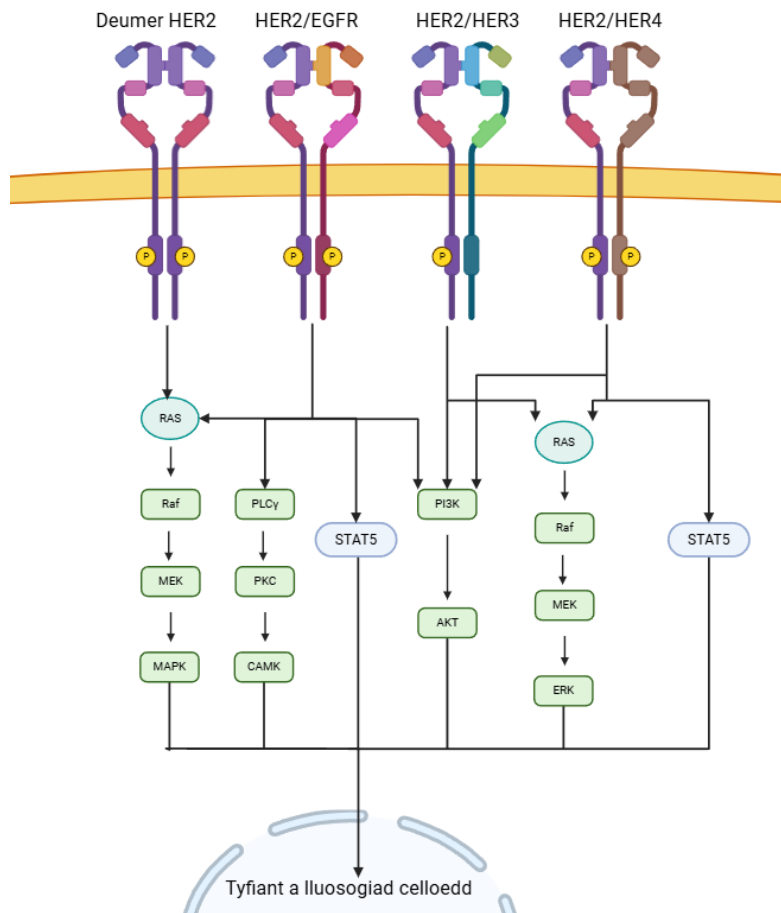
Gall canserau gwahanol ddefnyddio systemau graddio gwahanol i weithio allan i ba raddau y mae'r clefyd wedi datblygu, er enghraifft mae system raddio Gleason yn cael ei defnyddio'n gyffredin ar gyfer cancer y prostad a gellir defnyddio system raddio Fuhrman ar gyfer cancer yr arennau (40,41). Fodd bynnag, mae cancer y fron, ynghyd â sawl math arall o ganser solet, yn defnyddio system raddio TNM - Tiwmor (T), Nod (N) a Metastasis (M) (42). Asesir rhan T y sgôr rhwng 1-4 ac mae'n rhoi dangosydd o ba mor fawr yw'r tiwmor gwreiddiol ac a yw wedi lledaenu i'r meinweoedd o amgylch y fron. O fewn hyn mae is-grwpiau ar gyfer pob sgôr sy'n rhoi mwy o wybodaeth i glinigwr am faint neu fanylion penodol o ba feinwe y mae'r cancer wedi lledaenu iddo, er enghraifft mae sgôr o T4a yn dynodi bod y cancer wedi lledaenu i wal y frest. Ar gyfer y rhan N o'r sgôr, mae'n crynhoi pa mor bell i mewn i'r system lymffatig y mae celloedd cancer wedi ymledu ac mae'n cael sgôr rhwng 0-3. Mae hwn eto wedi'i rannu'n grwpiau penodol, ond mae hefyd yn wahanol o ran sut y ceir y sgôr, oherwydd gellir ei wneud yn glinigol trwy edrych ar ganlyniadau profion a sganiau neu gellir ei wneud yn batholegol trwy archwilio meinwe a dynnwyd yn ystod llawdriniaeth. Mae M, rhan metastasis y sgôr, yn cael ei sgorio naill ai fel 0 neu 1. Mae sgôr o 1 yn dangos bod y cancer wedi lledaenu i feinweoedd gwahanol ac yn debyg i'r sgôr nod gellir gwneud hyn yn glinigol neu'n batholegol (43). Trwy ddefnyddio'r system sgorio TNM ochr yn ochr â phrofion ar gyfer yr isdeip o ganser y fron mae'n posib penderfynu pa gam mae'r cancer wedi cyrraedd (Ffigur 1-3) ac yn hysbysu'r clinigwr beth yw'r cwrs gorau o driniaeth.



Ffigur 1-3: Sgematig o sut mae cancer yn lledaenu yn y corff a sut mae on'n cael ei raddio o ganlyniad

1.3 Teulu HER2

Mae'r protein HER2 yn rhan o'r teulu HER / erbB sydd i gyd yn perthyn i ddosbarth o dderbynyddion a elwir yn derbynyddion ginasau tyrosin (DCT), sy'n cael eu nodweddu gan dair rhanbarth: rhanbarth allgellog, rhanbarth trawsbilen a rhanbarth mewngellog. Er mwyn i'r rhain signalu'n llwyddiannus, mae ligand yn rhwymo i'r rhanbarth allgellog gan sbarduno newid cyfluniad sy'n caniatáu iddo deumeru â DCT arall. Ond, mae HER2 yn unigryw gan hyd yn hyn toes yna ddim ligand delfrydol wedi'i ddarganfod, felly mae o'n bodoli mewn cyflwr o strwythur agored sy'n barod i'w rwymo ag unrhyw un o aelodau eraill o'r teulu, yn enwedig HER3. Y rheswm am hyn yw bod HER3 yn unigryw ymhlith derbynyddion HER gan nad oes ganddo rhan cinas cyflawn (44). Heb hyn ni all gychwyn rhaeadru signalau felly mae rhaid iddo rwymo i aelod arall o'r teulu er mwyn cynhyrchu effaith sydd, o ganlyniad, yn gwneud HER2 y bartner rhwymol delfrydol. Yn ddiddorol, allan o'r holl bartneriaid rhwymol sydd ar gael i HER2, ei heterodimer gyda HER3 yw'r mwyaf pwerus o ran signalu mewngellol (45). Yn wir, sefydlwyd y gall un dimer HER2:HER3 ryngweithio â sawl gopi o ryngweithwyr fel Phospholipase C gamma (PLC-gamma) a Phosphoinositide 3-Kinases (PI3K) (Ffigur 1.4) (46).



Ffigur 1-4: Mae partneriaeth HER2 yn pennu natur y signalau sy'n deillio o'r parth kinase

Mae partneriaid rhwymol HER2 yn cael effaith sylweddol ar y signalau a'r effaith terfynol mae'r actifedaeth yn cael (Ffigur 1.4) . Gan fod HER2 yn bartner rhwymol delfrydol ar gyfer gweddill y teulu, gall llawer iawn o ligandau ysgogi ffurfio amrywiaeth o ddimerau sy'n cynnwys HER2, a phob un ohonynt yn gallu actifadu gwahanol lwybrau signalau gan arwain at amrywiaeth fawr o effeithiau cellog (47). Oherwydd bod y llwybrau signalau hyn yn cael eu hysgogi gan dderbynyddion eraill sy'n gysylltiedig â chanser, megis ER ac *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor* (IGF-1R), gall triniaeth estynedig wedi'i thargedu at HER2 arwain at orfyngiant y derbynyddion hyn fel ffordd o osgoi ataliad HER2 a thrwy hynny sicrhau ail-actifedaeth y llwybrau cellog a rennir (48,49). Mewn celloedd iach

arferol ni all HER2 ffurfio homodimerau a rhaid iddo rhwymo â gwahanol dderbynyddion teulu erbB sydd wedi actifadu'n barod. Fodd bynnag mewn achosion o ganser y fron HER2+ oherwydd y niferoedd enfawr o HER2 ar wyneb y gell gallent hunan-ymgynnull i ffurfio homodimerau ,yn annibynnol o unrhyw dylanwad allanol, gan arwain at signalu celloedd gwyrol a gorfywiogi llwybrau twf a goroesi o fewn y gell.

Rhai o'r prif ffactorau twf sy'n cael effaith ar canser HER2+ yn y pen draw yw Ffactor Twf Epidermol (EGF) ag Ffactor Necrosis Tiwmor α (TNF α) . Mae EGF er enghraifft yn adnabyddus fel y prif ligand ar gyfer EGFR, sy'n aelod arall o'r teulu erbB a partner rhwymo pwerus i HER2. O fewn canserau HER2+ mae lefelau uchel o EGF yn gyrru activedaeth EGFR sydd yn ei dro yn cynyddu nifer y dimerau signalau a ffurfir rhwng EGFR a HER2. Gan fod EGFR yn rheolydd allweddol o lwybrau signalau sy'n llywodraethu rheoleiddio a thwf celloedd, gall hyn arwain at dwf tiwmor cyflym a hyrwyddo ei oroesiad (50). Ffactor twf pwerus arall yw TGF α sydd yn ysgogi celloedd drwy actifadu derbynyddion TNFR. Ar ôl activedaeth maent yn sbarduno mudiant a goresgyniad canser (51). Nid yw'n syndod felly bod lefelau uchel o'r ffactorau twf hyn o fewn tiwmorau wedi'u cysylltu â chanlyniad gwaeth i gleifion.

1.3.1 HER2

Mae'r derbynnnydd HER2, a elwir hefyd yn ErbB2, yn DCT 185kD sy'n perthyn i'r teulu HER neu erbB o dderbynyddion sydd hefyd yn cynnwys EGFR (HER1), HER3 a HER4 (52) (Ffigur 1.4). Ers sefydlu ei rôl mewn canser ym 1984, canfuwyd bod HER2 wedi'i orfynegi mewn rhai canserau'r fron, gastrig, ofariaidd, oesoffagaidd ac endometraidd (53,54). Mae'r teulu erbB i gyd yn dderbynyddion trawsbilen sy'n bodoli fel monomerau ar wyneb y gell ac wrth actifadu'n llwyddiannus maent yn newid eu cydffurfiad gan

ganiatáu iddynt ffurfio homodimerau neu heterodimerau o fewn y teulu, gyda'r eithriad o homodimerau HER3 (55). Ar ôl ffurfio dimer, mae cydrannau tyrosin mewngellol y derbynyddion yn cael eu ffosfforyleiddio sy'n dechrau rhaeadru signalau o fewn y gell sy'n actifadu'r llwybrau Pi3K a MAPK, a'r rhain yn bennaf sy'n gyfrifol am dwf celloedd, amlhau a goroesiad (56). Tra bod gweddill y teulu hefo ligandau penodol nid yw HER2 â ligand naturiol a credir bod y derbynydd hwn yn bodoli mewn strwythur sydd eisoes ar agor er mwyn gwasanaethu fel partner rhwymol delfrydol ar gyfer aelodau eraill o'r teulu HER (57). Fodd bynnag, nid yw'r llwybrau cysylltiedig â HER2 wedi'i cyfyngu i ddibynnu ar y derbynydd am actifedaeth. Mae astudiaethau wedi dangos fod estrogen yn gallu actifadu'r llwybrau sy'n gysylltiedig â HER2 trwy signalau ER an-genomig (48,58). Gall y croessiarad hwn rhwng derbynyddion arwain at driniaethau'n colli eu heffaith oherwydd gall y celloedd osgoi ataliad HER2. Pan fydd nifer y derbynyddion HER2 yn ddigon uchel mae'r derbynydd yn gallu homodimeru gan arwain at actifedaeth pellach o llwybrau signalau afreolaidd (59).

1.3.2 Strwythur HER2

Er y gwahaniaethau rhwng y ligandau actifadu a diffyg parth cinas gweithredol yn HER3, mae pob un o deulu derbynyddion HER yn rhannu strwythur tebyg. Mae gan bob un ohonynt bedwar parth allgellog, rhanbarth trawsbilen a parth yml-bilen cytoplasmig a elwir fel arall yn barth cinas sydd, fel y crybwyllwyd eisoes, ag amhariad yn HER3 er ei fod yn dal yn bresennol. Mae ligandau yn rhyngweithio â pharthau I a III i actifadu'r derbynydd a dod ag ef i gyflwr o strwythur agored. Mae'r strwythur agored hwn yn

caniatáu parth II y derbynnydd i ryngweithio a rhwymo i'r un parth o fewn derbynnydd arall sydd wedi'i actifadu (60). Mae HER2 yn unigryw ymhlith y teulu gan ei fod yn dderbynnydd amddifad sy'n aros yn naturiol yn y strwythur agored – sy'n ei wneud ar gael yn hawdd i'w rwymo gyda gweddill y teulu.

1.4 Triniaethau ar gyfer Canser y Fron HER2+

Mae nifer o wahanol strategaethau triniaeth ar gael ar gyfer canserau HER2+ sy'n amrywio'n fawr o ran math a thebygolrwydd o lwyddiant (61). Gall y dewis o driniaeth gael ei gyfeirio gan nifer o wahanol ffactorau megis lleoliad y canser a dilyniant y clefyd. Er enghraifft, os canfyddir canser yn ddigon cynnar llawdriniaeth yw'r opsiwn a ffefrir gan ei fod yn cynnig tebygolrwydd llawer uwch y caiff gwared o'r canser i gyd yn llwyddiannus (62). Yn nodweddiadol, bydd claf yn cael therapi neo-gynorthwyol, megis cemotherapi neu triniaethau fwy penodol fel y sonnir isod, cyn llawdriniaeth i leihau'r tiwmor ac atal canser rhag lledaenu (63,64). Ar ôl tynnu'r tiwmor, rhoddir therapi gynorthwyol i drin unrhyw weddillion o'r canser a allai fod wedi'u methu yn ystod y llawdriniaeth (65). Yn dibynnu ar ddatblygiad yr canser, bydd angen ymyriad llawfeddygol i dynnu rhai o'r nodau lymff i sicrhau bod y canser yn cael ei dynnu'n llawn (66). Os ceir diagnosis yn rhy hwyr, fodd bynnag mae llawdriniaeth yn debygol o fod yn anaddas felly bydd angen strategaethau triniaeth wahanol.

1.4.1 Cemotherapi

Un o'r prif opsiynau triniaeth, ac ymhlith yr hynaf, sydd ar gael ar gyfer canser y fron, yn enwedig os yw canser HER2+ yn dangos ymwrthedd i'r triniaethau fwy penodol a trafodwyd isod, yw moddion cemotherapiwtig fel doxorubicin, paclitaxel ac emtansine (67–70). Mae'r cyfansoddion hyn yn effeithiol iawn am ladd celloedd sy'n rhannu'n gyflym, fodd bynnag nid oes ganddynt benodolrwydd sy'n arwain at effeithiau andwyol difrifol fel alopesia, dolur rhydd a chwydu (71). Mae effaith pob triniaeth yn gronnus sydd, yn anffodus, yn arwain at nifer o gleifion yn tynnu'n ôl o driniaeth gan na allant oddef rowndiau therapi pellach (72).

1.4.2 Doxorubicin

Mae doxorubicin yn atalydd topoisomerase II ac yn un o'r cyffuriau cemotherapiwtig llymach o ran effeithiau andwyol ac mae'n ennill y llysenw "chemo diafol coch" iddo'i hun am y profiad y mae cleifion yn ei gael a'r ffaith ei fod yn goch (73). O fewn cnewyllyn celloedd, mae'r ensym TOPO II yn hollti DNA i leddfu'r straen sy'n cronni mewn DNA torchog ac yna'n ailgysylltu'r ddau edefyn gyda'i gilydd gan rhyddhau'r tensiwn. Credir bod gan Doxorubicin sawl fecanweithiau o ran lladd celloedd ond ei brif fecanwaith yw y gall atal ailgysylltu'r llinynnau DNA holltog hyn gan atal dyblygu o fewn celloedd sy'n arwain at arestiad cylchred celloedd ac apoptosis (74). Gall doxorubicin hefyd atal y tensiwn o fewn llinynnau rhag cael ei ryddhau gan arwain iddynt dorri ac eto apoptosis trwy arestiad cylchred celloedd (75). Yn ogystal, pan gaiff ei fetaboli ym mhresenoldeb ocsigen gall gynhyrchu radicalau rhydd sydd hefyd yn cael effaith niweidiol ar y DNA. Gall y radicalau rhydd hyn gael eu dadactifadu gan ensymau catalase a superoxide dismutase er mwyn atal niwed i celloedd, ond y mae tiwmorau, a chelloedd myocardaidd yn brin o'r ensymau hyn (76,77). Oherwydd hyn gall driniaeth doxorubicin arwain at cardiowenwyndra difrifol a all fod yn angheuol mewn rhai achosion (78). Oherwydd y swm eithafol hwn o ddifrod DNA a achosir gan doxorubicin ac asiantau cemotherapiwtig eraill mae'r effaith a gaiff ar y corff yn ddigon difrifol lle gall gyfrannu at ganserau newydd (79,80). Nid yw'n syndod, oherwydd hyn, bod ffocws ar ddatblygu therapïau newydd a mwy diogel gyda lefel llawer uwch o benodolrwydd ar gyfer celloedd canser. Gellir gwneud hyn trwy fanteisio ar nodweddion y tiwmor gan ganiatáu iddo gael ei dargedu'n uniongyrchol neu drwy ddatblygu dulliau sy'n sicrhau y caiff therapiwteg ei gludo yn benodol i'r celloedd darged. Gellir defnyddio gwrthgyrff i'r ddau bwrpas hyn gan y gallent dargedu derbynyddion gorfynegedig ar wahanol ganserau a

naill ai arfogi'r system imiwnedd neu gael eu defnyddio i gludo cyffuriau i bwynt penodol o fewn y corff fel y gwelir mewn cyfuniadau cyffuriau gwrthgorff.

1.4.3 Atalyddion Moleciwl Bach

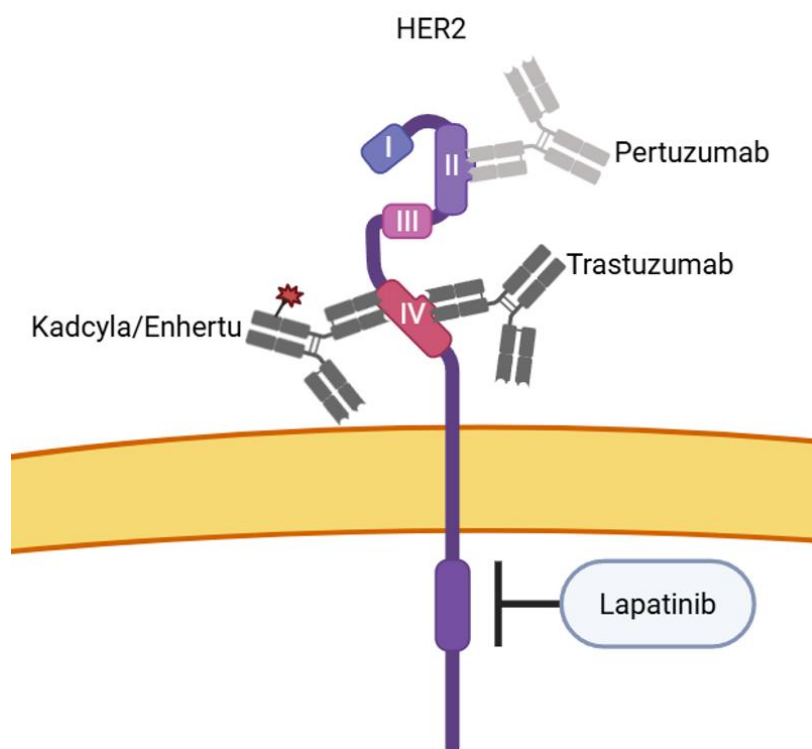
Er bod ffocws y therapïau sy'n targedu HER2 a drafodwyd wedi bod ar therapïau biolegol, mae'n bwysig nodi bod dewisiadau eraill gyda ffocws fwy cemegol yn bodoli. O fewn y clinig mae atalyddion moleciwl bach sydd wedi'u datblygu i dargedu HER2 yn benodol a'r mwyaf enwog yw lapatinib. Mae'r rhain i gyd yn perthyn i ddosbarth o gyffuriau a elwir yn Atalyddion Cinas Tyrosin (ACT) ac fel y mae'r enw'n awgrymu mae nhw'n atal parth cinas ACTs (Ffigur 1-5) gan atal signalau pellach a phan gânt eu defnyddio mewn cyfuniad â trastuzumab, gwrthgorff sy'n cael ei ddefnyddio mewn triniaeth canser HER2+, gallent gynhyrchu effaith synergidd (81). Mae Lapatinib yn atalydd cildroadwy sy'n cystadlu i rwymo â safle rhwymo ATP o fewn parthau cinas EGFR a HER2, mae hyn yn atal y dechreuad o unrhyw signalau hyd yn oed yn achos actifadu derbynnydd, a all ar lefel cell atal twf ac achosi apoptosis (82). Er bod ymwrthedd i driniaeth effeithiol yn dal yn broblem fawr (83). Ers datblygu lapatinib, mae atalyddion moleciwl bach mwy modern sy'n targedu'r teulu erbB cyfan wedi'u datblygu a'u cyflwyno i'r clinig. Mae neratinib a pyrotinib yn atalyddion anwrthdroadwy o holl barthau cinas erbB trwy rwymo cofalent i'r parth rhwymo ATP (84,85). Gan fod y rhain yn rhwymo'n anwrthdroadwy maent yn darparu rhwystriad signalu fwy trylwyr gan fod rhaid i'r gell amnewid pob derbynnydd sydd wedi effeithio i gymharu a lapatinib lle mae'r derbynnyddion yn gallu adfer drost amser.

1.5 Gwrthgyrff

Mae nifer o driniaethau gwrthgyrff gwahanol wedi cael eu cymeradwyo ar gyfer llu o ganserau ond un o'r hynaf a'r mwyaf enwog yw trastuzumab (Tz), gwrthgyrff monoclonaid wedi'i ddyneiddio sy'n cael ei farchnata dan yr enw Herceptin. Fe'i defnyddiwyd gyntaf mewn treialon clinigol ym 1992, wyth mlynedd ar ôl i fynegiant HER2 gael ei gysylltu â chanserau, canfuwyd bod Tz yn therapiwtig effeithiol, naill ai fel un asiant neu mewn cyfuniad â chemotherapi. Erbyn 1996 roedd wedi cyrraedd y trydydd rhan o dreialon clinigol cyn cael ei gymeradwyo i'w ddefnyddio ym 1998 gan yr FDA gyda'r UE yn dilyn dwy flynedd yn ddiweddarach (86). Yn fuan iawn daeth yn safon aur ar gyfer trin canser y fron HER2+ oherwydd ei fod yn fwy penodol ac effeithiol o gymharu â thriniaethau cemotherapiwtig safonol (87). Fodd bynnag, er bod y gyfradd oroesi wedi cynyddu'n sylweddol, mae angen triniaethau newydd gan fod ymwrthedd yn broblem fawr o hyd. Er y safon o triniaethau modern os mae ymwrthedd yn datblygu maent yn colli eu heffaith sy'n gorfodi'r defnydd o triniaethau, fel cemotherapi, sydd ddim mor effeithlon am trin y canser heb sôn am yr effaith ar safon bywyd cleifion. Oherwydd natur heterogenaidd tiwmorau, efallai y bydd gan rai o'r celloedd imiwnedd cynhenid i'r driniaeth Tz tra gallai eraill ddatblygu imiwnedd caffaeledig yn ystod y driniaeth. (88). Ers cyflwyno Tz i'r farchnad mae gwrthgyrff targed HER2 eraill wedi'u datblygu megis pertuzumab, sy'n bachu i parth wahanol o'r derbynnydd (89).

1.5.1 Trastuzumab / Herceptin

Mae Tz yn rhwymo i barth IV HER2 (Ffigur 1-5) a chredir ei fod yn ei atal rhag dimeru sy'n atal unrhyw signalau i lawr yr afon; mae gwrthdaro yn y llenyddiaeth i'r dystiolaeth yma, yn enwedig ar gyfer dimerau penodol (90,91). Yn ogystal, gan ei fod yn wrthgorff mae'n amlygu'r gell i'r system imiwnedd fel targed ar gyfer dinistrio (92) gelwir hyn yn cytotoxicedd cell-gyfryngol gwrthgorff-ddibynnol (CCGGD). Er mwyn lleihau ymwrthedd fe'i rhoddir yn gyffredin ochr yn ochr â chyffuriau cemotherapiwtig, ond nid yw hyn bob amser yn llwyddiannus (93). Mae sawl fecanwaith gwrthiant yn bodoli, er enghraifft gall y derbynnydd HER2 ollwng y gyfran allgellog gan adael y gydran mewngellol i actifadu llwybrau signalau (94,95). Mae hyn oherwydd bod rhan allgellog y derbynnydd yn atal gweithgaredd tyrosin cinas mewngellol y derbynnydd (96). Un o effeithiau dilynol hyn yw y gellir Tz rhwymo'r gyfran allgellog sy'n gylchredu gan atal y Tz rhag dylanwadu ar unrhyw dderbynnyddion HER2 cyflawn ar y canser. Yn ogystal, mae sawl achos o wrthwynebiad caffaeledig yn datblygu o ganlyniad i mwtaniadau yn y safle rhwymo sy'n atal rhwymiad Tz llwyddiannus (97).



Ffigur 1-5: Mae yna sawl triniaethau gwahanol sy'n targedu HER2 yn penodol. Mae trastuzumab a triniaethau sy'n seiledig arno'n rhwymo i parth IV y derbynydd tra bod pertuzumab yn rhwymo i parth II. Yn mewngellol mae lapatinib yn targedu'r parth cinas.

1.5.2 Cyfuniad Cyffur a Gwrthgorff (CCG) -Tz

Gan fod cydberthyniad rhwng hyd y driniaeth ag ymwrthedd, bu ymdrechion i geisio gwneud y mwyaf o effeithiolrwydd therapiwtig yn yr amserlen fyrraf bosibl tra'n manteisio ar benodolrwydd gwrthgyrff fel trastuzumab (98). Arweiniodd hyn at ddatblygiad CCG a bwriedir iddynt gario llwyth tâl, fel arfer cyfrwng sytotocsig cryf, i'w darged penodol. Mae'r rhain yn cael eu creu trwy gysylltu cyffur â gwrthgorff gan ddefnyddio moleciwl cysylltu. Yn dibynnu ar yr amser rhyddhau a ffeirir gellir addasu'r cysylltydd i'w hollti o dan amodau penodol e.e. gellir ei gynllunio i gael ei hollti'n broteolytaidd yn y lysosomau sydd wedyn yn rhyddhau'r cyffur o weddill yr CCG (99). Mantaïs fawr o ddefnyddio CCG yw y gellir eu defnyddio i ddosbarthu cyffuriau sydd fel arfer yn rhy wenwynig i'w rhoi fel cyffur rhydd, fodd bynnag un effaith di-darged nodedig

yw'r gwenwyndra llygadol y maent yn ei gynhyrchu am resymau aneglur (100). Ar gyfer canser y fron HER2+ mae yna 2 CCG sefydledig sydd wedi'u cymeradwyo ar gyfer defnydd therapiwtig: T-DM1 ac Enhertu. Un o fanteision mawr y ddwy driniaeth hyn yw bod y Tz, yn ogystal ag effeithiau'r cyffur, yn cadw ei holl weithgaredd yn erbyn y canser hefyd (101). Er eu bod yn effeithiol, mae'r cyfansoddion hyn yn hynod o ddrud i'w datblygu ag i thrin cleifion gyda sydd wedi cyfyngu ar eu defnydd fel triniaeth yn gwledydd llai cyfoethog.

1.5.3 Kadcyla

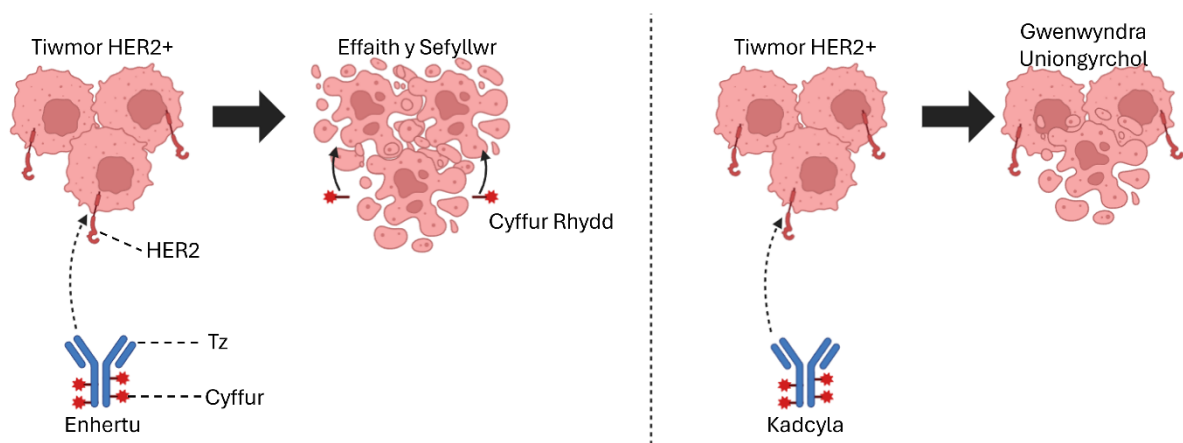
Mae T-DM1, a elwir hefyd yn Kadcyla, yn GCG sy'n cynnwys trastuzumab gyda'r asiant cemotherapiwtig emtansine wedi'i gyfuno ag ef. Mae Emtansine, a elwir hefyd yn DM1, yn atalydd microtiwbwl sy'n atal polymeru'r microtiwbiau a thrwy hynny atal celloedd rhag symud ymlaen trwy'r cylchred celloedd, sydd yn ei dro yn sbarduno apoptosis (102). Mae'n perthyn i ddosbarth o gyffuriau a elwir yn maytansinoids, mae gan y rhain fecanwaith gweithredu tebyg i ddosbarth alcaloidau vinca o gyfryngau cemotherapiwtig, fodd bynnag maen nhw'n llawer mwy grymus - o leiaf 100 gwaith yn fwy gwenwynig mewn astudiaethau in vitro (103,104). Methodd ymdrechion blaenorol i ddod â maytansinoidau i'r clinig oherwydd hyn, gyda gormodedd o effeithiau di-darged yn creu pryderon am wenwyndra wrth cyrraedd y crynodiadau sydd eu hangen i weld effaith glinigol. Yn wir, ers iddo gael ei gysylltu â Tz mae'r gwenwyndra systemig cyffredin hwn wedi diflannu'n bennaf gan adael T-DM1 fel cyffur sy'n cael ei oddef yn dda ar y cyfan (105). Rhan o'r rheswm dros ei oddefgarwch gwell yw oherwydd ar ôl ei ryddhau, nid yw cydran DM1 y CCG yn gallu croesi'r bilen plasma yn rhydd er bod hyn hefyd yn cyfyngu

ar ei heffeithiolrwydd o fewn tiwmorau heterogenaidd gan nad yw T-DM1 yn dangos y gallu i ladd celloedd cyfagos trwy effaith y gwylwyr (106). Mae effaith gwylwyr yn cyfeirio at allu rhai triniaethau wedi'u targedu fel CCG i ladd celloedd o amgylch eu targed arfaethedig. Er gwaethaf hyn, mae T-DM1 yn dal i fod yn driniaeth effeithiol i gleifion sydd eisoes wedi cael triniaeth flaenorol gyda Tz yn aflwyddiannus (107). Pan gafodd ei ddefnyddio fel therapi llinell-gyntaf, canfuwyd o'i gymharu â thriniaethau safonol ei fod yn ymestyn bywydau cleifion am fisoedd gyda'r bonws ychwanegol o gael ei oddef yn well na'r strategaeth driniaeth safonol o trastuzumab ochr yn ochr ag asiant cemotherapiwtig (108). Rhagdybiwyd y byddai cynyddu'r Nifer o Cyffur ar pob Gwrthgorff (NCG) o 3.5 yn gwella ei effeithiolrwydd ymhellach ond nid yw hyn yn wir gan y byddai'n arwain at broffil ffarmacocinetig gwahanol (109,110).

1.5.4 Enhertu

Yr ail CCG a gymeradwywyd ar gyfer canser y fron HER2+ yw Enhertu a elwir fel arall yn trastuzumab deruxtecan (T-Dxd). Fel y mae'r enw'n awgrymu, mae Tz wedi'i gyfuno â'r atalydd topoisomerase I (TOPO I) deruxtecan. Mae TOPO I yn gweithredu'n debyg i TOPO II ond yn lleddfu tensiwn yn y DNA drwy hollti dim ond un o'r llinynnau yn hytrach na'r ddau (111). Oherwydd hyn pan gaiff ei atal, mae effaith debyg i'r hyn a welwyd yn ystod ataliad TOPO II yn digwydd - methiant i ailgysylltu llinynnau DNA, hollt a thorri DNA oherwydd cronni tensiwn. O'i gymharu â T-DM1, sefydlwyd bod T-Dxd yn fwy effeithiol fel triniaeth, ond cafodd sawl mwy o effeithiau andwyol ei adrodd (112). Gellir esbonio hyn yn rhannol gan y NCG llawer uwch o 8 T-Dxd sydd wedi'i gymharu â T-DM1 er mai'r prif reswm yw'r gwahaniaeth yn effaith gwylwyr a welir rhwng y ddau. (113). Mae effaith

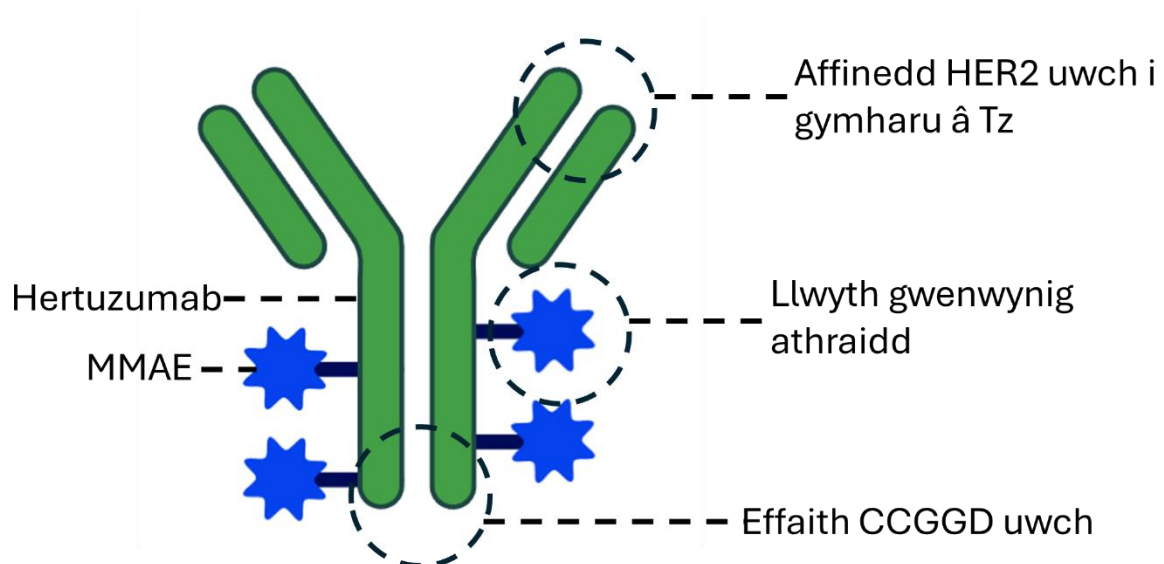
hyn yn digwydd ar ôl i'r cyfansoddyn gael ei ryddhau o'r CCG, fel arfer o fewn y lysosom, ac yna'n mynd i mewn ac yn lladd y boblogaeth o gelloedd cyfagos. Er mwyn i hyn ddigwydd mae angen i'r cyffur sy'n cael ei ryddhau fod yn athraidd â'r philen blasma. Gan nad yw llwyth tâl T-DM1 yn gallu croesi'r bilen blasma, ni welir unrhyw effaith y sefyllwr tra yn T-Dxd gall y deruxtecan a ryddhawyd groesi'r bilen plasma a caniatáu iddo gael ei effaith sytotocsig ar y celloedd o amgylch y safle rhyddhau (Ffigur 1-6) (114,115). Mae'r gwahaniaeth hwn yn effaith gwylwyr hefyd yn dylanwadu ar oddefgarwch ac addasrwydd y therapiwteg ar gyfer tiwmorau gwahanol. Gan nad oes ganddo effaith tu allan i'r celloedd a dargedir mae T-DM1 yn fwy addas ar gyfer tiwmorau mwy homogenaidd oherwydd mewn theori bydd yr holl gelloedd tiwmor yn agored i niwed a gan na fydd niwed cyfagos i'r targed dylai leihau effeithiau andwyol. Fodd bynnag, ar y cyfan mae'r mwyafrif o diwmorau'n heterogenaidd, mae T-Dxd felly yn lladd poblogaethau cymysg o gelloedd canser yn well, ond gyda'r cyfaddawd ei fod o'n achosi effeithiau di-darged cynyddol.



Ffigur 1-6: Yr wahaniaeth rhwng yr effaith cytotoocsig mae Enheru a Kadcyila yn cael. Mae hyn o ganlyniad i'r wahaniaeth mewn athreiddedd y cyffuriau atodedig

1.5.5 Disitamab Vedotin

Yn fwy diweddar mae'r CCG disitamab vedotin wedi cyrraedd treialon clinigol cam 1b/2 sy'n ymchwilio i'w effeithiolrwydd yn erbyn ystod o ganserau sy'n gorfynegi HER2. Yn debyg i'r CCG blaenorol a grybwyllwyd, mae'n targedu'r derbynnydd HER2, er ei fod trwy ddefnyddio hertuzumab, neu disitamab, yn cael ei ddefnyddio ar gyfer asgwrn cefn y gwrthgorff gyda chysylltydd a gellir hollti'n atodi'r cyffur monomethyl auristatin E (MMAE) (Ffigur 1-7) (116). O'i gymharu â trastuzumab, mae gan hertuzumab affinedd uwch ar gyfer HER2 ac mae'n dangos mwy o allu i achosi marwolaeth celloedd trwy CCGGD (117). O ran y cyffur, yn debyg i emtansine, mae MMAE yn asiant sy'n anwytho apoptosis drwy bolymaru tubulin. Oherwydd ei wenwyndra cryf yn ogystal â'i botensial fel asiant radiosensiteiddio mae wedi dod yn gyffur o ddiddordeb o ran fformiwleiddiad CCG (118).



Ffigur 1-7: : Strwythur Disitamab Vedotin a sut mae o'n gwahaniaethu o Kadcyla

1.6 Nanogronynnau a Nanofeddyginiaethau

Mae'r diffiniad o beth ydi nanofeddyginiaeth yn mater eithaf dadleugar gyda rhai yn ystyried iddynt gynnwys pob dim o dan $1\mu\text{m}$ tra bod eraill rhai eraill fel yr asiantaeth meddyginiaethau Ewropeaidd (EMA) o'r barn fod rhaid iddynt fod lot llai (100nm) (119,120). Mae'r math o driniaeth sy'n cael ei ystyried fel nanofeddyginiaeth hefyd yn amrywio gyda nanoronnau, firysau ag CCG yn cael ei ystyried gan rhai (121). I'r traethawd hon rydym yn ystyried nanoronnau (NGau) i fod yn ronynnau bach tua $<500\text{nm}$ o ran maint a gellir eu gwneud o amrywiaeth eang o ddeunyddiau fel polymerau, lipidau a metelau (122). O safbwynt danfon cyffuriau i rannau arbennig o'r corff, mae defnyddio NGau yn llwybr deniadol i'w ddilyn gan y gallent amddiffyn y cyffur rhag y corff a hefyd y corff rhag y cyffur gan ganiatáu ar gyfer defnyddio cyfansoddion mwy gwenwynig neu fiolegol fregus fel DNA neu RNA. Er bod llawer iawn o ymchwil, wedi ac yn cael ei wneud yn y maes, o safbwynt canser mae bwlch mawr rhwng y llwyddiant a welwyd yn ystod astudiaethau in vitro yn y labordy a chymeradwyaeth glinigol. Hyd yma ychydig iawn o driniaethau seiliedig ar nanoronnau sydd wedi symud ymlaen trwy dreialon clinigol (123). Un broblem yw bod y NGau yn tueddu i gronni yn yr iau yn lle'r lleoliad targed, neu maent yn cael eu rhyng-gipio gan y system imiwnedd sy'n eu hatal rhag cyrraedd eu cyrchfan arfaethedig (124,125). I geisio arbed hyn mae NGau wedi cael eu datblygu gyda haenau arbennig mewn ymgais i guddio o'r system imiwnedd, gyda PEGyleiddo yn ddull poblogaidd o gyflawni hyn, neu ddefnyddio dulliau targedu i gronni mewn safle targed (126,127). Mater posibl arall sy'n gynhenid i ddyluniad NGau yn yr achos hwn yw'r gwenwyndra a achosir gan y gronynnau eu hunain, er enghraifft gall rhai metelaidd achosi niwed i'r arennau tra gall rhai polymerau gael eu torri i lawr yn gynhyrchion gwastraff niweidiol (128,129). Er mwyn osgoi hyn,

rydym ni, fel eraill, wedi dewis datblygu ein NGau allan o bolymer o'r enw PLGA sy'n bolymer a gymeradwyir gan FDA sy'n cael ei dorri i lawr yn y corff fel rhan o'r cylchred Krebs gan adael dim cynhyrchion gwastraff niweidiol ar ôl (130).

Ystyrir fod gan NGau potensial mawr sydd wedi eu gweld nhw'n cael eu ddefnyddio ar gyfer sawl pwrpas yn y byd iechyd. Er enghraifft maent wedi gweld defnydd fel cyfryngau diagnostig a theraddiagnostig gyda'r esiampyl fwyaf nodedig o hyn yn allanol o'r corff ar ffurf prawf COVID-19, yn fewnol maent wedi cael eu defnyddio ar gyfer diagnosis canser (131,132). Er enghraifft, gall claf gael ei drin â NGau magnetig sydd o dan MRI yn cynhyrchu cyferbyniad llawer cryfach na chelloedd tiwmor (133). Er bod hyn yn dibynnu ar groniad o NGau oherwydd yr effaith EPR trwy addurno'r NGau gellir eu defnyddio i ganfod canserau microsgopig (134). Er y sawl defnydd sydd ganddynt prif ffocws y traethawd ymchwil hwn yw botensial mawr NGau fel therapiwteg,

1.6.1 Deunydd NGau

Y man cychwyn pwysicaf wrth ddatblygu nanoronynnau yw penderfynu pa ddeunydd y byddant yn ei gynnwys gan y bydd hyn yn dylanwadu'n fawr ar eu nodweddion cyffredinol. Mae NGau a wneir o aur er enghraifft yn tueddu i fod yn llawer llai na'r rhai a wneir o bolymerau naturiol fel asid hyaluronig sydd o ganlyniad yn dylanwadu ar faint a math y cargo y gall yr NGau hyn eu cludo (135). Yn ogystal, bydd y deunydd NGau hefyd yn dylanwadu'n fawr ar gwefr cyffredinol y gronyn a all eto ymyrryd â'i pwrpas arfaethedig. Ffactor pwysig arall i'w ystyried yw gwenwyndra cynhenid y NGau sylfaenol cyn llwytho â unrhyw gyffuriau neu addasu'r arwyneb gan fod rhai polymerau gwefr

bositif cryf fel polyethylenimine (PEI), yn achosi effeithiau sytotocsig sy'n gwaethygu os nad ydynt yn fioddiraddadwy ac yn gasglu am amseroedd hir yn y corff (136,137).

Mae rhai ymchwilwyr wedi dewis ymgorffori galluoedd targedu i ddyluniad y NGau eu hunain. Er enghraifft, trwy ffurfio'r gronynnau allan o ddarnau cellog neu drwy ymgorffori ligand penodol yn eu dyluniad mae'n rhoi gallu targedu cynhenid i'r gronynnau heb yr angen am addasiadau pellach a gynrychiolir orau gan NGau asid hyaluronig (138).

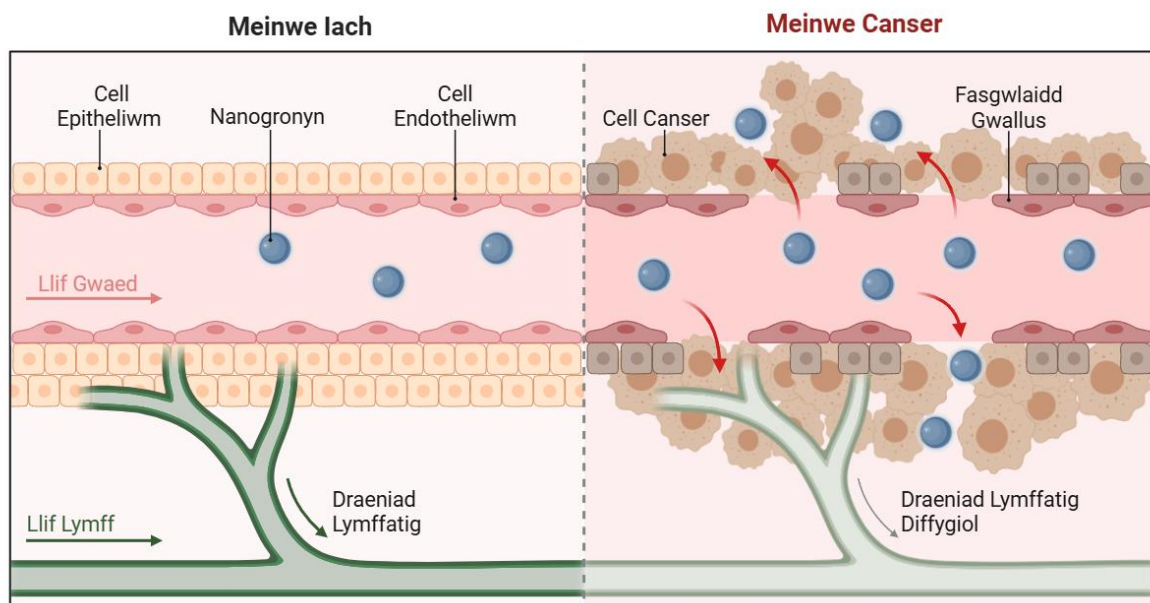
Mae sefydlogrwydd y NGau hefyd yn cael ei effeithio'n fawr gan y dewis o ddeunyddiau cychwyn. Er mwyn darparu cyffuriau'n effeithiol o fewn celloedd, gall fod angen diraddiad'r nanoronyn o fewn yr endosomau / lysosomau a thrwy hynny ryddhau'r cyffur oddi mewn, rhaid bod yn ofalus fodd bynnag i sicrhau nad yw'r nanoronnau yn torri i lawr yn gynamserol. Tra bod sefydlogrwydd NGau o fewn y corff yn bwysig iawn o safbwynt ymarferol, mae "oes silff" NGau hefyd yn arwyddocaol. Er enghraifft, nid yw rhai NGau yn gallu cadw eu swyddogaeth ar ôl lyoffileiddio neu rewi tra bod eraill yn llawer mwy gwydn o ran storio hirdymor (139,140).

1.6.2 Targedu â NGau

Mewn ymdrech i reoli darpariaeth NGau fel triniaeth tu mewn y corff mae nifer o systemau targedu gwahanol wedi'u datblygu ac yn fras gellir eu categoreiddio fel rhai goddefol neu weithredol.

1.6.3 Targeddu Goddefol

Mae targedu goddefol yn dibynnu ar yr NGau yn cronni ar safle'r driniaeth heb unrhyw gymorth gan dargedu moleciwlau (141). Y brif ffordd y gwneir hyn yw trwy fanteisio ar yr effaith treiddiad dargadwad gwell a welir mewn tiwmorau (142). Mae'r effaith hyn yn cael ei achosi gan fasgwleiddiad hydraidd sy'n datblygu o amgylch ac yn bwydo'r tiwmor (Ffigur 1-8) (143). Ar gyfer danfon cyffuriau goddefol, gall NGau ddianc o'r cylchrediad drwy'r pibellau gwaed hydraidd ac ymgaslu o gwmpas y tiwmor . Drwy hynny cynhyrchir crynodiad lleoledig o gyfansoddyn therapiwtig. Fel y crybwyllwyd yn flaenorol, gan fod NGau yn tueddu i gronni yn yr iau neu'n cael eu targedu gan y system imiwnedd, gall yr effaith hyn fod yn ddefnyddiol i leoli'r cyffur yn y targed.



Ffigur 1-8: Esiampl o sut mae amgylchedd lleol cancer yn effeithio ar y system gylchredol a sut mae hyn yn gallu caniatáu i nanoronnau ymledu i'r meinwe sy'n amgylchynu'r pibell waed

1.6.4 Targeddu Actif

Er mwyn sicrhau bod y NGau yn cronni mewn ardaloedd penodol neu mewn celloedd penodol, gellir eu haddurno neu eu gorchuddio â ligandau targedu i sicrhau eu bod yn rhwymo'r celloedd hyn (144). Dull cyffredin yw ei addurno â gwrthgyrff (145). Ar gyfer ein gronynnau dyma'r dull yr ydym yn ei ddilyn ar ôl dylunio NGau wedi'u haddurno trastuzumab gyda'r nod o ddarparu therapiwteg i ganser y fron HER2+ yn benodol. Er bod rhai NGau yn dibynnu ar ddefnyddio gwrthgyrff, mae eraill wedi dewis defnyddio affibodies neu scFVs i gadw maint y gronynnau mor isel â phosibl (146). Mae dulliau eraill o ddylunio gronynnau wedi'u targedu yn cynnwys addurno'r NGau â ligand naturiol derbynnydd sydd wedyn yn clymu iddo gyda'r nod o ysgogi mewnnoli (147).

Yn wir mae yna llawer o geisiadau wedi bod i ddatblygu NGau sy'n targedu canser y fron yn benodol. Mae rhai wedi ceisio manteisio ar y ffaith bod y derbynnydd ffolad wedi'i orfynegi ar wyneb llawer o ganserau, yn enwedig TNBC(148). Defnyddiodd un grŵp, er enghraifft, nanoronnau PLGA-PEG wedi'u haddurno ag asid ffolig i gyflwyno metformin i gelloedd canser, ar ôl dangos gweithgaredd gwrth-ganser eisoes, roedd ei ddefnydd wedi'i gyfyngu o'r blaen gan sgîl-ffeithiau, gan fod angen dos uchel a bioargaeledd isel (149). Fodd bynnag, mae eraill wedi llwyddo i gapsiwleiddio'r asiant cemotherapiwtig mitoxantrone a'i gyflwyno'n llwyddiannus i gelloedd canser, gyda'r nanoronnau wedi'u haddurno â ffolad yn cael eu mewnosod yn llawer cyflymach na'r rhai heb eu haddurno (150).

Gwnaed ymdrechion hefyd i ddatblygu nanoronnau wedi'u haddurno â transferrin i ganiatáu cyflwyno triniaethau ar draws Rhwystr Gwaed yr Ymennydd (RGY). O fewn triniaethau ar gyfer cyflyrau fel glioblastoma a chanserau ymennydd eraill, gwelir y

derbynnydd transferrin yn darged deniadol gan ei fod wedi'i sefydlu ers tro bod capilarïau'r ymennydd yn mynegi'r derbynnydd yn helaeth, ac yn fuan daeth i'r amlwg bod gwrthgyrff a oedd yn ei dargedu yn cael eu cludo ar draws y RGY (151,152). Yn wir, pan ddefnyddir yr egwyddor hon i ddatblygu nanoronnau aur, canfuwyd eu bod yn gallu croesi ar draws RGY drwy transcytosis, er bod ffactorau a ddylanwadodd yn fawr ar lwyddiant hyn (153). Canfu'r awduron, pe bai cynnwys y transferrin yn rhy isel, na fyddai'r NGau yn ymgysylltu â'r derbynnyddion, tra pe bai'n rhy uchel, na fyddent yn datgysylltu o'r derbynnydd ar ôl croesi rhwystr yr ymennydd gwaed.

1.6.5 Cargo NGau

Nodwedd ddeniadol o NGau yw eu gallu i cludo sawl math gwahanol o lwythi gyda'r bwriad o'u rhyddhau yn y safle targed ac yn y celloedd priodol. Yn dibynnu ar y math o driniaeth, fodd bynnag, gall fod yn well i'r gronynnau fod yn ddigon gwydn i oroesi o fewn y system endocytig. Er enghraifft, o fewn rhai therapïau ffotothermol neu ffotodynamig maent yn dibynnu ar groniad o NGau o fewn y celloedd targed fel bod yr effaith yn ddigon sylweddol i ladd y targed tra'n gadael celloedd cyfagos iach yn ddianaf (154,155). Cyflawnwyd y ddau ddull hyn ochr yn ochr gan ymchwilyr a ddefnyddiodd NGau aur. Fe wnaethant benderfynu ar gyfer yr agwedd ffotodynamig fod angen nifer ddigonol o NGau mewnol er mwyn gweithio tra bod gwres yn cael ei gynhyrchu ar gyfer ochr ffotothermol y driniaeth p'un a oedd y NGau wedi'u mewnnoli ai peidio (156).

Ni ellir rhoi rhai therapiwtegau fel mRNA, siRNA a rhai cyffuriau sensitif yn uniongyrchol i'r corff fel triniaethau gan y byddent yn cael eu diraddio cyn cyrraedd y safle gweithredu. Oherwydd hyn, mae angen dulliau dibynadwy o gludo nhw i'r safle

gweithredu a arweinir at ymchwilwyr i amgáu'r asiantau hyn o fewn NGau (157). Wrth i NGau amgáu'r cyfansoddion yn gyfan gwbl, maent yn amddiffyn y cyfansoddyn rhag y corff gan ganiatáu i rai cyffuriau gael hanner-oes llawer uwch nag y byddent fel arfer (158). Fodd bynnag, y cafeatau i hyn yw bod yn rhaid i'r cyfansoddion gael i eu ryddhau o'r NGau sydd wedi'u mewnnoli'n ddibynadwy er mwyn cael mynediad i'r celloedd. Bu nifer o wahanol ymdrechion i delio â'r ddau fater hyn. O'r ochr weithgynhyrchu, defnyddir microhylifau yn gyffredin gan y gallent leihau costau adweithyddion ac maent hefyd yn tueddu i fod yn fwy cyson o ran y NGau a gynhyrchir gan ganiatáu ar gyfer gweithgynhyrchu NGau ddibynadwy sy'n amgáu cyfansoddion drud neu werthfawr (159). Er mwyn sicrhau rhyddhad effeithlon mae NGau yn cael eu cynhyrchu'n aml o ddeunyddiau a fydd yn diraddio o fewn llwybr endocytig tra bod rhai yn mynd gam ychwanegol ac yn cyd-gapsiwleiddio cyffuriau amffiffilig cationig, megis cloroquine, i wella'r ffordd y mae'r cargo yn dianc o'r endosomau / lysosomau (160).

1.6.6 Nanogronnynnau mewn triniaeth canser y fron

Er y nifer fawr o lwyddiannau a welir yn ystod gwaith in vitro, mae hyn yn aml wedi trosi'n wael iawn wrth drosglwyddo i dreialon clinigol. Mae'r rhesymau dros y methiannau hyn yn amrywio er mai'r prif reswm yn aml yw methiant NGau i gyrraedd y lleoliad targed gan arwain at grynodiad therapiwtig annigonol yn y safle targed (161). Ar ben hyn mae cronni NGau yn yr iau yn cyflwyno pryderon gwenwyndra ychwanegol (162). Gyda'i gilydd mae'r heriau hyn a rhai ychwanegol yn creu tagfa sylweddol yn natblygiad therapiwteg seiliedig ar NGau sydd o ganlyniad wedi arwain at gymeradwyo llawer llai o

therapiwteg nag y byddai rhywun yn ei ddisgwyl. O fewn canser y fron yn benodol, mae 5 triniaeth wahanol wedi'u cymeradwyo i'w defnyddio rhwng yr FDA a'r EMA (163).

Y cyntaf o'r rhain oedd Doxil, a elwir hefyd yn Caelyx, sy'n doxorubicin liposomal sydd wedi pegyleiddo. Trwy amgáu'r doxorubicin mae'n cynnig manteision proffil diogelwch cyffredinol mwy ffafriol sy'n cynnwys, yn arbennig, llai o wenwyndra cardiofasgwlaidd o'i gymharu â doxorubicin yn unig (164). Er hyn, mae Doxil yn dal i gael ei ystyried yn gyffur gwenwynig gyda risg sylweddol o ddatblygu effeithiau andwyol fel mwcositis neu erythrodysesthesia palmar-plantar. Mae'n ymddangos bod y risg o ddatblygu'r sgîl-effeithiau hyn yn gysylltiedig yn uniongyrchol â'r gynlllyn driniaeth (165).

Mae Myocet yn sitrad doxorubicin liposomaidd, ac yn wahanol i Doxil nid yw wedi'i begyleiddio a thrwy ddefnyddio graddiant pH mae'n bosibl cyflawni lefelau uchel (>95%) o effeithiolrwydd amgáu cyffuriau (166). O'i gymharu â doxorubicin rhydd, canfuwyd bod Myocet yr un mor effeithiol tra'n cael ei oddef yn llawer gwell, ag yn bwysig iawn yn dangos gostyngiad mewn gwenwyndra cardiofasgwlaidd (167). Canfu treialon pellach a ddefnyddiodd cyclophosphamide mewn cyfuniad â naill ai Myocet neu epirubicin, deilliad mwy modern o doxorubicin, ar gyfer canser metastatig y fron. Yn y cyd destun yma roedd Myocet yn cynnig effeithiolrwydd doxorubicin tra'n bod mor ddiogel ag epirubicin (168).

Mae nanofeddyginiaethau ychwanegol sydd wedi cymeradwyo yn cynnwys Abraxane, a elwir hefyd yn nab-paclitaxel, a'i fiogyfwerth: Pazenir - mae'r ddau yn eu hanfod yn paclitaxel wedi'i rwymo gan albwmîn. Mae Paclitaxel rhydd yn asiant cemotherapiwtig cryf sy'n gweithredu fel atalydd mitosis oherwydd ei fod yn atal dad-polymereiddio microtiwbwlau, proses sy'n hanfodol ar gyfer cellraniad (169). Oherwydd y mecanwaith

gweithredu hwn mae'r paclitaxel a thacsanau eraill yn cael effaith amlycach ar gelloedd sydd yn ymrannu ar gyfradd uchel sy'n eu gwneud yn ddeniadol iawn yn ystod datblygiad clinigol gan ei fod yn rhoi rhywfaint o dargedu iddynt o gymharu â chemotherapiwteg eraill. (170). Un gwendid mawr mewn tacsanau o safbwynt therapiwtigol yw eu bod yn anhydawdd iawn mewn dŵr ac mae hyn yn cyfyngu'n fawr ar eu heffeithiolrwydd (171). Canfuwyd mai'r opsiwn mwyaf ffafriol ar y pryd er mwyn gwella faint o paclitaxel oedd wedi hydoddi, a felly caniatáu iddynt cael eu defnyddio fel triniaeth, oedd i ddefnyddio cymysgedd 1:1 o ethanol a Cremophor EL, deilliad sylfaen olew castor (172). Er bod hyn yn datrys y problemau hydoddedd, daeth â phryderon newydd o ran gwenwyndra, yn enwedig oherwydd y darganfuwyd bod yr Cremophor EL wedi newid proffil ffarmacocinetig y cyffuriau toddedig ac hefyd yn gysylltiedig ag effeithiau andwyol megis gorsensitifrwydd a niwropathi ymylol (173). Arweiniodd hyn at ymdrech i ddatblygu paratodau gwell ac o ganlyniad ddatblygir nab-paclitaxel. Er bod ganddo rai problemau gwenwyndra o hyd, canfuwyd bod nab-paclitaxel yn fwy effeithiol ac yn gyffredinol roedd ganddo broffil diogelwch mwy ffafriol na'r fformiwleiddiad Cremophor EL blaenorol (174).

Mae Genexol-PM yn nanotherapiwtig arall sy'n seiliedig ar baclitaxel a ddatblygwyd i ddyfeisio ffordd o ddosbarthu'r cyffur heb ddefnyddio cymysgedd toddyddion Cremophor EL. Yn hytrach na'r dull a ddefnyddir gan Abraxane, mae Genexol-PM yn defnyddio miseloedd mPEG-PDLLA i ddosbarthu paclitaxel yn ddiogel ac o'i gymharu â'r cyffur yn unig mae'n ymddangos ei fod yn cael ei oddef yn llawer gwell (175). Mewn treialon canser y fron a oedd yn edrych yn uniongyrchol ar effeithiolrwydd Genexol-PM yn erbyn paclitaxel yn unig, canfuwyd bod y nanotherapeutic yr un mor effeithiol, os nad yn fwy, na'r paclitaxel yn unig, tra hefyd yn cynnig proffil diogelwch gwell (176).

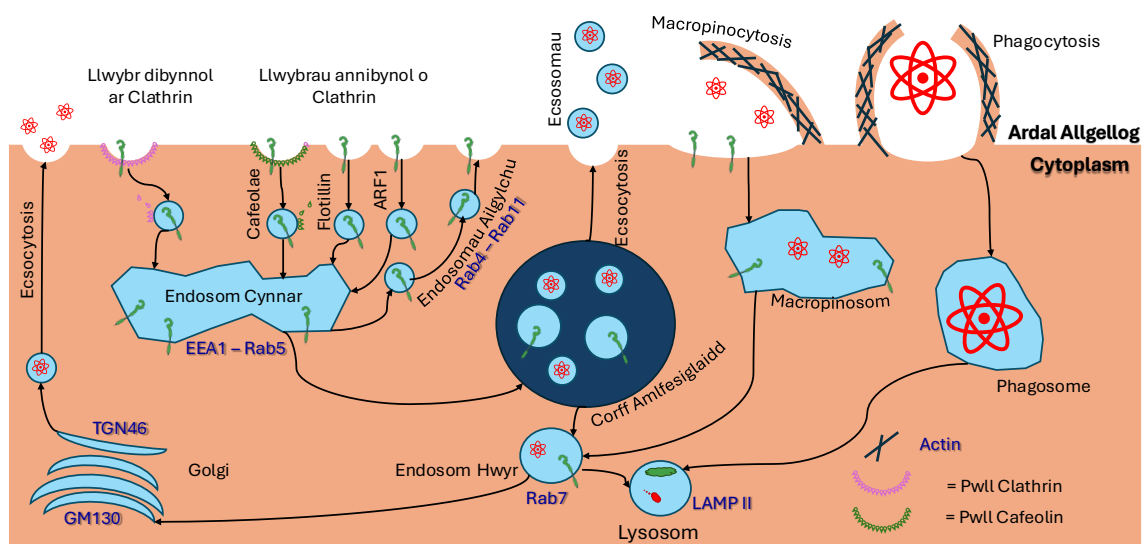
Sbardunwyd datblygiad pob un o'r triniaethau hyn gan yr angen i greu dulliau newydd i danfon therapiwteg fel y gellid gwella proffil diogelwch cyffuriau sy'n dangos gwenwynder sylweddol. Fodd bynnag, mae'r holl asiantau hyn yn dibynnu ar dargedu goddefol i gyrraedd y tiwmor, sy'n amlygu'r dagfa eithafol o ran datblygu nanotherapiwteg newydd a all ddefnyddio strategaethau targedu mwy datblygedig.

1.7 Endocytosis

Endocytosis yw'r broses o fewnoli hylif a hydoddion i'r gell . Mae sawl llwybr yn disgyn o dan y term endocytosis fel llwybr clathrin, caveolin, ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) dibynnol a hefyd macropinocytosis a phob un yn arwain at fewnoli cargo sydd wedi'i rwymo â'r philen blasma, neu gargo hylifol allgellog (177–181). Unwaith y byddant wedi'u mewnoli, cânt eu cludo mewn fesiglau i un o sawl pwynt terfyn gwahanol sy'n dibynnu yn bennaf ar y cargo a'r llwybr (182). Mae transferrin er enghraifft yn cael ei ailgylchu'n aml yn ôl i wyneb y gell unwaith y bydd yr haearn wedi dadgysylltu ohono (183). Llwybr cyffredin ar gyfer sawl math gwahanol o gargo yw bod y fesigl yn symud ymlaen i endosom cynnar sydd wedyn yn aeddfedu i endosom hwyr. Yn ystod yr aeddfediad hwn mae'r pH o fewn yr endosome yn gostwng yn sydyn i 5.5 (184). Yn y pen draw mae'r endosom yn asio â lysosom sydd yn ei hanfod yn fath o fesigl gyda pH isel iawn o'i gymharu â gweddill y gell ac sy'n cynnwys nifer o ensymau proteolytig gwahanol (185). Mae'r derbynnydd HER2 yn nodedig oherwydd cafodd ei adnabod fel derbynnydd sy'n gwrthsefyll mewnoli oherwydd ei ddycnwch i aros ar y gellbilen (186). Yn yr achos annhebygol y caiff y derbynnydd ei fewnoli caiff ei ailgylchu'n aml yn ôl i wyneb y gell (187). Mae hwn yn broblem gyda chanser y fron HER2+ oherwydd ni ellir lleihau mynegiant HER2 yn hawdd sydd o ganlyniad yn arwain at lefel uchel o signalau mewngellol. O ganlyniad i hyn mae'n argoeli'n ddeniadol i geisio datblygu system danfon cyffuriau a all ysgogi'r mewnoliad o HER2 cyn rhyddhau llwyth therapiwtig yn fewngellol.

1.7.1 Llwybrau Endocytig

Yn dibynnu ar y cynnwys sy'n cael ei fewnoli gan y gell mae yna wahanol llwybrau y maen nhw'n eu dilyn (Ffigur 1-9). Mae nifer o ffactorau yn rheoli pa lwybr a ddefnyddir, gyda maint a math y cargo sy'n cael ei fewnoli yn un o'r nifer enfawr ohonynt (182). Er bod yna sawl llwybr gwahanol y gellir eu defnyddio i amlyncu unrhyw beth o raddfa nano i ficro a thu hwnt, prif ffocws yr astudiaeth hon fydd endocytosis trwy'r llwybrau clathrin, cafeolin neu macropinocytosis.



Ffigur 1-9: Mae sawl llwybr wahanol o fewnoli cargo. Yn tecst glas mae rhai o'r proteinau sy'n ymwneud a'r strwythurau penodol. Mae EEA1 (Early Endosome antigen 1) a Rab5 (Rabankyrin 5) er enghraifft wedi cyfoethogi ar bilen yr endosomau cynnar. Fel mae rhain yn aeddfedu i droi'n endosomau hwyr a wedyn lysosomau gwelir newid mewn protein ar draws y fesigl i weld cyfoethogiad o Rab7 (Rabankyrin7) a wedyn LAMP II (Lysosomal associated membrane protein II) i adlewyrchu'r newid mewn pwrpas y fesigl a sut mae angen wahanol proteinau i cwblhau hyn. Osy w fesiglau yn cael eu dosbarthu i'r Golgi maent yn uno gyda'r cis-Golgi, sydd wedi cyfoethi gyda GM130, tra bod fesiglau sy'n gadael yr Golgi o'r trans-Golgi sy'n gyfoethog mewn TGN46 (Trans-Golgi Network 46). I rhai fesiglau ar y llaw arall maent yn cael eu ailgylchu o'r endosomau cynnar gyda'r myengiant o Rab4 neu Rab11 yn dynodi os yw'r fesiglau yn cael eu ailgylchu'n sydyn neu yn araf. Drwy'r defnydd o technegau immiwnoffloroleuedd mae'n bosib cymeryd mantais o cyfoethogiad o'r proteinau hyn i amlygu'r strwythurau wahanol tu mewn i'r gell.

1.7.2 Endocytosis Clathrin-ddibynol

Mae DCTs fel HER2 fel arfer yn cael eu mewnnoli ar ôl actifadaeth derbynyddion oherwydd ar gyfer y grwpiau hyn o dderbynyddion mae endocytosis yn gweithredu fel cam rheoleiddio i atal signalau parhaus o'r bilen plasma (188). Yn ystod mewnnoliad ACT mae clathrin yn polymeru o dan y bilen wrth iddo ymwthio i mewn gan ffurfio poced endocytig y cyfeirir ato fel Pant Araen Clathrin (PAC). Gall y pyllau hyn fod hyd at 200nm o ran maint ac wrth i'w hagoriad gulhau, caiff deinamin ei recriwtio i hollti'r PAC oddi wrth weddill y bilen plasma gan greu fesigl wedi'i orchuddio â chlathrin (189). Yna mae'r clathrin yn dadgysylltu o'r fesigl hwn wrth iddo aeddfedu i ffurfio'r endosom cynnar yn dilyn ei gydgyssylltiad â Rab5 ac EEA1 (190).

O'r fan hon mae o leiaf dair dynged wahanol i gynnwys yr endosom cynnar - ailgylchu yn ôl i wyneb y gell, danfon i'r Golgi i'w brosesu ymhellach neu ei gludo i'r lysosomau ar gyfer diraddio (191). Gall ailgylchu fod yn broses araf neu gyflym yn dibynnu ar y proteinau dan sylw. Mae cydgysylltiad â Rab4 wedi'i weld mewn endosomau ailgylchu sy'n gwneud eu ffordd yn ôl yn gyflym i arwyneb y gell tra bod cydgysylltiad â Rab11 i'w weld yn yr endosomau ailgylchu araf (192).

Os yw endosom cynnar i gael ei ddiraddio fodd bynnag mae'n colli ei gysylltiad â Rab5 ac yn hytrach yn dod yn gydgysylltiedig â Rab7 gyda'r newid hwn yn digwydd wrth i'r endosom aeddfedu'n endosom hwyr. (193). Yn ystod yr aeddfediad hwn mae'r pH yn disgyn ac mae endosomau hwyr lluosog yn gallu ymdoddi â'i gilydd i ffurfio cyrff fesigl lluosol lle gellir cynnwys sawl fesigl llai o fewn yr endosom (194). Ma'r rhain yn gallu symud at a hydoddi â'r bilen blasma i ryddhau endosomau (195). Gall endosomau hwyr ymdoddi â lysosomau sy'n dod â'r llwybr diraddio i ben gan fod yr organelau hyn

yn cynnwys nifer o ensymau hydrolytig ac mae ganddynt pH isel er mwyn bod yn gallu treulio ystod eang o gargo (196). Ma'e bwysig nodi for ensymau hydrolytic hefyd yn bodoli mewn endosomau cynnar a hwyr a cred rhai fod y pH yn is mewn endosomau hwyr o'i gymharu â lysosomau (197–199).

1.7.3 Endocytosis Annibynnol o Clathrin

Tu allan i'r llwybrau sy'n dibynnu ar clathrin mae sawl llwybr heb clathrin, y mae rhai ohonynt hefyd yn dibynnu ar deinamin (Ffigur 1.7) (200).

Un o'r rhain yw llwybr endocytosis caveolin. Mae caveolae yn amlygu ei hunain ar rafftiau lipid arbenigol sy'n ffurfio ymweiniadau maint 50-100nm o'r bilen plasma sy'n ymwneud yn gryf â signalau celloedd a chludo fesiglau (201). Tra mewn PACs mae clathrin yn addurno'r ymweiniad. Mae caveolae yn cael eu addurno gan unai broteinau Cav-1 neu Cav-3 yn bennaf yn dibynnu ar y math o gell, er bod y ddau llwybr angen deinamin i wahanu'r fesigl o'r bilen (202). Unwaith y bydd wedi hollti o'r bilen mae'r caveolin yn dadgysylltu ac yn cael ei ddisodli gan Rab5 ac EEA1 (*Early Endosome Antigen 1*) wrth iddo fynd rhagddo ar gyfer ailgylchu neu ddiraddio (203).

Y prif lwybr endocytig annibynnol o deinamin mewn o safbwynt mewnoli NGau yw macropinocytosis (204). Mae'r broses hon yn digwydd pan fydd allwthiadau pilen plasma llawn actin neu ryfflau yn plygu i mewn ar eu hunain gan ddal hylif allgellog / cargo yn y broses (205). Mae'r cargo caeth hwn yn ffurfio macropinosomau sydd wedyn yn asio ag endosomau cynnar ar gyfer didoli a cludo ymhellach (206).

1.8 Endocytosis NGau

Er mwyn gwneud siwr fod y NGau yn gallu danfon eu cargo therapiwtig, mae'n hanfodol eu bod yn cael eu mewnosod yn effeithlon i wneud y mwyaf o'r crynodiad cronedig o fewn y gell. Er mwyn sicrhau hyn, mae'n hanfodol deall y llwybrau endocytig manwl gywir fel y gellir optimeiddio dyluniad NGau i fanteisio, yn enwedig wrth ystyried sut mae llai nag 1% o ddos a weinyddir yn cyrraedd y tiwmorau(207). Bu ymdrechion i geisio defnyddio dulliau ffarmacolegol i rwystro llwybrau endocytig penodol ac yn eu tro dadansoddi sut mae'r lleill yn cael eu heffeithio (208). Y broblem gyda hyn, fodd bynnag, yw, fel y gwelir yn yr astudiaeth, bod atal ffarmacolegol y llwybrau hyn yn broses annibynadwy yn y bôn, gyda'r cyffuriau a ddefnyddir yn brin o benodolrwydd a chyda sgîl-ffeithiau annisgwyl ac anesboniadwy i'w gweld ar y llwybrau heb eu targedu (208). Mae dull mwy manwl yn cynnwys defnyddio llinellau celloedd cnoc-allt genetig sy'n methu â defnyddio llwybrau penodol gyda'r hyder na fyddant yn effeithio ar y llwybrau eraill (209–211).

Mae'r priodweddau ffisegol delfrydol o ran mewnosod NGau yn amrywio, er ei fod yn cael ei ystyried yn gyffredinol, o ran maint, fod ystod ddelfrydol lle mae mewnosod yn fwyaf effeithlon (212,213). Ar gyfer siâp NGau, ar y llaw arall, mae credoau gwrthgyferbyniol ynghylch a yw NGau sfferig neu ansfferig yn cael eu mewnosod orau, er y dylid nodi nad yw'r gymhariaeth rhwng siapiau yn hollol deg o fewn yr astudiaethau hyn, gyda gwahanol ddimensiynau a chemegau arwyneb yn cymylu'r darlun ehangach (214,215).

O ran mewnoli uniongyrchol yr NGau eu hunain, awgrymwyd bod sawl llwybr endocytig gwahanol yn gysylltiedig â'r llwybr penodol a ddefnyddir yn dibynnu ar briodweddau'r

gronyn ei hun. Mae ffagocytosis, er enghraifft, yn gysylltiedig â amsugno gronynnau mwy, yn enwedig os bydd gronynnau'n crynhoi neu os cânt eu swyddogaetholi ag gwrthgyrff, gan alluogi adnabod cynffon Fc (216). Fodd bynnag, mae'n werth nodi bod ffagocytosis wedi'i gysylltu â mewnnoliad o NGau sy'n llai na 200nm (217,218). O ran NGau nad ydynt yn dargedu, credir yn gyffredinol bod maint y gronynnau'n rheoli'r llwybr y cânt eu mewnosod drwyddo gan fod gan wahanol lwybrau endocytig gyfyngiadau maint gwahanol (219). O ran nanoronnau wedi'u targedu, credir y gellir eu mewnosod drwy endocytosis a gyfryngir gan dderbynnnydd er unwaith eto bod hyn yn cael ei reoli gan faint y gronynnau (220). Yn annibynnol ar rwyddo derbynnnyddion, adroddwyd bod NGau yn defnyddio PACs wedi'u ffurfio ymlaen llaw i fynd i mewn i'r gell. (221). O ran endocytosis a gyfryngir gan cafeolin, mae'n anodd amcangyfrif ei arwyddocâd mewn mewnosod nanoronnau, yn enwedig sut y gellir ei gamgymryd am lwybrau eraill a bod celloedd sy'n ddiffygiol yn y math hwn o endocytosis yn parhau i fod yn gallu amsugno NGau (200). Mae macropinocytosis hefyd wedi'i gysylltu'n gryf â mewnosod NGau. Yn ystod macropinocytosis mae allwthiadau pilen mawr yn amlyncu amrywiaeth fawr o ddeunydd allgellog ac oherwydd maint yr allwthiadau hyn, adroddwyd ei fod yn gweithredu fel llwybr mewnnoli pwysig ar gyfer NGau (222,223). Rhaid nodi, fodd bynnag, ei fod wedi'i adrodd y gellir mewnosod NGau yn llawer cyflymach nag a ddisgwylir o ystyried eu maint a'i fod wedi'i arsylwi eu bod yn aml yn cael eu hailgylchu yn ôl i wyneb y gell o fewn eiliadau ar ôl cael eu mewnosod (224).

Fodd bynnag, mae cred, er gwaethaf yr ymchwil i ryngweithiadau mewnosod NGau, fod pwysigrwydd llwybrau penodol fel cafeolin a macropinocytosis yn cael eu goramcangyfrif a bod ffagocytosis yn cael ei amcangyfrif yn rhy isel (225). Yn wir, mae rhai adolygiadau'n gwrthod ei gwmpasu gan gredu ei fod "prin yn cael ei ddefnyddio" fel

mecanwaith ar gyfer amsugno NGau (226). Bu ymdrechion i ddatblygu modelau gwell i astudio NGau a'u dynameg, un ffordd o gyflawni hyn fu defnyddio embryonau pysgod sebra. Oherwydd nifer o nodweddion dymunol o safbwynt delweddu, megis maint bach a thryloywder, gellir eu defnyddio i gynnal microsgopeg fflwroleuol fyw o fewn organeb fertebrat (227). Gall hyn ganiatáu archwilio dosbarthiad, effeithiolrwydd a goddefgarwch NGau ar draws ystod eang o wahanol fodelau clefydau(228,229).

1.8.1 Endocytosis HER2

Mae'r derbynnydd HER2 yn unigryw ymhlith gweddill y teulu erbB gan ei fod yn llawer mwy ymwrthol i fewnoli, nodwedd y mae'n ei roi i'r lleill wrth ffurfio heterodimerau sy'n arwain at signalu hirfaith (230). Mae nifer o ffactorau sy'n cyfrannu at ddyfalbarhad HER2 ar y bilen plasma. Yn gyntaf, mae yna dystiolaeth sy'n awgrymu y gall mynegiant HER2 uchel atal ffurfio PACs ar y bilen plasma (231). Yn ogystal, mae gan Barth cytoplasmig HER2 signal sy'n hyrwyddo ei fod yn ei gadw ar y bilen plasma (232). Os caiff ei fewnoli, yn aml mae'r derbynnydd yn cael ei ailgylchu'n gyflym yn ôl i wyneb y gell yn barod i bylu gyda phartner rhwymol newydd (233). Mae hyn i gyd yn arwain at weithgaredd hirdymor ar y bilen plasma a chynnydd cyffredinol mewn signalau mewngellol.

Mae hyn yn cyflwyno heriau therapiwtig gan y gall y signalau parhaus gynorthwyo'r gell i oroesi ymdrechion i'w dinistrio. Yn wir, yn ddiweddar mae wedi'i sefydlu, trwy atal RCP, rheolydd allweddol Ailgylchu endosomal, ei fod yn arwain at effaith synergaid yn cael ei chynhyrchu gyda thriniaethau targedu HER2 gyda hyn yn cynnwys adfer sensitifrwydd lapatinib mewn celloedd a oedd yn gwrthsefyll yn flaenorol (234). Er gwaethaf yr

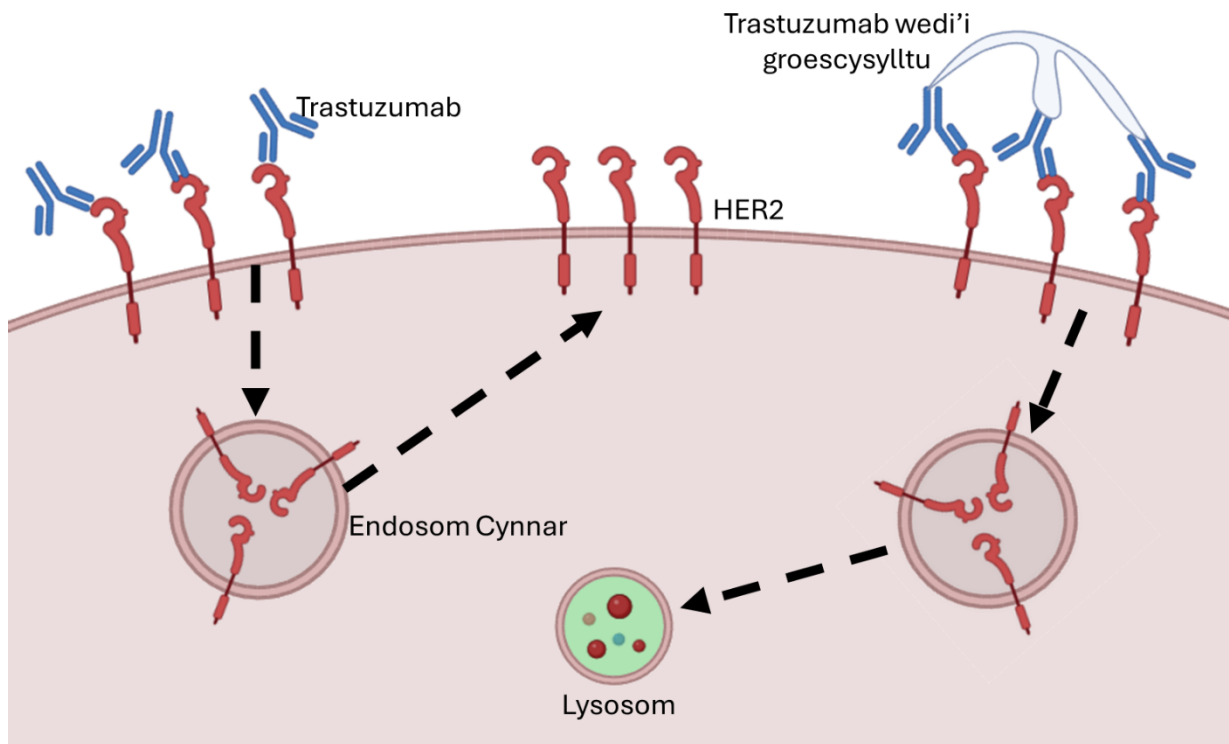
ymwrthedd uchod i endocytosis, fodd bynnag, mae sawl NGau gwahanol wedi bod yn llwyddiannus wrth dargedu canser HER2+ (Tabl 1-2). Mae'n amlwg, er gwaethaf y dystiolaeth bod HER2 yn gwrthsefyll endocytosis, bod modd mewnosod nanofeddyginiaethau sy'n targedu HER2 yn effeithlon.

Tabl 1-2: Crynodeb o rhai o'r ymdrechion sy'n defnyddio NGau i targedu canser HER2+

Nanoronnau	Maint (nm)	Effaith	Ffynhonnell
Aur-Tz	11.7	Effeithiol am lladd celloedd gyda ymbelydredd. Rhai sydd wedi addurno gyda Tz fwy tocsig	(235)
Nanorodau aur wedi addurno gyda Tz	40 x 10	Wedi'i ddefnyddio'n llwyddiannus i ddarparu therapi ffotothermol i leihau tiwmorau llygod	(236)
PLGA/PEI/lipid wedi addurno gyda Tz	217	Gallu danfon docletaxel i celloedd HER2+ yn dewisol	(237)
PLGA wedi addurno gyda Tz	126	NGau wedi addurno gyda Tz yn fwy tocsig na rhai heb	(238)
Liposomau wedi addurno gyda Tz	140	Danfon oxaliplatin yn fwy llwyddiannus na NGau heb Tz	(239)
Polymerau HPMA wedi cyfuno gyda peptid gwrth-HER2	10	Croesgysylltu HER2 yn arwain at fwy o paclitaxel yn cael ei fewnoli gan y gell	(240)
PLGA wedi addurno gyda peptid gwrth-HER2	198	Wedi cario'r llifyn rose bengal i celloedd canser HER2 er mwyn cynnal triniaeth ffotodynamig llwyddiannus	(241)
NGau silica wedi addurno gyda Tz	106	Danfon docletaxel yn llwyddiannus i tiwmorau llygod	(242)
PLGA wedi addurno gyda Tz	227	Danfon dau lifyn i tiwmorau llygod er mwyn cynnal triniaeth ffotodynamig a ffotothermig	(243)
PLGA wedi addurno gyda protein sy'n bachu i peptid gwrth HER2	206	Danfon llifyn a doxorubicin i tiwmorau llygod yn llwyddiannus	(244)

1.8.2 Clystyru Derbynnydd

Mae'n debygol iawn mai'r rheswm pam roedd yr NGau addurnedig hyn yn gallu targedu canser y fron HER+ yn ddibynadwy, ac yn amlach na pheidio perfformio'n well na NGau heb eu haddurno, yw eu bod yn hwyluso croesgysylltu HER2. Cafodd ei sefydlu degawdau yn ôl bod y dull yma yn arwain tuag at mewnnoli fwy effeithlon o derbynnyddion, yn cynnwys HER2 (245,246). Ers hynny drwy ddefnyddio Tz oedd wedi biotinyleiddio ochr yn ochr a streptavidin cafodd ei sefydlu gellir groesgysylltu'r derbynnydd HER2 ar wyneb y gell a'i ysgogi i cael ei fewnnoli i'r lysosomau (Ffigur 1-10) (247,248). Ar ôl croesgysylltu, cadarnhawyd gyda delweddu microsgop electron sganio (MES) presenoldeb chrychni pilen plasma eithafol sydd, yn ein barn ni, yn ysgogi mewnnoliad y derbynnydd. Mae hyn oherwydd pan fydd y crychni yn cwmpo, credir eu bod yn gyrru mewnnoliad y derbynnyddion sydd wedi croesgysylltu. Ynglŷn â'r derbynnydd HER2 yn yr arbrofion hyn unwaith mewnnoliwyd y Tz, cafodd ei gludo wedyn i'r lysosomau i'w ddiraddio - gydag arbrofion blotio Western yn cadarnhau lleihad mewn mynegiant HER2 yn dilyn triniaeth. Yn anffodus, ni ellir defnyddio'r dyluniad hwn yn y clinig, felly mae angen platfform gwahanol i ailadrodd yr effaith hon sydd wedi ein harwain i ddatblygu nanoronynnau PLGA addurnedig Tz .

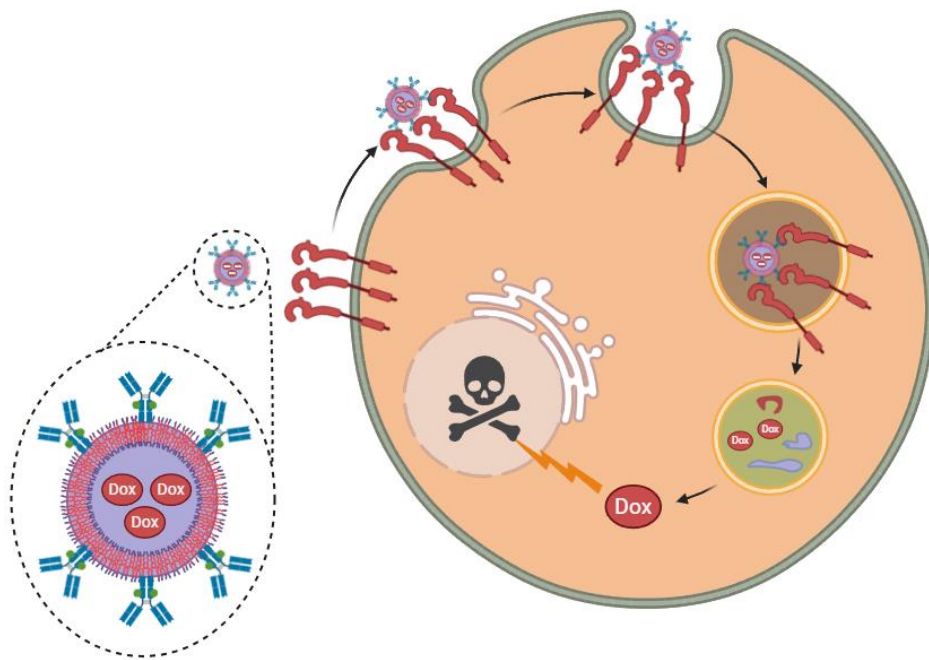


Ffigur 1-10: Mae croesgysylltu HER2 yn arwain at y derbynnydd cael ei fewnoli i'r lysosomau.

1.9 Nôd ac Amcanion

- Croesgysylltu HER2 ar draws y bilen plasma gyda NGau PLGA-Tz a'i orfodi mewn i'r lysosomau
 - Archwilio cydleoliad dextran efo ein NGau i sicrhau fod nhw'n cyrraedd y lysosomau
 - Mesur yr effaith ar mynegiant HER2
- Delweddu'r ryfflau sy'n cael ei ffurfio o ganlyniad i triniaeth PLGA-Tz
 - Defnyddio technegau MES i archwilio strwythur a siâp y ryfflau
 - Datblygu technegau cydffocal i delweddu ffurfiant yr ryfflau
- Defnyddio NGau PLGA-Dox i cludo Doxorubicin i celloedd HER2+ (Ffigur 1-11)
 - Ceisio sefydlu os mae addurno NGau gyda Tz yn rhoi gwenwyndra penodol iddynt yn erbyn celloedd HER2+
- Edrych os mae addasu nifer y Tz ar draws y NGau yn cael effaith ar eu gwenwyndra yn erbyn ein modelau celloedd HER2+

Er fydd y NGau PLGA-Tz eu hunain ddim yn unigryw gan fod yr dull yma mor boblogaidd mae'n bwysig edrych ar y rhyngweithiad rhwng ein NGau a ein celloedd, eu bilenni plasma'n benodol. Fel trafodwyd uchod (Tabl 1-2) mae sawl grŵp wedi edrych ar defnyddio NGau i danfon cyffuriau cemotherapi i boblogaeth penodol o celloedd, yn cynnwys rhai HER2+. Yn gyffredinol mae'r astudiaethau yma i gyd hefo tueddiad i edrych ar ymateb y celloedd i'r NGau ar ôl amser hir o driniaeth ac yn esgeuluso gwneud ymchwil i fewn i beth sy'n digwydd yn y momentau cynnar iawn ar ôl triniaeth. Felly er fod y NGau eu hunain yn yr traethawd yma ddim yn rhai unigryw y bwriad yw fod y gwaith sy'n astudio'r rhyngweithiadau cynnar rhwng y NGau a'r celloedd yn cynnig safbwynt newydd gyda'r obaith o dangos pwysigrwydd ymchwil i'r amserodd cynnar yma.



Ffigur 1-11: Rydym yn damcaniaethu y gallwn ddefnyddio PLGA-Dox-TZ NGau NGau i groesgysylltu'r derbynnnydd HER2 ar yr wyneb a thrwy hynny ysgogi mewnoliad y cymhleth NGau -HER2 a masnachu mewn pobl ymhellach i'r lysosomau. Unwaith y byddant yn y lysosomau bydd y NGau NGau yn diraddio gan ryddhau'r doxorubicin i a fydd wedyn yn lladd y gell

1.10 Ffynonellau

1. Cancer WHO. [cited 2025 Jan 22]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Torgovnick A, Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet.* 2015 Apr 23;6:157.
3. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis.* 2004 May;19(3):169–85.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review.
5. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017 June;58(5):235–63.
6. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer.* 2013 Feb;108(3):479–85.
7. Zhang S, Xiao X, Yi Y, Wang X, Zhu L, Shen Y, et al. Tumor initiation and early tumorigenesis: molecular mechanisms and interventional targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2024 June 19;9(1):1–36.
8. Nisticò P, Bissell MJ, Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 Feb 1;4(2):a011908.
9. Ribatti D, Tamma R, Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol.* 2020 Apr 22;13(6):100773.
10. Liang Y, Zhang H, Song X, Yang Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* 2020 Feb 1;60:14–27.
11. Watase C, Shiino S, Shimoi T, Noguchi E, Kaneda T, Yamamoto Y, et al. Breast Cancer Brain Metastasis—Overview of Disease State, Treatment Options and Future Perspectives. *Cancers.* 2021 Mar 3;13(5):1078.
12. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15(2):117–34.
13. Gao Y, Bado I, Wang H, Zhang W, Rosen JM, Zhang XHF. Metastasis organotropism: redefining the congenial soil. *Dev Cell.* 2019 May 6;49(3):375–91.
14. Greten FR, Grivnickov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms and Consequences. *Immunity.* 2019 July 16;51(1):27–41.
15. Zhao H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 July 12;6(1):1–46.
16. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer.* 2019 May 14;10(9):2109–27.

17. Li S, Silvestri V, Leslie G, Rebbeck TR, Neuhausen SL, Hopper JL, et al. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. *J Clin Oncol*. 2022 May 10;40(14):1529–41.
18. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017 June 20;317(23):2402–16.
19. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008 Jan 1;122(1):155–64.
20. Rehm J, Shield KD, Weiderpass E. Alcohol consumption. A leading risk factor for cancer. *Chem Biol Interact*. 2020 Nov 1;331:109280.
21. Havas A, Yin S, Adams PD. The role of aging in cancer. *Mol Oncol*. 2022 Sept;16(18):3213–9.
22. Ahmad AS, Ormiston-Smith N, Sasieni PD. Trends in the lifetime risk of developing cancer in Great Britain: comparison of risk for those born from 1930 to 1960. *Br J Cancer*. 2015 Mar 3;112(5):943–7.
23. Public Health Wales [Internet]. [cited 2025 Sept 16]. Cancer Reporting Tool - Official Statistics. Available from: <https://phw.nhs.wales/services-and-teams/welsh-cancer-intelligence-and-surveillance-unit-wcisu/cancer-reporting-tool-official-statistics/>
24. Risk factors for breast cancer [Internet]. [cited 2025 Jan 27]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/risks-causes/risk-factors>
25. Yue W, Wang JP, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, et al. Effects of estrogen on breast cancer development: role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2010 Oct 15;127(8):1748–57.
26. Marino P, Mininni M, Deiana G, Marino G, Divella R, Bochicchio I, et al. Healthy Lifestyle and Cancer Risk: Modifiable Risk Factors to Prevent Cancer. *Nutrients*. 2024 Mar 11;16(6):800.
27. Kawai M, Malone KE, Tang MTC, Li CI. Height, BMI, BMI change and the risk of estrogen receptor positive, HER2 positive and triple-negative breast cancer among women ages 20 to 44 years. *Cancer*. 2014 May 15;120(10):1548–56.
28. Brown KF, Rumgay H, Dunlop C, Ryan M, Quartly F, Cox A, et al. The fraction of cancer attributable to modifiable risk factors in England, Wales, Scotland, Northern Ireland, and the United Kingdom in 2015. *Br J Cancer*. 2018 Apr 17;118(8):1130–41.
29. Varol U, Kucukzeybek Y, Alacacioglu A, Somali I, Altun Z, Aktas S, et al. BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *J BUON Off J Balk Union Oncol*. 2018;23(4):862–6.
30. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug;406(6797):747–52.
31. Johnson KS, Conant EF, Soo MS. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. *J Breast Imaging*. 2021 Jan 26;3(1):12–24.

32. Gao JJ, Swain SM. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *The Oncologist*. 2018 Feb 22;23(5):556.
33. Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M, et al. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. *BMC Res Notes*. 2012;5:376.
34. Tran B, Bedard PL. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Res BCR*. 2011;13(6):221.
35. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, De Azambuja E, et al. Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *J Clin Oncol*. 2014 Sept 1;32(25):2794–803.
36. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract*. 2012;2012(1):743193.
37. Howlader N, Cronin KA, Kurian AW, Andridge R. Differences in Breast Cancer Survival by Molecular Subtypes in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018 June 1;27(6):619–26.
38. Dass SA, Tan KL, Selva Rajan R, Mokhtar NF, Mohd Adzmi ER, Wan Abdul Rahman WF, et al. Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina (Mex)*. 2021 Jan 12;57(1):62.
39. Ismail-Khan R, Bui MM. A Review of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Control*. 2010 July 1;17(3):173–6.
40. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *J Urol*. 2010 Feb;183(2):433–40.
41. Borgmann H, Musquera M, Haferkamp A, Vilaseca A, Klatte T, Shariat SF, et al. Prognostic significance of Fuhrman grade and age for cancer-specific and overall survival in patients with papillary renal cell carcinoma: results of an international multi-institutional study on 2189 patients. *World J Urol*. 2017 Dec;35(12):1891–7.
42. Tio TL. The TNM staging system. *Gastrointest Endosc*. 1996 Feb;43(2 Pt 2):S19-24.
43. TNM staging for breast cancer [Internet]. [cited 2025 Feb 24]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/stages-grades/tnm-staging>
44. Mishra R, Patel H, Alanazi S, Yuan L, Garrett JT. HER3 signaling and targeted therapy in cancer. *Oncol Rev*. 2018 Jan 30;12(1):355.
45. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*. 2009 July;9(7):463–75.
46. Choi B, Cha M, Eun GS, Lee DH, Lee S, Ehsan M, et al. Single-molecule functional anatomy of endogenous HER2-HER3 heterodimers. *eLife*. 9:e53934.
47. Cheng X. A Comprehensive Review of HER2 in Cancer Biology and Therapeutics. *Genes*. 2024 July 11;15(7):903.

48. Pegram M, Jackisch C, Johnston SRD. Estrogen/HER2 receptor crosstalk in breast cancer: combination therapies to improve outcomes for patients with hormone receptor-positive/HER2-positive breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2023 May 31;9(1):45.
49. Wang P, Mak VCY, Cheung LWT. Drugging IGF-1R in cancer: New insights and emerging opportunities. *Genes Dis*. 2022 Mar 23;10(1):199–211.
50. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*. 2017 May 17;9(5):52.
51. Mercogliano MF, Bruni S, Elizalde PV, Schillaci R. Tumor Necrosis Factor α Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer. *Front Oncol*. 2020 Apr 22;10:584.
52. Perrier A, Gligorov J, Lefèvre G, Boissan M. The extracellular domain of Her2 in serum as a biomarker of breast cancer. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2018 June;98(6):696–707.
53. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984 Dec 6;312(5994):513–6.
54. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
55. Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001;61 Suppl 2:1–13.
56. Maruyama IN. Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells*. 2014 Apr 22;3(2):304–30.
57. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 2014 Jan;79:34–74.
58. Sanabria-Figueroa E, Donnelly SM, Foy KC, Buss MC, Castellino RC, Paplomata E, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor signaling increases the invasive potential of human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer cells via Src-focal adhesion kinase and forkhead box protein M1. *Mol Pharmacol*. 2015 Feb;87(2):150–61.
59. Hsu JL, Hung MC. The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2016 Dec;35(4):575–88.
60. Landgraf R. HER2 therapy. HER2 (ERBB2): functional diversity from structurally conserved building blocks. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):202.
61. Veeraraghavan J, De Angelis C, Gutierrez C, Liao FT, Sabotta C, Rimawi MF, et al. HER2-Positive Breast Cancer Treatment and Resistance. In: Sørli T, Clarke RB, editors. *A Guide to Breast Cancer Research: From Cellular Heterogeneity and Molecular Mechanisms to Therapy* [Internet]. Cham: Springer Nature Switzerland; 2025 [cited 2025 Sept 16]. p. 495–525. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-031-70875-6_24
62. He X, Ji J, Qdaisat A, Esteva FJ, Yeung SCJ. Long-term overall survival of patients who undergo breast-conserving therapy or mastectomy for early operable HER2-Positive breast cancer after preoperative systemic therapy: an observational cohort study. *Lancet Reg Health - Am*. 2024 Mar 8;32:100712.

63. Esteva FJ, Katz E. Tailoring Neoadjuvant Therapy in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Early Breast Cancer: Recent Advances and Strategies. *JCO Oncol Pract*. 2024 Aug;20(8):1046–54.
64. Wuerstlein R, Harbeck N. Neoadjuvant Therapy for HER2-positive Breast Cancer. *Rev Recent Clin Trials*. 2017;12(2):81–92.
65. Harbeck N. Neoadjuvant and adjuvant treatment of patients with HER2-positive early breast cancer. *Breast Off J Eur Soc Mastology*. 2022 Jan 19;62(Suppl 1):S12–6.
66. Englander K, Chintapally N, Gallagher J, Elleson K, Sun W, Whiting J, et al. Factors Influencing Lymph Node Positivity in HER2/neu+ Breast Cancer Patients. *Curr Oncol*. 2023 Feb 27;30(3):2825–33.
67. Zoli W, Ricotti L, Barzanti F, Dal Susino M, Frassinetti GL, Milandri C, et al. Schedule-dependent interaction of doxorubicin, paclitaxel and gemcitabine in human breast cancer cell lines. *Int J Cancer*. 1999 Jan 29;80(3):413–6.
68. Peddi PF, Hurvitz SA. Trastuzumab emtansine: the first targeted chemotherapy for treatment of breast cancer. *Future Oncol Lond Engl*. 2013 Mar;9(3):319–26.
69. Perez EA. Doxorubicin and paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer: efficacy and cardiac considerations. *Cancer Invest*. 2001;19(2):155–64.
70. Mohammed-Rashid SS, Dyary HO. Effect of Catechin on Hepatotoxicity Induced by Combined Doxorubicin and Paclitaxel Treatment. *J Toxicol*. 2025;2025:6775839.
71. Pearce A, Haas M, Viney R, Pearson SA, Haywood P, Brown C, et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PloS One*. 2017;12(10):e0184360.
72. Cho H, Lee S, Sim SH, Park IH, Lee KS, Kwak MH, et al. Cumulative incidence of chemotherapy-induced cardiotoxicity during a 2-year follow-up period in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2020 July;182(2):333–43.
73. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16(25):3267–85.
74. Lee JH, Mosher EP, Lee YS, Bumpus NN, Berger JM. Control of topoisomerase II activity and chemotherapeutic inhibition by TCA cycle metabolites. *Cell Chem Biol*. 2022 Mar 17;29(3):476–489.e6.
75. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999 Apr 1;57(7):727–41.
76. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther*. 1990;47(2):219–31.
77. Liu J, Zhao Z, Qiu N, Zhou Q, Wang G, Jiang H, et al. Co-delivery of IOX1 and doxorubicin for antibody-independent cancer chemo-immunotherapy. *Nat Commun*. 2021 Apr 23;12(1):2425.

78. Wortman JE, Lucas VS, Schuster E, Thiele D, Logue GL. Sudden death during doxorubicin administration. *Cancer*. 1979 Nov;44(5):1588–91.
79. Chambers SK, Chopyk RL, Chambers JT, Schwartz PE, Duffy TP. Development of leukemia after doxorubicin and cisplatin treatment for ovarian cancer. *Cancer*. 1989;64(12):2459–61.
80. Diamandidou E, Buzdar AU, Smith TL, Frye D, Witjaksono M, Hortobagyi GN. Treatment-related leukemia in breast cancer patients treated with fluorouracil-doxorubicin-cyclophosphamide combination adjuvant chemotherapy: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *J Clin Oncol*. 1996 Oct;14(10):2722–30.
81. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1630–9.
82. Opdam FL, Guchelaar HJ, Beijnen JH, Schellens JHM. Lapatinib for Advanced or Metastatic Breast Cancer. *The Oncologist*. 2012 Apr;17(4):536–42.
83. D’Amato V, Raimondo L, Formisano L, Giuliano M, De Placido S, Rosa R, et al. Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2015 Dec;41(10):877–83.
84. Wissner A, Mansour TS. The development of HKI-272 and related compounds for the treatment of cancer. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2008 Aug;341(8):465–77.
85. Ma F, Li Q, Chen S, Zhu W, Fan Y, Wang J, et al. Phase I Study and Biomarker Analysis of Pyrotinib, a Novel Irreversible Pan-ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Sept 20;35(27):3105–12.
86. Baselga J. Clinical trials of Herceptin(trastuzumab). *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2001 Jan;37 Suppl 1:S18-24.
87. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783–92.
88. Ahmad S, Gupta S, Kumar R, Varshney GC, Raghava GPS. Herceptin Resistance Database for Understanding Mechanism of Resistance in Breast Cancer Patients. *Sci Rep*. 2014 Mar 27;4(1):4483.
89. O’Sullivan CC, Swain SM. Pertuzumab: evolving therapeutic strategies in the management of HER2-overexpressing breast cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2013 May 1;13(5):779–90.
90. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007 July 5;357(1):39–51.
91. Maadi H, Nami B, Tong J, Li G, Wang Z. The effects of trastuzumab on HER2-mediated cell signaling in CHO cells expressing human HER2. *BMC Cancer*. 2018 Mar 1;18(1):238.
92. Petricevic B, Laengle J, Singer J, Sachet M, Fazekas J, Steger G, et al. Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same

- extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *J Transl Med*. 2013 Dec 12;11:307.
93. Eiermann W, International Herceptin Study Group. Trastuzumab combined with chemotherapy for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trial data. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2001;12 Suppl 1:S57-62.
 94. Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, Ramsey EE, Holmes R, Keenan EJ, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5123–9.
 95. Tsé C, Gauchez AS, Jacot W, Lamy PJ. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012 Apr;38(2):133–42.
 96. Gutierrez C, Schiff R. HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jan;135(1):55–62.
 97. Khoury T, Mojica W, Hicks D, Starostik P, Ademuyiwa F, Janarthanan B, et al. ERBB2 juxtamembrane domain (trastuzumab binding site) gene mutation is a rare event in invasive breast cancers overexpressing the ERBB2 gene. *Mod Pathol*. 2011 Aug;24(8):1055–9.
 98. Lei Z, Tian Q, Teng Q, Wurpel JND, Zeng L, Pan Y, et al. Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm*. 2023 May 22;4(3):e265.
 99. Sheyi R, de la Torre BG, Albericio F. Linkers: An Assurance for Controlled Delivery of Antibody-Drug Conjugate. *Pharmaceutics*. 2022 Feb 11;14(2):396.
 100. Eaton JS, Miller PE, Mannis MJ, Murphy CJ. Ocular Adverse Events Associated with Antibody-Drug Conjugates in Human Clinical Trials. *J Ocul Pharmacol Ther Off J Assoc Ocul Pharmacol Ther*. 2015 Dec;31(10):589–604.
 101. Junttila TT, Li G, Parsons K, Phillips GL, Sliwkowski MX. Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 July;128(2):347–56.
 102. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res BCR*. 2014 Mar 5;16(2):209.
 103. Kupchan SM, Komoda Y, Branfman AR, Sneden AT, Court WA, Thomas GJ, et al. The maytansinoids. Isolation, structural elucidation, and chemical interrelation of novel ansa macrolides. *J Org Chem*. 1977 July 8;42(14):2349–57.
 104. Widdison WC, Wilhelm SD, Cavanagh EE, Whiteman KR, Leece BA, Kovtun Y, et al. Semisynthetic Maytansine Analogues for the Targeted Treatment of Cancer. *J Med Chem*. 2006 July 1;49(14):4392–408.
 105. Kowalczyk L, Bartsch R, Singer CF, Farr A. Adverse Events of Trastuzumab Emtansine (T-DM1) in the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer Patients. *Breast Care*. 2017 Dec;12(6):401–8.

106. Hunter FW, Barker HR, Lipert B, Rothé F, Gebhart G, Piccart-Gebhart MJ, et al. Mechanisms of resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer*. 2020 Mar;122(5):603–12.
107. Michel LL, Bermejo JL, Gondos A, Marmé F, Schneeweiss A. T-DM1 as a New Treatment Option for Patients with Metastatic HER2-positive Breast Cancer in Clinical Practice. *Anticancer Res*. 2015 Sept;35(9):5085–90.
108. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, et al. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012 Nov 8;367(19):1783–91.
109. Lambert JM, Chari RVJ. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): an antibody-drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. *J Med Chem*. 2014 Aug 28;57(16):6949–64.
110. Hamblett KJ, Senter PD, Chace DF, Sun MMC, Lenox J, Cervený CG, et al. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):7063–70.
111. Indini A, Rijavec E, Grossi F. Trastuzumab Deruxtecan: Changing the Destiny of HER2 Expressing Solid Tumors. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 30;22(9):4774.
112. Cortés J, Kim SB, Chung WP, Im SA, Park YH, Hegg R, et al. Trastuzumab Deruxtecan versus Trastuzumab Emtansine for Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022 Mar 24;386(12):1143–54.
113. Nakada T, Sugihara K, Jikoh T, Abe Y, Agatsuma T. The Latest Research and Development into the Antibody-Drug Conjugate, [fam-] Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a), for HER2 Cancer Therapy. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2019;67(3):173–85.
114. Erickson HK, Park PU, Widdison WC, Kovtun YV, Garrett LM, Hoffman K, et al. Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):4426–33.
115. Ogitani Y, Hagihara K, Oitate M, Naito H, Agatsuma T. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody–drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. *Cancer Sci*. 2016 July;107(7):1039–46.
116. Shi F, Liu Y, Zhou X, Shen P, Xue R, Zhang M. Disitamab vedotin: a novel antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Drug Deliv*. 29(1):1335–44.
117. Li H, Yu C, Jiang J, Huang C, Yao X, Xu Q, et al. An anti-HER2 antibody conjugated with monomethyl auristatin E is highly effective in HER2-positive human gastric cancer. *Cancer Biol Ther*. 2016 Feb 6;17(4):346–54.
118. Hingorani DV, Allevato MM, Camargo MF, Lesperance J, Quraishi MA, Aguilera J, et al. Monomethyl auristatin antibody and peptide drug conjugates for trimodal cancer chemo-radio-immunotherapy. *Nat Commun*. 2022 July 5;13(1):3869.
119. Nanotechnology-based medicinal products for human use - EU-IN Horizon Scanning Report.
120. Liu Q, Zou J, Chen Z, He W, Wu W. Current research trends of nanomedicines. *Acta Pharm Sin B*. 2023 Nov;13(11):4391–416.

121. Shan X, Gong X, Li J, Wen J, Li Y, Zhang Z. Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. *Acta Pharm Sin B*. 2022 July;12(7):3028–48.
122. Altammar KA. A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Front Microbiol*. 2023;14:1155622.
123. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med*. 2019 Sept;4(3):e10143.
124. Zhang YN, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2016 Oct 28;240:332–48.
125. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today*. 2015 Aug;10(4):487–510.
126. Shi P, Cheng Z, Zhao K, Chen Y, Zhang A, Gan W, et al. Active targeting schemes for nano-drug delivery systems in osteosarcoma therapeutics. *J Nanobiotechnology*. 2023 Mar 22;21(1):103.
127. Graván P, Peña-Martín J, de Andrés JL, Pedrosa M, Villegas-Montoya M, Galisteo-González F, et al. Exploring the Impact of Nanoparticle Stealth Coatings in Cancer Models: From PEGylation to Cell Membrane-Coating Nanotechnology. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024 Jan 17;16(2):2058–74.
128. Valentini X, Rugira P, Frau A, Tagliatti V, Conotte R, Laurent S, et al. Hepatic and Renal Toxicity Induced by TiO₂ Nanoparticles in Rats: A Morphological and Metabonomic Study. *J Toxicol*. 2019;2019:5767012.
129. Calarco A, Bosetti M, Margarucci S, Fusaro L, Nicolì E, Petillo O, et al. The genotoxicity of PEI-based nanoparticles is reduced by acetylation of polyethylenimine amines in human primary cells. *Toxicol Lett*. 2013 Mar 27;218(1):10–7.
130. Alsaab HO, Alharbi FD, Alhibs AS, Alanazi NB, Alshehri BY, Saleh MA, et al. PLGA-Based Nanomedicine: History of Advancement and Development in Clinical Applications of Multiple Diseases. *Pharmaceutics*. 2022 Dec 6;14(12):2728.
131. Wang J, Drelich AJ, Hopkins CM, Mecozzi S, Li L, Kwon G, et al. Gold nanoparticles in virus detection: Recent advances and potential considerations for SARS-CoV-2 testing development. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2022;14(1):e1754.
132. Carrese B, Sanità G, Lamberti A. Nanoparticles Design for Theranostic Approach in Cancer Disease. *Cancers*. 2022 Sept 24;14(19):4654.
133. Kader A, Kaufmann JO, Mangarova DB, Moeckel J, Brangsch J, Adams LC, et al. Iron Oxide Nanoparticles for Visualization of Prostate Cancer in MRI. *Cancers*. 2022 June 13;14(12):2909.
134. Lan H, Jamil M, Ke G, Dong N. The role of nanoparticles and nanomaterials in cancer diagnosis and treatment: a comprehensive review. *Am J Cancer Res*. 2023 Dec 15;13(12):5751.

135. Rao NV, Rho JG, Um W, EK PK, Nguyen VQ, Oh BH, et al. Hyaluronic Acid Nanoparticles as Nanomedicine for Treatment of Inflammatory Diseases. *Pharmaceutics*. 2020 Sept 29;12(10):931.
136. Casper J, Schenk SH, Parhizkar E, Detampel P, Dehshahri A, Huwyler J. Polyethylenimine (PEI) in gene therapy: Current status and clinical applications. *J Controlled Release*. 2023 Oct 1;362:667–91.
137. Kafil V, Omid Y. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *BiolImpacts BI*. 2011;1(1):23–30.
138. Rao Nv, Rho JG, Um W, Ek PK, Nguyen VQ, Oh BH, et al. Hyaluronic Acid Nanoparticles as Nanomedicine for Treatment of Inflammatory Diseases. *Pharmaceutics*. 2020 Sept 29;12(10):931.
139. Reinhart AG, Osterwald A, Ringler P, Leiser Y, Lauer ME, Martin RE, et al. Investigations into mRNA Lipid Nanoparticles Shelf-Life Stability under Nonfrozen Conditions. *Mol Pharm*. 2023 Dec 4;20(12):6492–503.
140. Gatto MS, Najahi-Missaoui W. Lyophilization of Nanoparticles, Does It Really Work? Overview of the Current Status and Challenges. *Int J Mol Sci*. 2023 Sept 13;24(18):14041.
141. Bazak R, Houri M, Achy SE, Hussein W, Refaat T. Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Mol Clin Oncol*. 2014 Nov;2(6):904–8.
142. Nakamura Y, Mochida A, Choyke PL, Kobayashi H. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug Chem*. 2016 Oct 19;27(10):2225–38.
143. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *J Pers Med*. 2021 Aug 6;11(8):771.
144. Friedman AD, Claypool SE, Liu R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Curr Pharm Des*. 2013;19(35):6315–29.
145. Kumari M, Acharya A, Krishnamurthy PT. Antibody-conjugated nanoparticles for target-specific drug delivery of chemotherapeutics. *Beilstein J Nanotechnol*. 2023 Sept 4;14:912–26.
146. Chen F, Ma K, Madajewski B, Zhuang L, Zhang L, Rickert K, et al. Ultrasmall targeted nanoparticles with engineered antibody fragments for imaging detection of HER2-overexpressing breast cancer. *Nat Commun*. 2018 Oct 8;9(1):4141.
147. Parvathaneni V, Shukla SK, Gupta V. Development and Characterization of Folic Acid-Conjugated Amodiaquine-Loaded Nanoparticles–Efficacy in Cancer Treatment. *Pharmaceutics*. 2023 Mar 20;15(3):1001.
148. Norton N, Youssef B, Hillman DW, Nassar A, Geiger XJ, Necela BM, et al. Folate receptor alpha expression associates with improved disease-free survival in triple negative breast cancer patients. *Npj Breast Cancer*. 2020 Feb 4;6(1):4.
149. Jafari-Gharabaghloou D, Dadashpour M, khanghah OJ, Salmani-Javan E, Zarghami N. Potentiation of Folate-Functionalized PLGA-PEG nanoparticles loaded with metformin for

- the treatment of breast Cancer: possible clinical application. *Mol Biol Rep*. 2023 Apr 1;50(4):3023–33.
150. Granja A, Nunes C, Sousa CT, Reis S. Folate receptor-mediated delivery of mitoxantrone-loaded solid lipid nanoparticles to breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2022 Oct 1;154:113525.
 151. Jefferies WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*. 1984 Nov;312(5990):162–3.
 152. Johnsen KB, Burkhart A, Thomsen LB, Andresen TL, Moos T. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. *Prog Neurobiol*. 2019 Oct 1;181:101665.
 153. Wiley DT, Webster P, Gale A, Davis ME. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 21;110(21):8662–7.
 154. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chem Rev*. 2015 Feb 25;115(4):1990–2042.
 155. Badir A, Refki S, Sekkat Z. Utilizing gold nanoparticles in plasmonic photothermal therapy for cancer treatment. *Heliyon*. 2025 Feb 15;11(4):e42738.
 156. Broadbent M, Chadwick SJ, Brust M, Volk M. Gold Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Therapy. *ACS Omega*. 2024 Oct 23;9(44):44846–59.
 157. Lu RM, Hsu HE, Perez SJLP, Kumari M, Chen GH, Hong MH, et al. Current landscape of mRNA technologies and delivery systems for new modality therapeutics. *J Biomed Sci*. 2024 Sept 10;31(1):89.
 158. Zaman R, Islam RA, Ibnat N, Othman I, Zaini A, Lee CY, et al. Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins. *J Controlled Release*. 2019 May 10;301:176–89.
 159. Lopes C, Cristóvão J, Silvério V, Lino PR, Fonte P. Microfluidic production of mRNA-loaded lipid nanoparticles for vaccine applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2022 Oct;19(10):1381–95.
 160. Debisschop A, Bogaert B, Muntean C, De Smedt SC, Raemdonck K. Beyond chloroquine: Cationic amphiphilic drugs as endosomal escape enhancers for nucleic acid therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*. 2024 Dec;83:102531.
 161. Hernández-Camarero P, Amezcua-Hernández ,Víctor, Jiménez ,Gema, García ,María A, Marchal ,Juan A, and Perán M. Clinical Failure of Nanoparticles in Cancer: Mimicking Nature’S Solutions. *Nanomed*. 2020 Oct 1;15(23):2311–24.
 162. Yao Y, Zang Y, Qu J, Tang M, Zhang T. The Toxicity Of Metallic Nanoparticles On Liver: The Subcellular Damages, Mechanisms, And Outcomes. *Int J Nanomedicine*. 2019 Nov 7;14:8787–804.
 163. Samad MA, Ahmad I, Zughaibi TA, Suhail M, Zaidi SK, Al-Abbasi FA, et al. Nanotechnology-based drug delivery for breast cancer treatment: Current applications and future directions. *Eur J Med Chem Rep*. 2025 Aug 1;14:100268.

164. Berry G, Billingham M, Alderman E, Richardson P, Torti F, Lum B, et al. The use of cardiac biopsy to demonstrate reduced cardiotoxicity in AIDS Kaposi's sarcoma patients treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1998 July;9(7):711–6.
165. Lyass O, Uziely B, Ben-Yosef R, Tzemach D, Heshing NI, Lotem M, et al. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2000 Sept 1;89(5):1037–47.
166. Swenson CE, Perkins WR, Roberts P, Janoff AS. Liposome technology and the development of MyocetTM (liposomal doxorubicin citrate). 2001;
167. Batist G, Barton J, Chaikin P, Swenson C, Welles L. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2002 Dec;3(12):1739–51.
168. Chan S, Davidson N, Juozaityte E, Erdkamp F, Pluzanska A, Azarnia N, et al. Phase III trial of liposomal doxorubicin and cyclophosphamide compared with epirubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2004 Oct;15(10):1527–34.
169. Abu Samaan TM, Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules*. 2019 Nov 27;9(12):789.
170. Steinmetz MO, Prota AE. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 2018 Oct 1;28(10):776–92.
171. Chao TC, Chu Z, Tseng LM, Chiou TJ, Hsieh RK, Wang WS, et al. Paclitaxel in a novel formulation containing less Cremophor EL as first-line therapy for advanced breast cancer: a phase II trial. *Invest New Drugs*. 2005 Mar;23(2):171–7.
172. Adams JD, Flora KP, Goldspiel BR, Wilson JW, Arbuck SG, Finley R. Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1993;(15):141–7.
173. ten Tije AJ, Verweij J, Loos WJ, Sparreboom A. Pharmacological Effects of Formulation Vehicles. *Clin Pharmacokinet*. 2003 June 1;42(7):665–85.
174. Gradishar WJ, Tjulandin S, Davidson N, Shaw H, Desai N, Bhar P, et al. Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005 Nov 1;23(31):7794–803.
175. Lim WT, Tan EH, Toh CK, Hee SW, Leong SS, Ang PCS, et al. Phase I pharmacokinetic study of a weekly liposomal paclitaxel formulation (Genexol-PM) in patients with solid tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2010 Feb;21(2):382–8.
176. Park IH, Sohn JH, Kim SB, Lee KS, Chung JS, Lee SH, et al. An Open-Label, Randomized, Parallel, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Polymeric Micelle-Formulated Paclitaxel Compared to Conventional Cremophor EL-Based Paclitaxel for Recurrent or Metastatic HER2-Negative Breast Cancer. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc*. 2017 July;49(3):569–77.

177. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:857–902.
178. Kay RR. Macropinocytosis: Biology and mechanisms. *Cells Dev.* 2021 Dec;168:203713.
179. Francis CR, Bell ML, Skripnichuk MM, Kushner EJ. Arf6 Regulates Endocytosis and Angiogenesis by Promoting Filamentous Actin Assembly [Internet]. *bioRxiv*; 2023 [cited 2025 Sept 17]. p. 2023.02.22.529543. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.22.529543v1>
180. Matthaeus C, Taraska JW. Energy and Dynamics of Caveolae Trafficking. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 Jan 21 [cited 2025 Sept 17];8. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2020.614472/full>
181. Smith SM, Smith CJ. Capturing the mechanics of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Opin Struct Biol.* 2022 Aug 1;75:102427.
182. Varma S, Dey S, Palanisamy D. Cellular Uptake Pathways of Nanoparticles: Process of Endocytosis and Factors Affecting their Fate. *Curr Pharm Biotechnol.* 2022;23(5):679–706.
183. Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1820(3):264–81.
184. Scott CC, Vacca F, Gruenberg J. Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 July;31:2–10.
185. Tjelle TE, Brech A, Juvet LK, Griffiths G, Berg T. Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J Cell Sci.* 1996 Dec;109 (Pt 12):2905–14.
186. Jeong J, Kim W, Kim LK, VanHouten J, Wysolmerski JJ. HER2 signaling regulates HER2 localization and membrane retention. *PloS One.* 2017;12(4):e0174849.
187. Ram S, Kim D, Ober RJ, Ward ES. The level of HER2 expression is a predictor of antibody-HER2 trafficking behavior in cancer cells. *mAbs.* 2014;6(5):1211–9.
188. Goh LK, Sorkin A. Endocytosis of Receptor Tyrosine Kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 May;5(5):a017459.
189. Cocucci E, Gaudin R, Kirchhausen T. Dynamin recruitment and membrane scission at the neck of a clathrin-coated pit. *Mol Biol Cell.* 2014 Nov 5;25(22):3595–609.
190. Naslavsky N, Caplan S. The enigmatic endosome – sorting the ins and outs of endocytic trafficking. *J Cell Sci.* 2018 July 1;131(13):jcs216499.
191. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol.* 2010 Jan;25(1):99–112.
192. Zhang J, Jiang Z, Shi A. Rab GTPases: The principal players in crafting the regulatory landscape of endosomal trafficking. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022 Aug 11;20:4464–72.
193. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 2011 Aug 31;30(17):3481–500.

194. Maxfield FR, Yamashiro DJ. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol.* 1987;225:189–98.
195. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2017 July 21;75(2):193–208.
196. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Aug;8(8):622–32.
197. Yadati T, Houben T, Bitorina A, Shiri-Sverdlov R. The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. *Cells.* 2020 July 13;9(7):1679.
198. Bright NA, Davis LJ, Luzio JP. Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity. *Curr Biol.* 2016 Sept 12;26(17):2233–45.
199. Griffiths G, Gruenberg J, Marsh M, Wohlmann J, Jones AT, Parton RG. Nanoparticle entry into cells; the cell biology weak link. *Adv Drug Deliv Rev.* 2022 Sept 1;188:114403.
200. Rennick JJ, Johnston APR, Parton RG. Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nat Nanotechnol.* 2021 Mar;16(3):266–76.
201. Chidlow JH, Sessa WC. Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2010 May 1;86(2):219–25.
202. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell.* 2001 Aug 24;106(4):403–11.
203. Kiss AL, Botos E. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med.* 2009 July;13(7):1228–37.
204. Mazumdar S, Chitkara D, Mittal A. Exploration and insights into the cellular internalization and intracellular fate of amphiphilic polymeric nanocarriers. *Acta Pharm Sin B.* 2021 Apr;11(4):903–24.
205. Salloum G, Bresnick AR, Backer JM. Macropinocytosis: mechanisms and regulation. *Biochem J.* 2023 Mar 15;480(5):335–62.
206. Gundu C, Arruri VK, Yadav P, Navik U, Kumar A, Amalkar VS, et al. Dynamin-Independent Mechanisms of Endocytosis and Receptor Trafficking. *Cells.* 2022 Aug 17;11(16):2557.
207. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater.* 2016 Apr 26;1(5):16014.
208. Itagaki M, Nasu Y, Sugiyama C, Nakase I, Kamei N. A universal method to analyze cellular internalization mechanisms via endocytosis without non-specific cross-effects. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2023 Feb;37(2):e22764.
209. Garay C, Judge G, Lucarelli S, Bautista S, Pandey R, Singh T, et al. Epidermal growth factor-stimulated Akt phosphorylation requires clathrin or ErbB2 but not receptor endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2015 Oct 1;26(19):3504–19.

210. Pereira P, Pedrosa SS, Wymant JM, Sayers E, Correia A, Vilanova M, et al. siRNA Inhibition of Endocytic Pathways to Characterize the Cellular Uptake Mechanisms of Folate-Functionalized Glycol Chitosan Nanogels. *Mol Pharm*. 2015 June 1;12(6):1970–9.
211. Al Soraj M, He L, Peynshaert K, Cousaert J, Vercauteren D, Braeckmans K, et al. siRNA and pharmacological inhibition of endocytic pathways to characterize the differential role of macropinocytosis and the actin cytoskeleton on cellular uptake of dextran and cationic cell penetrating peptides octaarginine (R8) and HIV-Tat. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2012 July 10;161(1):132–41.
212. Chithrani BD, Chan WCW. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett*. 2007 June 1;7(6):1542–50.
213. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomed*. 2016 Mar;11(6):673–92.
214. Wang W, Gaus K, D. Tilley R, Justin Gooding J. The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: what do the different analysis methods tell us? *Mater Horiz*. 2019;6(8):1538–47.
215. Hadji H, Bouchemal K. Effect of micro- and nanoparticle shape on biological processes. *J Controlled Release*. 2022 Feb 1;342:93–110.
216. Papini E, Tavano R, Mancin F. Opsonins and Dysopsonins of Nanoparticles: Facts, Concepts, and Methodological Guidelines. *Front Immunol [Internet]*. 2020 Oct 12 [cited 2025 Sept 19];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.567365/full>
217. França A, Aggarwal P, Barsov EV, Kozlov SV, Dobrovolskaia MA, González-Fernández Á. Macrophage Scavenger Receptor A Mediates The Uptake of Gold Colloids by Macrophages In Vitro. *Nanomed*. 2011 Sept 1;6(7):1175–88.
218. Park J, Lim DH, Lim HJ, Kwon T, Choi J sil, Jeong S, et al. Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles. *Chem Commun*. 2011;47(15):4382–4.
219. Canton I, Battaglia G. Endocytosis at the nanoscale. *Chem Soc Rev*. 2012;41(7):2718–39.
220. Gonzalez-Rodriguez D, Barakat AI. Dynamics of Receptor-Mediated Nanoparticle Internalization into Endothelial Cells. *PLoS ONE*. 2015 Apr 22;10(4):e0122097.
221. Li Y, Shang L, Nienhaus GU. Super-resolution imaging-based single particle tracking reveals dynamics of nanoparticle internalization by live cells. *Nanoscale*. 2016 Mar 31;8(14):7423–9.
222. Yoshida S, Pacitto R, Inoki K, Swanson J. Macropinocytosis, mTORC1 and cellular growth control. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Apr 1;75(7):1227–39.
223. Li YX, Pang HB. Macropinocytosis as a cell entry route for peptide-functionalized and bystander nanoparticles. *J Controlled Release*. 2021 Jan 10;329:1222–30.

224. Richards CJ, Burgers TCQ, Vlijm R, Roos WH, Åberg C. Rapid Internalization of Nanoparticles by Human Cells at the Single Particle Level. *ACS Nano*. 2023 Sept 12;17(17):16517–29.
225. Griffiths G, Gruenberg J, Marsh M, Wohlmann J, Jones AT, Parton RG. Nanoparticle entry into cells; the cell biology weak link. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022 Sept 1;188:114403.
226. Manzanares D, Ceña V. Endocytosis: The Nanoparticle and Submicron Nanocompounds Gateway into the Cell. *Pharmaceutics*. 2020 Apr 17;12(4):371.
227. Lam PY, Fischer RS, Shin WD, Waterman CM, Huttenlocher A. Spinning disk confocal imaging of neutrophil migration in zebrafish. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1124:219–33.
228. Bhandari M, Soria-Carrera H, Wohlmann J, Dal NJK, de la Fuente JM, Martín-Rapún R, et al. Subcellular localization and therapeutic efficacy of polymeric micellar nanoparticles encapsulating bedaquiline for tuberculosis treatment in zebrafish. *Biomater Sci*. 2023 Mar 14;11(6):2103–14.
229. Evensen L, Johansen PL, Koster G, Zhu K, Herfindal L, Speth M, et al. Zebrafish as a model system for characterization of nanoparticles against cancer. *Nanoscale*. 2016 Jan 14;8(2):862–77.
230. Moasser MM. The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007 Oct 4;26(45):6469–87.
231. Cortese K, Howes MT, Lundmark R, Tagliatti E, Bagnato P, Petrelli A, et al. The HSP90 inhibitor geldanamycin perturbs endosomal structure and drives recycling ErbB2 and transferrin to modified MVBs/lysosomal compartments. *Mol Biol Cell*. 2013 Jan;24(2):129–44.
232. Shen F, Lin Q, Childress C, Yang W. Identification of the domain in ErbB2 that restricts ligand-induced degradation. *Cell Signal*. 2008 Apr;20(4):779–86.
233. Austin CD, De Mazière AM, Pisacane PI, van Dijk SM, Eigenbrot C, Sliwkowski MX, et al. Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell*. 2004 Dec;15(12):5268–82.
234. Mishra A, Hourigan D, Lindsay AJ. Inhibition of the endosomal recycling pathway downregulates HER2 activation and overcomes resistance to tyrosine kinase inhibitors in HER2-positive breast cancer. *Cancer Lett*. 2022 Mar 31;529:153–67.
235. Dziawer Ł, Majkowska-Pilip A, Gawet D, Godlewska M, Pruszyński M, Jastrzębski J, et al. Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ²¹¹At as a Prospective Tool for Local Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Nanomaterials*. 2019 Apr 18;9(4):632.
236. Kang X, Guo X, An W, Niu X, Li S, Liu Z, et al. Photothermal therapeutic application of gold nanorods-porphyrin-trastuzumab complexes in HER2-positive breast cancer. *Sci Rep*. 2017 Feb 3;7:42069.
237. Zhang X, Liu J, Li X, Li F, Lee RJ, Sun F, et al. Trastuzumab-Coated Nanoparticles Loaded With Docetaxel for Breast Cancer Therapy. Dose-Response. 2019 Sept 4;17(3):1559325819872583.

238. Domínguez-Ríos R, Sánchez-Ramírez DR, Ruiz-Saray K, Ocegüera-Basurto PE, Almada M, Juárez J, et al. Cisplatin-loaded PLGA nanoparticles for HER2 targeted ovarian cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019 June 1;178:199–207.
239. Juul CA, Engel TB, Flíedner FP, Ringgaard L, Eliassen R, Melander F, et al. HER2-targeted, enzyme-activated liposomes show superior in vivo efficacy in an ovarian cancer model. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2024 July;371:288–97.
240. Radford DC, Yang J, Doan MC, Li L, Dixon AS, Owen SC, et al. Multivalent HER2-binding polymer conjugates facilitate rapid endocytosis and enhance intracellular drug delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2020 Mar 10;319:285–99.
241. Shipunova VO, Sogomonyan AS, Zelepukin IV, Nikitin MP, Deyev SM. PLGA Nanoparticles Decorated with Anti-HER2 Affibody for Targeted Delivery and Photoinduced Cell Death. *Molecules*. 2021 June 28;26(13):3955.
242. Ngamcherdtrakul W, Bejan DS, Cruz-Muñoz W, Reda M, Zaidan HY, Siriwon N, et al. Targeted Nanoparticle for Co-delivery of HER2 siRNA and a Taxane to Mirror the Standard Treatment of HER2+ Breast Cancer: Efficacy in Breast Tumor and Brain Metastasis. *Small Weinhe Bergstr Ger*. 2022 Mar;18(11):e2107550.
243. Kotelnikova PA, Shipunova VO, Deyev SM. Targeted PLGA–Chitosan Nanoparticles for NIR-Triggered Phototherapy and Imaging of HER2-Positive Tumors. *Pharmaceutics*. 2023 Dec 20;16(1):9.
244. Shipunova VO, Komedchikova EN, Kotelnikova PA, Nikitin MP, Deyev SM. Targeted Two-Step Delivery of Oncotheranostic Nano-PLGA for HER2-Positive Tumor Imaging and Therapy In Vivo: Improved Effectiveness Compared to One-Step Strategy. *Pharmaceutics*. 2023 Mar 3;15(3):833.
245. Wojda U, Goldsmith P, Miller JL. Surface membrane biotinylation efficiently mediates the endocytosis of avidin bioconjugates into nucleated cells. *Bioconjug Chem*. 1999;10(6):1044–50.
246. Zhu W, Okollie B, Artemov D. Controlled internalization of Her-2/ neu receptors by cross-linking for targeted delivery. *Cancer Biol Ther*. 2007 Dec;6(12):1960–6.
247. Wymant JM, Sayers EJ, Muir D, Jones AT. Strategic Trastuzumab Mediated Crosslinking Driving Concomitant HER2 and HER3 Endocytosis and Degradation in Breast Cancer. *J Cancer*. 2020 Mar 5;11(11):3288–302.
248. Moody PR, Sayers EJ, Magnusson JP, Alexander C, Borri P, Watson P, et al. Receptor Crosslinking: A General Method to Trigger Internalization and Lysosomal Targeting of Therapeutic Receptor:Ligand Complexes. *Mol Ther*. 2015 Oct 27;23(12):1888.

2 Dull a Deunyddiau

2.1 Dulliau Cyffredinol

Mae'r holl ddeunyddiau a ddefnyddiwyd wedi'u rhestru yn yr atodiad

2.1.1 Llinellau Cell

Defnyddiwyd 4 llinell gell wahanol sy'n cwmpasu amrywiaeth o wahanol is-deipiau cancer y fron (Tabl 2-1).

Tabl 2-1: Crynodeb o'r wahanol llinelloedd cell cafodd ei ddefnyddio yn y traethawd hwn

Llinell cell	Is-deip	Statws HER2	Côd ATCC
BT474	Luminal B	+	HTB-20
Clone5	Luminal B (Ymwrthedd i Tz)	+	CRL-3247
MCF7	Luminal A	Isel	HTB-22
SKBR3	HER2+	+	HTB-30

Mae'r llinell SKBR3 yn gweithredu fel ein llinell gell model HER2+ tra bod gennym yr MCF7 fel y waelodlin i'w gymharu yn erbyn, er y'i gelwir yn aml yn HER2⁻ yn y llenyddiaeth, mae'r llinell gell hon yn mynegi HER2 ar lefelau tebyg i'r rhai a welir mewn meinwe iach, arferol (1). Yn ogystal mae gennym y llinell gell Clone5 sy'n gweithredu fel ein llinell gell sydd hefo ymwrthedd i Tz (2). Datblygwyd y llinell gell hon yn wreiddiol o gelloedd BT474 a gafodd eu tyfu am dymor hir ym mhresenoldeb Tz fel eu bod wedi datblygu ymwrthedd caffaeledig. Felly, ychwanegwyd y BT474 gwreiddiol. er mwyn cael gwybodaeth am wahaniaethau eraill posibl rhwng y ddwy. Cafwyd yr holl linellau cell gan ATCC.

2.1.2 Meithriniad Celloedd Rheolaidd

Roedd yr holl linellau cell yn cael eu tyfu'n rheolaidd mewn fflasgiau T75 gyda DMEM glwcos uchel wedi'i ategu â 10% FBS (cyfeirir ato fel cyfrwng cyflawn) a'i gadw mewn deorydd gyda thymheredd 37°C ac atmosffer 5% CO₂ mewn aer llaith (cyfeirir ato o hyn ymlaen fel amodau Tyfiant Celloedd (TC)). Ar ôl cyrraedd cydlifiad o 70%, rhannwyd y celloedd fel dilynir: cafodd y cyfrwng hen ei ddiferu a'r celloedd eu golchi â PBS, yna cafodd y PBS ei ddiferu a chafodd y celloedd eu trin â 0.25% w/v Trypsin wedyn eu gosod yn ôl yn y deorydd nes bod y celloedd wedi datgysylltu o'r fflasg. Yn dilyn hyn ychwanegwyd cyfrwng cyflawn i niwtraleiddio'r trypsin a chafodd cynnwys y fflasg ei allgyrchu (300g, 3 munud). Yna cafodd yr uwchwaddod ei ddiferu ac ail doddwyd y belen gell yn y swm dymunol o gyfrwng cyflawn. Yna cafodd tua hanner y celloedd eu cario ymlaen i fflasg ffres tra bod yr hanner arall wedyn yn cael ei gyfrif a'i ddefnyddio ar gyfer arbrofion pellach. Byddai'r holl linellau cell yn cael eu rhannu fel mater o drefn hyd at uchafswm o 40, ac ar ôl hynny byddai'r celloedd yn cael eu gwaredu a ffiol ffres yn cael ei dadmer.

2.1.3 Storio a dadmer celloedd

Cynhyrchwyd stociau celloedd trwy dyfu celloedd mewn fflasgiau T175 nes iddynt gyrraedd cydlifiad o 70-80%, wedi hynny cawsant eu rhannu fel disgrifir uchod gydag un gwahaniaeth - cafodd y belen gell ei hydoddi mewn cyfrwng cyflawn a oedd yn cynnwys 10% DMSO wedyn ei didoli fel bod pob T175 yn cynhyrchu 5 cryofial. Yna gosodwyd y cryofiolau mewn cynhwysydd rhewi "Mr Frosty™" wedi'i lenwi ag isopropanol a gafodd wedyn ei roi mewn rhewgell -80°C dros nos. Y bore wedyn trosglwyddwyd y ffiolau hyn i nitrogen hylifol ar gyfer storio hirdymor.

Gan fod ein cyfrwng cyflawn rheolaidd yn cynnwys ffenol-coch roedd hyn yn ei wneud yn anaddas ar gyfer delweddu fflwroleuol celloedd byw. Oherwydd hyn fe wnaethom ddefnyddio RPMI heb ffenol-coch wedi'i ategu â 10% FBS, y cyfeirir ato o hyn ymlaen fel cyfrwng delweddu.

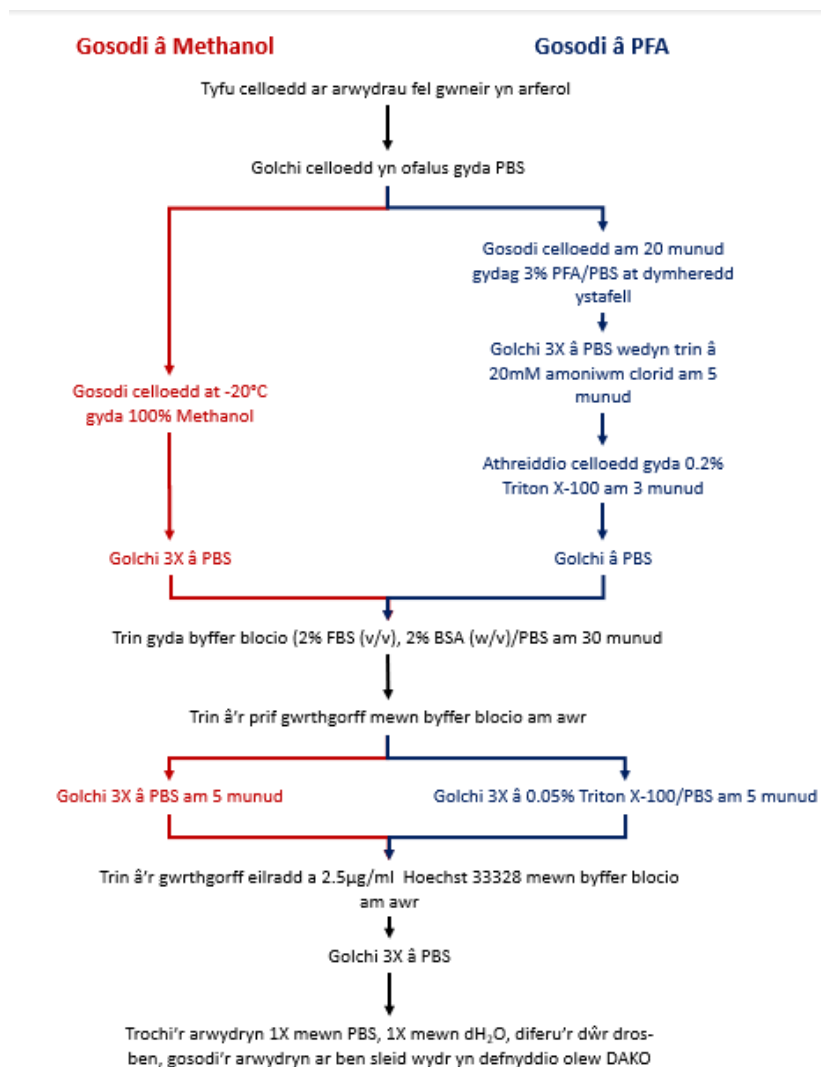
2.1.4 Microsgop Leica SP5

Ar gyfer yr delweddu fflwroleuol i gyd yn y traethawd hon defnyddiwyd microsgop cydffocal Leica SP5. Os roedd celloedd byw yn cael eu defnyddio fe wnaethom defnyddio llwyfan sy'n caniatáu i ni gadw'r celloedd mewn amgylchedd sydd gyda thymheredd 37°C ac atmosffer 5% CO₂ yn ystod y delweddu. O ran laserau mae gan y microsgop un 405nm, un argon 488nm a rhai heliwm-neon 543nm a 647nm. Yn gyffredinol ar gyfer y rhai 488nm a 647nm defnyddiwyd pŵer o 20%, i'r 543 defnyddiwyd 40% ag i'r un 405nm defnyddiwyd 70%. Ni defnyddir y laser 405nm mewn celloedd byw ac hefo'r 543nm defnyddir ar gyfer yr arbrofion dechreuol gyda'r NGau-RhodamineB yn unig. Ar ôl sedydllu fod ein NGau yn gallu rhwymo i'r gell bilen yn llwyddiannus symudwn ymlaen i NGau heb RhodamineB i osgoi unrhyw ffotowenwyndra. Defnyddiwyd cyflymder sganio o 400Hz a cymedr llinellol o 4. Ar gyfer samplau oedd angen defnydd o'r 405nm a 488nm defnyddir sganio dilyniantol er mwyn atal y signal o un sianel gwaedu drwodd i'r llall. I'r pentyrrau-Z fe wnaethom gosod maint y camau i fod yn 0.49µm. Ar rhan gweddill y gosodiadau cafodd nhw eu optimeiddio ar gyfer pob arbrawf.

2.2 Proffilio Endocytig

2.2.1 Fflwroleuedd Imiwno

Tyfwyd celloedd mewn cyfrwng cyflawn ar arwydrau o fewn plât 12 ffynnon nes bod y celloedd wedi cyrraedd cydlifiad o 70%. Yna cafodd y ffynhonnau eu diferu wedyn golchwyd y celloedd â PBS 3x. Yn dilyn hyn roedd y protocol yn gwahaniaethu'n seiliedig ar y sefydlyn a ddefnyddiwyd fel y gwelir yn ffigur 2-1.



Ffigur 2-1: Crynodeb o'r wahanol ddulliau a defnyddiwyd ar gyfer immwnofflworoleuedd a sut maent yn gwahaniaethu o'i gilydd.

Yn gryno ar gyfer y llwybr PFA anweithredwyd y celloedd mewn 3% w/v PFA am 20 munud ac yna eu golchi 3x gyda PBS. Wedi hynny, triniwyd y celloedd mewn 20mM amoniwm clorid am 5 munud ac yna eu hathreiddio â 0.2% TritonX-100 (Tx100) am 3 munud ac yna eu golchi eto gyda PBS. Yn dilyn hyn triniwyd y celloedd gan ddefnyddio byffer blocio (2% FBS, 2% BSA) am 30 munud cyn eu trin gyda'r gwrthgorff cynradd am awr. Wedi hynny, golchwyd y celloedd â 0.05% Tx100 3x ac yna triniwyd y celloedd â'r gwrthgorff eilradd a 2.5µg/ml Hoechst 33328 am awr i labelu'r cnewyllyn. Yna cafodd y celloedd eu golchi gyda PBS 3x a'u gosodi ar sleid wydr yn defnyddio olew DAKO.

Roedd y llwybr methanol ar y llaw arall yn cynnwys anweithredu'r celloedd gan ddefnyddio methanol o dymheredd -20°C am 3 munud ar ac yna eu golchi 3x gyda PBS at dymheredd ystafell. Wedi hynny, triniwyd y celloedd gan ddefnyddio byffer blocio am 30 munud cyn eu trin gyda'r prif wrthgorff am awr. Wedi hynny golchwyd y celloedd gyda PBS 3x ac yna triniwyd y celloedd gyda'r gwrthgorff eilradd a 2.5µg/ml Hoechst 33328 am awr, Mae'r gwrthgyrff a ddefnyddiwyd yn y gwaith i'w gweld yn Tabl 2-2. Yna cafodd y celloedd eu golchi gyda PBS 3x a'u gosod ar sleid wydr yn defnyddio olew DAKO.

Gwanhawyd yr holl hydoddiannau gwrthgorff gan ddefnyddio byffer blocio. Cyflawnwyd yr holl driniaethau a oedd yn cynnwys blocio neu wrthgorff ar baraffilm: roedd 150µl o naill ai byffer blocio neu hydoddiant gwrthgorff yn cael ei bibedu ar y paraffilm ac yna byddai'r arwydrau yn cael ei osod, wedi gwrthdroi, ar ben y defnyn ac yna'n cael ei drosglwyddo yn ôl i'r plât i'w olchi ymhellach. Cyn gosodi'r arwydrau cylch (diamedr 16mm) cawsant eu trochi mewn PBS ac yna mewn dŵr ac yn olaf yn cael eu sychu'n ysgafn gyda rhywfaint o bapur sidan. Cafodd 12µl o olew DAKO ei bibedu ar sleid a

gosodwyd yr arwydrau ben i lawr ar ben y defnyn, yna cadwyd y sleid hon yn y tywyllwch dros nos i ganiatáu i'r olew galedu cyn delweddu.

Mae'r gwrthgyrff a ddefnyddiwyd yn y gwaith i'w gweld yn Tabl 2-2.

Tabl 2-2: Rhestr, a manylion, o'r gwrthgyrff a'r staeniau a defnyddiwyd wrth ochr y crynodiadau a defnyddiwyd

Targed	Dull Anweithredu	Crynodiad (o'r stoc)
Actin	PFA	1/500
α-Tiwbiwlin	Methanol	1/2000
EEA1 (Endosomau Cynnar)	PFA	1/200
Rab7 (Endosomau Hwyr)	Amrywiol	1/100
LAMP II (Lysosomau)	Methanol	1/200
LAMP III (Lysosomau)	Methanol	1/200
TGN46 (Golgi-trans)	PFA	1/750
GM130 (Golgi-cis)	PFA	1/1000
HER2	PFA	1/200
HER3	PFA	1/200
Hoechst 33342	N/A	2.5µg/ml
Gwrth Llygoden AlexaFluor 488	N/A	1/1000
Gwrth Cwningen AlexaFluor 647	N/A	1/1000
Gwrth Dafad AlexaFluor 555	N/A	1/1000

2.2.2 Mynegiant HER2 a HER3 mewn llinellau cell

Er mwyn cymharu sut mae mynegiant HER2 a HER3 ar draws ein llinellau cell yn cymharu a'i gilydd a hefyd fodelau canser y fron eraill, defnyddiwyd yr cronfa data Depmap a sefydlir rhwng y Broad Institute a'r Novartis Institutes for Biomedical Research (3). Gyda'r offer ar gael ar y porth cynhyrchwyd graff o'r cronfa data cyhoeddus 25Q2 sydd ar gael. Gan nad oedd BT474 Clone yn a bas data doess dim modd cael gwybodaeth pellach am y linell hon

2.2.3 Puro Tz

Tynnwyd cyfryngau storio o golofnau dihalwyno Zeba 2ml trwy allgyrchu am 2 funud. Yn dilyn hyn golchir y colofnau 3x gyda PBS. Ar gyfer pob golchiad, llwythwyd 1ml o PBS ar ben y tiwb a oedd wedyn yn cael ei allgyrchu. Roedd y ddau olchiad cyntaf am 2 funud a'r olaf am 3 munud. Wedi hynny llwythwyd 900µl o'r hydoddiant Tz ac yna allgyrchu i lawr y golofn dihalwyno. Yna sefydlwyd crynodiad Tz mewn PBS trwy fesur yr amsugnedd ar 280nm. Cyflawnwyd yr holl gamau allgyrchu ar 1000g.

Defnyddiwyd dull tebyg i labelu Tz gyda Alexa488. Tynnwyd cyfryngau storio o golofnau dihalwyno Zeba 2ml trwy allgyrchu am 2 funud. Yn dilyn hyn golchwyd y colofnau 3x gyda hydoddiant sodiwm bicarbonad 0.2M pH 8.3. Ar gyfer pob golchiad, llwythwyd 1ml o'r hydoddiant sodiwm bicarbonad ar ben y tiwb a oedd wedyn yn cael ei allgyrchu. Roedd y ddau olchiad cyntaf am 2 funud a'r olaf am 3 munud. Wedi hynny llwythwyd 900µl o'r hydoddiant Tz ac yna allgyrchu i lawr y golofn dihalwyno. Yna sefydlwyd y crynodiad o Tz yn yr hydoddiant trwy fesur yr amsugnedd ar 280nm cyn ychwanegu succinidyl ester Alexa488 fel bod 2 hydoddiant o'r fflworoffor hefo Tz, un gyda chymhareb folar fflworoffor:Tz o 4:1 ac un arall 6:1. Yna cafodd yr hydoddiannau hyn eu gorchuddio â ffoil a'u rhoi ar droellwr am 3 awr i adweithio at dymheredd ystafell. Tra bod yr adwaith hwn yn digwydd, golchwyd colofnau storio ffres gyda PBS fel bod gennym 2 golofn wedi'i golchi fesul hydoddiant Tz. Ar ôl i'r adwaith ddod i ben, allgyrchwyd yr hydoddiannau Tz i lawr colofn, eu casglu a'u hallgyrchu i lawr ail golofn i gael gwared ar unrhyw fflworoffor oedd heb adweithio. Er mwyn darganfod y cymhareb terfynol o fflworoffor:Tz mesurwyd yr amsugnedd ar 280nm a 488nm a wedyn defnyddir yr gwerthoedd hyn i cyfrifo'r nifer gan ddefnyddio yr hafaliad isod:

$$Cymhareb\ molau\ fflwroffor: Tz = \frac{Amsugnedd(488) \times Ffactor\ gwanedu}{\epsilon(fflwroffor) \times Crynodiad\ protein\ (M)}$$

Derbyniwyd yr hafaliad gan Thermofisher fel rhan o'r cit labelu AlexaFluor488. Gwnaed yr holl fesuriadau sbectrosgobeg ar Sbectroffotomedr UV Vis Cary 6000.

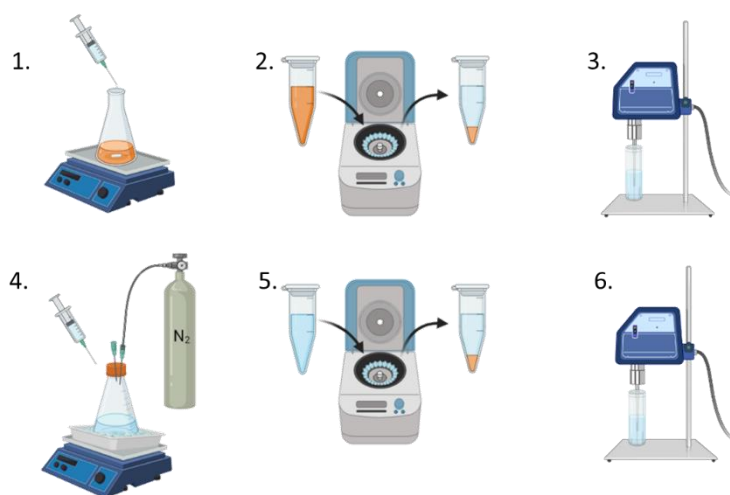
2.2.4 Asesu'r Tz488

Ar ôl labelu'r Tz488 roedd angen gwerthuso'i allu , fel Tz ddigyfnewid, i adnabod a clymu HER2. Tyfwyd celloedd mewn dysglau MatTek nes cyrraedd cydlifiad o 70%. Wedi hynny, cafodd y dysglau eu diferu a chafodd y celloedd eu trin â 50nM Tz488 wedi'u hydoddi mewn cyfrwng delweddu. Ar ôl awr, lluniwyd y celloedd gan ddefnyddio microsgop golau eang Leica DM IRB.

2.3 Astudio Rhwymo a Mewnoliad PLGA-Tz

2.3.1 Cynhyrchu Nanogronynnau

Ymdoddwyd swm cyfartal o PLGA a PLGA-COOH (tua 50mg o bob un) mewn 8ml aseton a'i ychwanegu, diferyn-wrth-ddiferyn i fflasg oedd yn cynnwys 14ml o 2% PVA ar dröydd magnetig (Ffigur 2-2).



Ffigur 2-2: Crynodeb o sut cafodd ein NGau eu cynhyrchu. I ddechrau, roedd y toddiant aseton yn cael ei ychwanegu â llaw, ond er mwyn gwella cysondeb gwnaed hyn wedyn trwy ddisgyrchiant. Ar gyfer NGau RhB (Rhodamine B) ychwanegwyd 1mg o powdr RhB ymlaen llaw, ar gyfer NGau Dox 100µl o hydoddiant 10mg/ml (1). Ar ôl ychwanegu'r hydoddiant aseton gadawyd y fflasg i droi dros nos, y bore wedyn cafodd cynnwys y fflasg ei allgyrchu (14,000g, 10 munud) a'i olchi drosodd a drosodd (2). Er mwyn paratoi yr NGau am addurniad gyda Tz cafodd nhw ei sonicadu am 60 eiliad (30 eiliad dwywaith gyda seibiant 10 eiliad yn y canol) ar pŵer o 300W yn defnyddio Soniprep 150 (3). Yna gwnaethom hydoddi 5.7mg NHS, 19.2mg o EDC mewn fflasg oedd yn cynnwys 2ml o ddŵr a troellwr. Cadwyd y fflasg ar rew a'i fflysio'n barhaus â nitrogen. Yna ychwanegwyd yr NGau ochr yn ochr gyda 38µM Tz488 a chaniatawyd i'r adwaith cymysgu ar rhew am 3 awr mewn tywyllwch (4). Yn dilyn hyn cafodd cynnwys y fflasg ei gasglu a'i allgyrchu a'i olchi fel ddisgrifir uchod (5). Cyn eu defnyddio wedyn cafodd nhw eu sonicadu fel disgrifir uchod (6).

2.3.2 Nodweddu'r Nanogronynnau

Darganfuom siâp y NGau trwy ganiatáu i 100µl ohonynt sychu ar arwydryn a oedd wedyn yn cael ei orchuddio â aur-paladiwm gan ddefnyddio BioRad SC-500 gydag argon ar gyfer plasma. Wedi hynny gosodwyd y samplau ar fewnosodiadau llwyfan alwminiwm cyn eu delweddu gyda "Zeiss Sigma HD Field Emission Gun SEM". Ar gyfer delweddu, y foltedd cyflymu oedd 5kV, cerrynt archwilio oedd <100 pA a defnyddiwyd pellter gweithio o tua 5mm. Ar gyfer mesuriadau maint a photensial zeta defnyddiwyd zetasizer Malvern Nano ZS. Er mwyn cael mesuriadau trachywir maint cymerwyd 3 mesuriad o 14 is-rediad tra ar gyfer y potensial zeta roedd 3 mesuriad yr un yn cynnwys 100 o is-rediadau. I fesur effeithiolrwydd mewngapsiwleiddio Dox cafodd 100µl o'r NGau eu hydoddi mewn DMSO a'r amsugnedd ei fesur a'i gymharu yn erbyn cromlin safonol a gynhyrchwyd gyda crynodiadau hysbys o Dox.

2.3.3 Arbrofion clymu HER2

Tyfwyd celloedd mewn dysglau MatTek nes cyrraedd cydlifiad o 70%. Wedi hynny, cafodd y dysglau eu diferu a chafodd y celloedd eu trin â 500µg/ml PLGA-RhB-Tz488 wedi'u hydoddi mewn cyfrwng delweddu. Ar ôl 5 awr, lluniwyd y celloedd gan ddefnyddio microsgop cydffocal Leica SP5 a'n defnyddio llwyfan arbennig sy'n ail-greu amodau TC, yna proseswyd y data gan ddefnyddio FIJI. O'r pentyrrau-Z, cynhyrchwyd un ddelwedd gynrychiadol sy'n dangos yr arddwysedd uchaf i bob set o ddata ac addaswyd gosodiadau'r delweddau fesul un.

2.3.4 Endosytosis a cydleoli Dextran

Tyfwyd celloedd nes eu bod yn cyrraedd cydlifed o 70% ac yna eu trin ymlaen llaw gyda 75µg/ml Dextran647 yn cyfrwng llawn am 2 awr. Yna, golchwyd y celloedd 3x gyda chyfrwng cyflawn ac yna eu trin â 500µg/ml PLGA-Tz488 am 24 awr, erbyn yr amser yma fydd y Dextran647 wedi hel yn y lysosomau. Wedi hynny, golchwyd y celloedd â chyfrwng delweddu cyn eu delweddwyd ar y microsgop cydffocal gyda llwyfan sy'n ail-greu amodau TC (37° C, 5% CO₂.) Darganfuom y cyfernodau cydleoli Pearson a Manders trwy ddefnyddio ategyn BIOP JACoP ar gyfer imageJ, defnyddiwyd trothwy Otsu i osod y trothwy fflworoleuedd ar gyfer dadansoddiad JACoP (4). Mae'r ddau cyfernod yma yn rhoi arwydd o'r berthynas rhwng dau fflworoffor mewn delwedd. Yn fyr mae'r cyfernod Pearson yn mesur y berthynas rhwng arddwysedd y ddau fflworoffor a'r cydberthynas rhyngddynt. Mae cyfernod Manders ar y llaw arall yn edrych ar y gorgyffyrddiad rhwng dau fflworoffor mewn delwedd ac yn edrych ar pa ffracsiwn o un fflworoffor sy'n gorgyffwrdd gyda'r un arall. Fel cyfeiriad ar gyfer cydleoliad damcaniaethol uchaf; yn lle NGau cafodd celloedd eu trin â Dextran488 am 24 awr cyn cael eu golchi a delweddu. Drwy neud hyn caiff labelu'r llwybr endosytosis cyfan er mwyn rhoi syniad o sut mae ein NGau yn cael eu fewnoli i gymharu a'r dextran. Yna dangosir data cydleoli fel % o'r cydleoliad uchaf. Cynhyrchwyd gwerthoedd cydleoli o'r pentwr-z cyfan, fodd bynnag ar gyfer dadansoddi data rydym yn ystyried rhanbarthau 2µm i fyny o waelod y gell, ardal lle dylai'r celloedd fod ar eu hehangaf ac heb ymyrraeth o'r plât.

2.3.5 Blotio Western

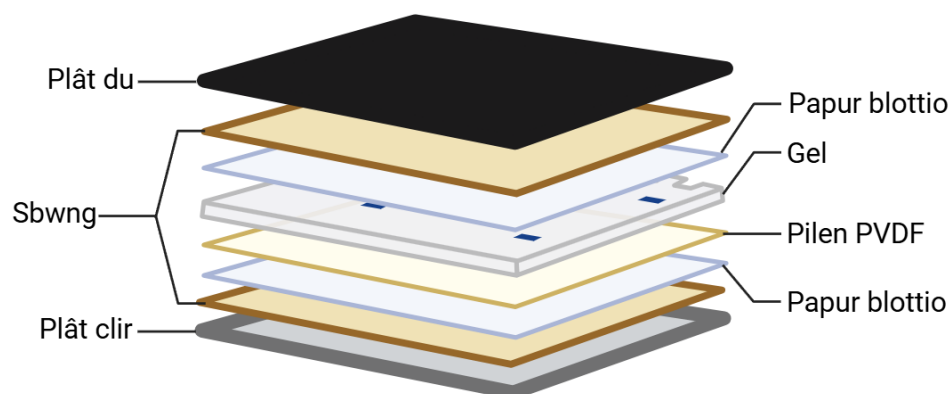
Tyfwyd celloedd i gydlifed o 70% mewn plât 6 ffynnon cyn eu trin am 7 awr gyda'u cyfansoddion priodol. Wedi hynny gosodwyd y platiau ar rew cyn eu golchi ddwywaith â PBS ddwywaith. Yn dilyn hyn cafodd y ffynhonnau eu diferu cyn ychwanegwyd 150µl o fyffer lysis NP-40. Yna rhoddwyd y platiau ar siglwr orbital am 5 munud cyn eu crafu o'r blât gyda chrafwr plastig. Yn dilyn hyn cafodd cynnwys y ffynhonnau ei bibeđu i mewn i diwbiau eppendorf wedi'u hoeri ymlaen llaw cyn eu hallgyrchu 13,000g am 10 munud at 4°C. Yna trosglwyddwyd yr uwchwaddodion i diwbiau eppendorf ffres wedi'u hoeri ymlaen llaw au cadw ar rew hyd y cam nesaf.

Pennwyd crynodiad protein y samplau trwy gynnal prawf BCA. Yn gwyno, cynhyrchwyd safonau protein albwmen serwm buchol (BSA) i roi cromlin safonol rhwng 0-1 mg/ml. Ar wahân, paratowyd hydoddiant gweithio BCA trwy gymysgu asid biochoninig a chopr sylffad phentahydrad mewn cymhareb 49:1. Yna cafodd 200µl o'r hydoddiant gweithio hwn ei bibeđu i bob ffynnon o blât 96 ffynnon er mwyn gallu rhedeg safonau a samplau yn driphlyg. Yna ychwanegwyd 10µl o sampl / safon yn uniongyrchol i'r ffynhonnau a chymysgwyd y plât yn ysgafn, rhag ofn nad oedd y samplau'n ffitio i mewn i ystod linol y cromliniau safonol fe wanhawyd nhw'n ymhellach nes iddynt ddisgyn o fewn yr amrediad. Unwaith yr oedd yr holl samplau wedi'u llwytho, deorwyd y plât at 37°C am 30 munud. Yn dilyn hyn, mesurwyd yr amsugnedd ar 560nm gan ddefnyddio Darllynydd Platiau Tecan infinite Mplex. O hyn cafodd crynodiadau protein y samplau eu dadansoddi a'u hafalu trwy ychwanegu mwy o fyffer lysis.

Yna ychwanegwyd byffer llwytho at y samplau mewn cymhareb 1:3 a chynheswyd y samplau at 95°C am 5 munud cyn eu dychwelyd dol i'r rhew. Cafodd samplau eu hallgyrchu'n fyr ar 13,000g 4°C am funud i hel y malurion cyn trosglwyddo'r uwchwaddod i diwbiau eppendorf oedd wedi'u hoeri ymlaen llaw. Yna llwythwyd gel anykDa BioRad i system electrofforesis gel BioRad a llenwyd y tanc â byffer rhedeg. Yna tynnwyd y crib gel a llwythwyd 4µl o ystôl brotein yn y ffynnon gyntaf. Yna llwythwyd samplau yn y ffynhonnau oedd yn weddill fel bod 50µg o brotein ym mhob ffynnon ac yna yn y ffynnon olaf llwythwyd 2µl o ystôl brotein. Yna cafodd y tanc ei gydosod yn llawn ac yna rhedwyd yr electrofforesis gel ar 100V am tua 1.5 awr. Wedi hynny cafodd y tanc ei ddadosod a'r gel wedyn ei socian yn y byffer trosglwyddo am 5 munud i gydbwysoli.

Tra roedd y gel yn glychu , cafodd y bilen PVDF ei gosod mewn 100% methanol a gweddillion y frechdan drosglwyddo wedi'u gwlychu mewn byffer trosglwyddo. Ar ôl i'r gel gydosodi, cafodd y frechdan drosglwyddo ei chydodod (Ffigur 2-3) a'i gosod yn y tanc trosglwyddo ynghyd â bloc iâ a thröydd magnetig. Yna cafodd y tanc ei lenwi â byffer trosglwyddo a'i osod i redeg ar 100V am awr wrth ei droi ar gyflymder isel. Wedi hynny dadosodwyd y frechdan a thocio'r bilen PVDF cyn cael ei blocio mewn 5% llefrith-TBST (Tris-buffered saline gyda 0.1% Tween-20) dros nos at 4°C.

Gwelir y fformiwlâu ar gyfer y byfferau mewn Tabl 2-3.



Ffigur 2-3: Sgematig o sut mae'r frechdan drosglwyddo'n cael ei gydosod o sawl haen wahanol

Tabl 2-3: Fformiwlau'r wahanol byfferau a chafodd eu ddefnyddio ar gyfer blottio

Byffer	Cemegion	Cyfanswm
Byffer NP-40 1x	NaCl (150mM) Tris-Bâs (50mM) dH ₂ O Newid pH i 8 wedyn ychwanegu dH ₂ O er mwyn cyrraedd 49.5ml NP-40 (1% v/v)	438.3mg 302.85mg i 45 ml 500µl
Byffer Samplau 4x	SDS (8% w/v) Glycerol (40% w/v) Glas Bromophenol (0.08% v/v) Tris-HCL (0.25M) dH ₂ O Newid pH i 6.8 wedyn ychwanegu dH ₂ O er mwyn cyrraedd 40ml	4g 25g 4ml 1.97g i 38ml
Byffer Llwytho 1x	Byffer Samplau Hydoddiant 2M DTT	800µl 200µl
Byffer Trosglwyddo 1x	Glycine (150mM) Tris-Bâs (20mM) Methanol (20% v/v) dH ₂ O	25g 4.9g 400ml i 2L
TBS 10x	NaCl (1500mM) Tris-Bâs (200mM) dH ₂ O Newid pH i 7.6 wedyn ychwanegu dH ₂ O er mwyn cyrraedd 1L	80.06g 24.23g i 800ml
TBST	TBS 10x dH ₂ O Tween-20 (0.1% v/v)	100ml 899ml 1ml

Y bore canlynol deorwyd y bilen â'r prif wrthgorff (wedi'i wanhau â 2% llefrith-TBST) am 1 awr ar dymheredd yr ystafell ac yna'n cael tri golchiad 5 munud yn TBST. Wedi hynny, deorwyd y bilen â'r gwrthgorff eilaidd (wedi'i wanhau â 2% llefrith-TBST) am awr ar dymheredd ystafell ac yna unwaith eto yn cael tri golchiad 5 munud gyda TBST.

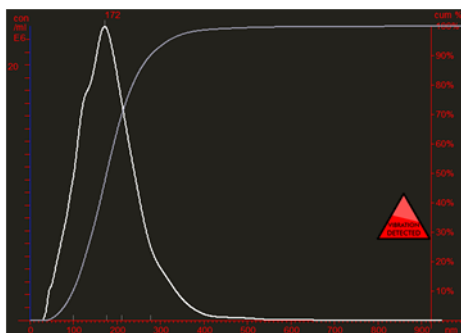
Cyflawnwyd yr holl olchiadau a deoriadau ar siglwr orbital a osodwyd ar gyflymder isel. I ddelweddu'r bandiau protein defnyddiwyd swbstradau Pierce ECL neu WestFemto ECL.

Cymysgwyd yr hydoddiannau gwella luminol a pherocsid o fewn y citiau hyn gyda'i gilydd mewn cymhareb 1:1 i roi cyfanswm o 1ml a oedd wedyn wedi'i wasgaru'n gyfartal dros y bilen a'i adael am 5 munud. Wedi hynny, delweddwyd y pilenni gan ddefnyddio BioRad Chemidoc XRS a'u meintioli yn defnyddio imageJ.

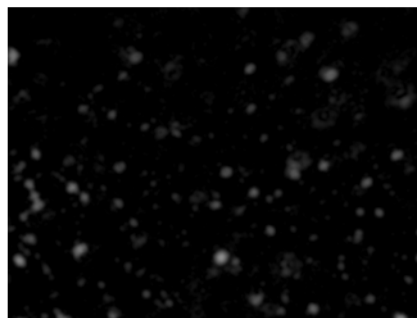
2.4 Dadansoddi Effaith Valens Nanoronnau ar y Bilen Blasma

2.4.1 Addasu falensau'r NGau i Tz

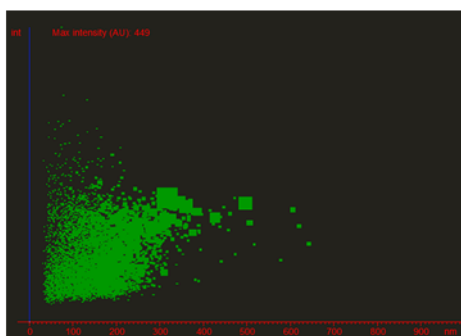
Cynhyrchir yr NGau yn union fel disgrifir uchod. Tro yma cyn addurno gydag Tz, cyfrir nifer yr NGau trwy ddefnyddio Nanosight LM10 (Ffigur 2-4). Yna rhannwyd y NGau i bedwar rhan gyfartal (1ml), cadwyd un fel y PLGA-Dox tra defnyddiwyd y gweddill wedyn i wneud y PLGA-Dox-10Tz, PLGA-Dox-30Tz a'r PLGA-Dox-50Tz. Cyflawnwyd y cydgysylltiad trwy hydoddi 5.7mg N-Hydroxysuccinimide (NHS), 19.2mg o 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) mewn fflasg oedd yn cynnwys 2ml o ddŵr. Cadwyd y fflasg ar rew a'i fflysio'n barhaus â nitrogen. Yna ychwanegwyd 1ml o'r NGau a ddyfynnwyd a'r swm cyfatebol o Tz a chaniatawyd i'r adwaith fynd ymlaen am 3 awr. Ar gyfer y PLGA-Dox-10Tz, PLGA-Dox-30Tz a'r PLGA-Dox-50Tz y gymhareb NG:gwrthgorff yn yr hydoddiant oedd 1:10, 1:30, ac 1:50 yn y drefn honno. Wedi hynny ailsefydlwyd y crynodiad NGau gan ddefnyddio'r Nanosight LM10. Ar gyfer NGau fflwroleuol defnyddiwyd Tz488 yn lle'r Tz di-label.



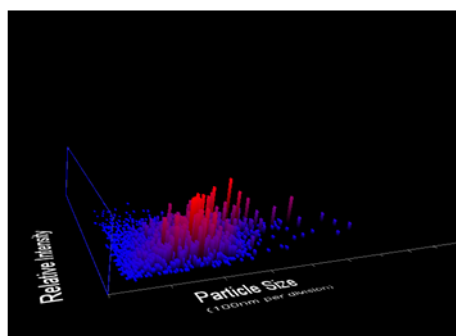
Particle Size / Concentration



Sample Video Frame



Particle Size / Relative Intensity



Particle Size / Relative Intensity 3D plot

Operator:
Sample:
Video File: 3.avi analysis no: 001
Date/Time of Report: 10/12/2024 14:46:33
Dispersant/Diluent:
Concentration:
Pre-treatment:
Remarks:

RESULTS:
Size Distribution: Mean: 186 nm, Mode: 172 nm, SD: 74 nm
Cumulative Data (nm): D10: 100, D50: 177, D90: 277, D70: 212
User Lines: 0 nm, 0 nm
Total Concentration: 211.39 particles / frame, 35.73E8 particles / ml
Selected Concentration: 0.00 particles / frame, 0.00E8 particles / ml
Fitted Curve : Mean: 0 nm, SD: 0
Completed Tracks: 6003
Drift Velocity: 583 nm/s

Ffigur 2-4: Esiampl o'r allddarlleniad sydd yn cael ei cynhyrchu gyda Nanosight LM10. Yn yr achos yma cafodd 35.78×10^8 o NGau eu cyfri mewn hydoddiant oedd wedi ei wanedu 200x.

2.4.2 Delweddu actin â SiR Actin

Cafodd celloedd eu tyfu mewn dysglau MatTek a'u tyfu mewn cyfrwng cyflawn nes cyrraedd cydlifiad o 70% cyn eu golchi 3x a'i trin gyda 250µM **SiR Actin** mewn 1ml am 4 awr yn dilyn cyfarwyddiadau'r gwneuthurwyr. Yn dilyn hyn cafodd y dysglau eu diferu ar celloedd ei rhoi mewn cyfrwng di-serwm am awr er mwyn eu llwgu. Er mwyn ysgogi EGFR a ffurfio crychau ychwanegwyd cyfrwng di-serwm yn cynnwys 50nM EGF; defnyddwyd celloedd a chofodd eu trin gyda cyfrwng llawn yn hytrach na EGF fel y rheolydd.

I astudio effaith yr NGau cafodd y celloedd eu tyfu ar dysglau MatTek fel disgrifir uchod i gyrraedd cydlifiad o 70% cyn eu golchi a'u trin gyda 1ml o 100nM SiR-Actin am 6 awr. Yn dilyn hyn cafodd 1ml o NGau (1mg/ml) eu ychwanegu i rhoi crynodiad terfynol o 500µg/ml ochr yn ochr a 50nM o'r staen SiR-Actin mewn y dysgl. Ar ôl 24 awr cafodd yr celloedd eu golchi gyda cyfrwng delweddu cyn cymeryd pentyrrau z gyda'r microsgop cydffocal SP5.

2.4.3 Defnyddio Tz488 a NGau-Tz-488 i ddelweddu'r bilen blasma

Cafodd celloedd eu tyfu mewn dysglau MatTek a'u tyfu mewn cyfrwng cyflawn nes cyrraedd cydlifiad o 70%. Wedi hynny, trinwyd y celloedd gyda 500µg/ml NGau gwahanol am 10 munud cyn anweithredu gyda PFA am 20 munud. Ar ôl hyn cafodd y celloedd eu golchi gyda PBS 3x a'u trochoeri gyda 20nM amoniwm clorid. Triniwyd y celloedd wedyn gyda 50nM Tz488 mewn PBS am awr cyn eu golchi 3x a'u gadael mewn PBS a delweddu gyda microsgop cydffocal Leica SP5. Defnyddwyd FIJI i brosesu'r data a'r ategyn "3D Viewer" i dangos y data mewn 3D.

2.4.4 Dadansoddi Crychu ar Gelloedd

Cafodd celloedd eu tyfu mewn dysglau MatTek a'u tyfu mewn cyfrwng cyflawn nes cyrraedd cydlifiad o 70%. Wedi hynny, golchwyd y celloedd a'u gadael mewn cyfrwng delweddu am 1 awr cyn dechrau'r arbrawf er mwyn tarfu cyn lleied â phosibl ar y celloedd o ganlyniad i newid cyfryngau. Yn dilyn hyn cafodd y dysglau eu diferu ac wedyn y celloedd eu trin â 1x CellMask DeepRed am 10 munud cyn eu golchi dair gwaith gyda chyfrwng delweddu. Yna cafodd y celloedd eu trin naill ai â chyfrwng yn unig neu NGau â falensau gwahanol gyda'r delweddu cydffocal yn dechrau yn syth ar ôl y driniaeth ac yn rhedeg am 10 munud, gyda ffrâm yn cael ei chymryd bob 4.92 eiliad. Ar gyfer y triniaethau NGau, sefydlwyd faint o NGau sydd fewn 2ml (500µg/ml) o NGau PLGA yn defnyddio'r Nanosight LM10. Wnaethom defnyddio'r nifer yma wedyn i sicrhau fod nifer cyfartal o NGau yn cael ei ddefnyddio i trin pob dysgl. Er mwyn dangos cyfradd y newid dros y cyfnod delweddu defnyddiwyd dau dechneg. A: cyfunwyd y ffrâm gychwynnol, a dangosir yn y gwyrdd gyda gweddill y recordiad yn gydamserol, mewn coch. O ganlyniad roedd o'n bosib gweld ffinoteip y celloedd ar dechrau'r recordiad mewn wyrdd, gyda pob newid o'r gwaelodlin mewn coch (2). Dangoswyd fframiau a oedd wedi cymryd pob 2 munud ochr yn ochr a llun a gynhyrchwyd yn defnyddio'r gorchymyn "temporal hyperstack" ar imageJ. Mae'r gorchymyn yma'n creu delwedd sydd wedi'i liwio'n seiliedig ar ffrâm amser sy'n caniatáu gweld pa bryd mae'r newidiadau ar draws y bilen blasma yn digwydd.

Er mwyn hel y data 3D cafodd yr arbrawf ei ail-wneud ond tro yma defnyddiwyd y sganiwr atseiniol yn microsgop cydffocal i gasglu data. Roedd hyn yn caniatáu i

pentyrtau Z cael eu cymryd mewn amser byr (<30 eiliad i pob un o'i gymharu â x eiliad). Cafodd y celloedd ei delweddu unwaith eto'n syth ar ôl triniaeth. Yna cafodd y recordiad llawn ei brosesu ar imageJ. Yn gyntaf, defnyddiwyd yr ategyn "bleach correction" i gydbwysu'r disgleirdeb ar draws y recordiad, ac yn dilyn hyn defnyddiwyd yr ategyn "correct 3D drift" i sefydlogi'r recordiad. Ar gyfer y recordiadau 3D gwnaed yr holl driniaethau yn union yr un fath a'r rhai 2D disgrifir uchod ond gwnaed y delweddu yn wahanol. Ar gyfer delweddu, defnyddiwyd sganiwr cyseiniant y microsgop cydffocal i recordio pentyrtau-Z yn gyflym, a chaniataodd hyn i ni recordio pentyrtau-Z llawn tua bob 11 eiliad. Cafodd delweddau eu prosesu yn yr un ffordd â'r recordiadau 2D gydag un cam ychwanegol. I'r delweddau 3D gwreiddiol defnyddir yr ategyn "3D Viewer".

I prosesu'r delweddau PLGA-30Tz 3D ymhellach gyda fwy o manylder defnyddiwyd y gorchymyn "interactive animation" fel rhan o'r ategyn "3D Script" ar imageJ. Er mwyn cael yr manylder uchaf fe wnaeth yr Athro Pete Watson a Dr Anthony Hayes, o Ysgol Ffiwyddorau Prifysgol Caerdydd, brosesu'r data PLGA-30Tz ymhellach gan defnyddio'r meddalwedd Bitplane Imaris.

2.4.5 Delweddu Crychau gyda Microsgob Electron Sganio (MES)

Ar gyfer delweddu MES, tyfwyd celloedd SKBR3 a MCF7 ar arwydrau mewn plat x ffynon nes cyrraedd cydlifiad o 70%. Yna cawsant eu golchi 3x gyda PBS a'i anweithredu gan ddefnyddio 2% glutaraldehyde am 30 munud. Wedi hynny, golchwyd y celloedd eto 3x â PBS ail-anweithredu y celloedd gydag 1% osmiwm tetrocsid. Wedi golchi eto 3x gyda PBS cawsant eu dadhydradu gyda golchiadau cyfres o 10 munud mewn crynodiadau cynyddol o ethanol (wedi'i wanhau â dŵr) at dymheredd ystafell gan ddechrau gyda 50% wedi'i ddilyn gan 75%, 95% ac yn olaf tri golchiad mewn ethanol pur. Yn dilyn hyn cawsant eu dadhydradu ymhellach gan ddefnyddio golchiadau 10 munud mewn crynodiadau cynyddol o Hexamethyldisilizane (HMDS) (wedi'i wanhau ag ethanol) at dymheredd ystafell gan ddechrau ar 50% ac yna 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ac yn olaf tri golchiad gyda HMDS pur. Yn dilyn hyn, diferwyd y HMDS dros ben a chafodd yr arwydrau eu hawyrsychu ac yna eu gorchuddio ag aur-palladiwm gan ddefnyddio BioRad SC-500 gydag argon ar gyfer plasma. Wedi hynny gosodwyd y samplau ar fewnosodiadau llwyfan alwminiwm cyn eu delweddu gyda "Zeiss Sigma HD Field Emission Gun SEM" yn gyntaf o dan oruwchwyliath Dr Duncan Muir yn yr Ysgol Gwyddorau'r Ddaear a'r Amgylchedd Prifysgol Caerdydd.

2.4.6 Hyfywdra Celloedd

Yn dilyn ur un camau a'r hyn sydd wedi ei gyhoeddi gan y grŵp (5), roedd angen optimeiddio y nifer addas o gelloedd oedd eu hanhen i wneud yr arbrawf cyn i ddwysedd y celloed ar y blat fynd yn ehy uchel ac arwain at eu marwolaeth. Cafodd 100µl o gelloedd eu hadu ar nifer o wahanol ddwyseddau ar draws plât 96 ffynnon (500 i 10,000 cell) a'u gadael i dyfu am 2 ddiwrnod. Ar ôl 2 ddiwrnod rhoddwyd 100µl ychwanegol o gyfrwng i'r celloedd ac ar ôl 3 diwrnod arall archwiliwyd y ffynhonnau o

dan ficrosgop golau. Yna penderfynwyd y dwysedd o gelloedd i ychwanegu ar gyfer y profion hyfywedd gan ba ffynhonnau oedd wedi cyrraedd cydlifiad o 70% erbyn y cam hwn. I benderfynu ar y swm gorau posibl o adweithydd “CellTiter Blue” i ddefnyddio cafodd y ffynhonnau eu gwagio, 100µl o gyfryngau eu hychwanegu a chyfeintiau gwahanol o (5, 10, 15 neu 20µl) i benderfynu ar y gymhareb signal-sŵn ar gyfer y prawf.

Ar gyfer y prawf ychwanegwyd 4000 o gelloedd mewn 100µl o cyfrwng llawn i bob ffynnon plât du 96 ffynnon a'u gadael i dyfu am 48 awr. Yna ychwanegwyd 100µl o ddwbl y crynodiadau triniaeth i'r ffynhonnau fel bod eu crynodiad yn gwanhau 50% i'r crynodiad olaf. Ar ôl 72 awr amnewidiwyd y triniaethau am 100µl o gyfryngau ffres ac yna ychwanegwyd 10µl ychwanegol o adweithydd “CellTiter Blue” i bob ffynnon. Yna dychwelwyd y plât i'r deorydd am 4 awr cyn i'r fflworoleuedd gael ei fesur (560ex/590em) gan ddefnyddio darllynydd plât Tecan. Graddiwyd triniaethau NGau gwahanol yn seiliedig ar grynodiad y doxorubicin wedi'i amgáu, penderfynwyd bod crynodiad Tz yn cyfateb i'r crynodiad Tz uchaf o fewn ffynhonnau'r NGau. Fel rheolwyr defnyddiwyd dox neu NGau PLGA ar ei ben ei hunain gan ddefnyddio DMSO fel rheolydd gwanedydd. Cafodd y data o'r TECAN brosesu'n defnyddio'r meddalwedd Graphpad gyda prawf ANOVA dwyffordd yn cael ei ddefnyddio i mesur arwyddocâd ystadegol ($p < 0.05$).

2.5 Ffynonellau

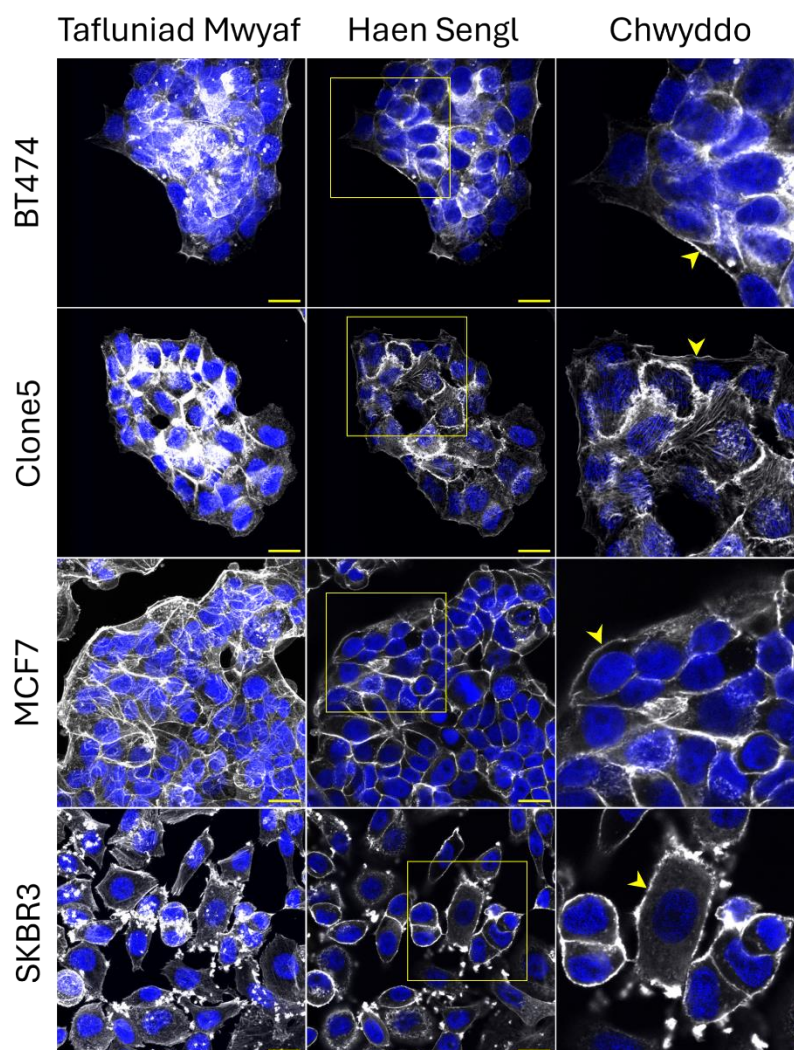
1. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Basic Clin Res*. 2010 May 20;4:35–41.
2. Kute T, Lack CM, Willingham M, Bishwokama B, Williams H, Barrett K, et al. Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2004 Feb;57(2):86–93.
3. Broad DepMap. DepMap 24Q4 Public [Internet]. 2024. Available from: https://plus.figshare.com/articles/dataset/DepMap_24Q4_Public/27993248
4. Otsu N. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. 1979 Jan;9(1):62–6.
5. Alsulaimany M, Keniya MV, Alanazi RS, N Ruma Y, Hughes CS, Jones AT, et al. Exploring Long Arm Amide-Linked Side Chains in the Design of Antifungal Azole Inhibitors of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51). *J Med Chem*. 2025 June 12;68(11):10781–99.

3 Cynhyrchu Proffiliau Endocytig o Ein Modelau Cell

Gan fod gwahanol fodelau celloedd yn dangos llawer iawn o amrywiaeth yn eu llwybrau endocytig, y cam cyntaf oedd mapio'r rhain gan ddefnyddio techneg mae ein grŵp yn ei alw'n "broffilio endocytig" (1). I grynhoi, mae hyn yn cynnwys defnyddio technegau imiwno-ffloroleuol i amlygu gwahanol gydrannau'r llwybr endocytig sydd wedyn ,gyda'i gilydd, yn rhoi darlun cyflawn o'u dosbarthiad, maint a morffoleg. Gan fod y gwaith hwn yn cwmpasu nifer o wahanol fodelau celloedd, roedd o'n hefyd yn caniatáu i ni ymgyswrtio â delweddu pob un o'r modelau celloedd a pha bynnag her y gallent ei chyflwyno, mae clystyrau trwchus celloedd BT474 a Clone5 er enghraifft yn gwneud delweddu'n anodd gan y bydd clystyrau o faint penodol yn gwasgaru'r laser (Ffigur 3-1). Daw hyn yn weladwy fel rhanbarthau tywyll yng nghanol y clystyrau pan gaiff ei arsylwi fel haen sengl. Roedd cynhyrchu proffil endocytig hefyd yn caniatáu i ni asesu sut y gall y gwahanol forffolegau o fewn rhai mathau o gelloedd gyflwyno eu hunain. Gwelir yr enghraifft fwyaf amlwg o hyn yng nghelloedd SKBR3, mae mwyafrif y celloedd yn fach ac yn sfferig tra bod rhai celloedd yn sylweddol fwy gyda rhanbarth cytosolig mwy amlwg. Gall y celloedd hyn cael eu gwahaniaethu'n hawdd o'r celloedd tebyg i leiniau oherwydd hyn fel y gwelir yn Ffigur 3-1. Mae celloedd MCF7, ar y llaw arall, yn tueddu i dyfu mewn llenni hir sy'n ymledu'n hydredol yn hytrach nag yn fertigol ac sydd ar y cyfan yn llawer mwy cysylltiedig na chelloedd SKBR3.

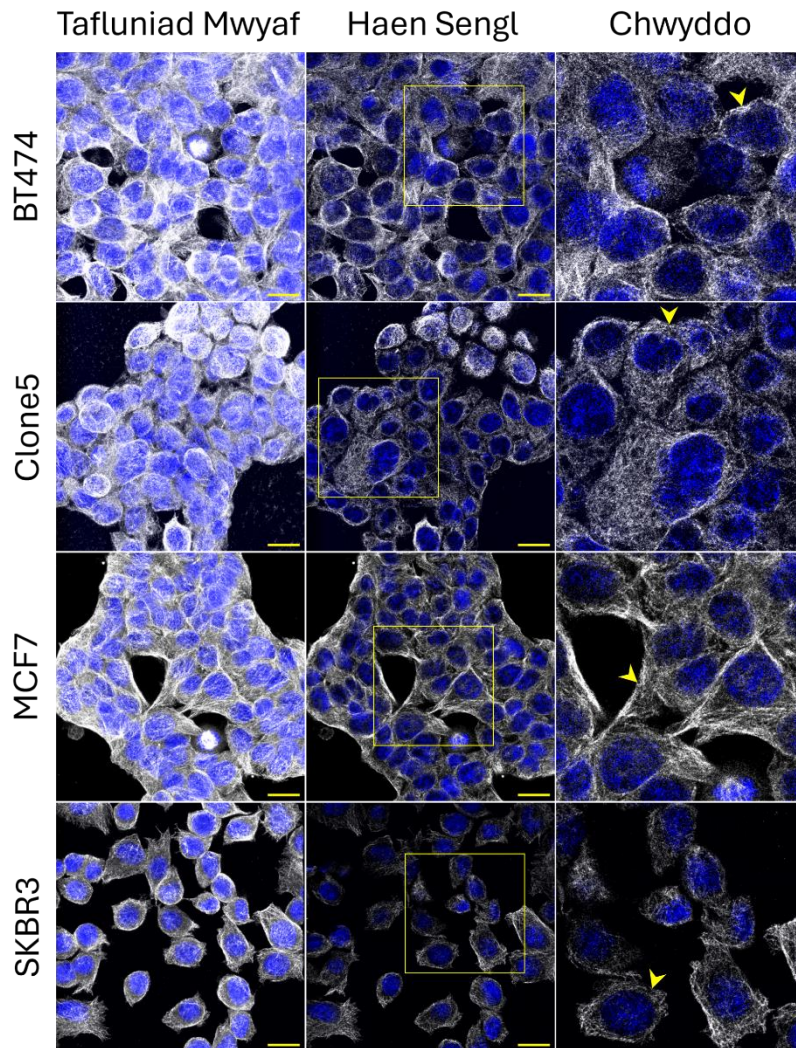
Amcanion y bennod hon oedd:

- Creu proffiliau endocytig unigryw ar gyfer ein modelau cell
- Labelu a puro Tz-488



Ffigur 3-1: Dosbarthiad actin (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron, gwelir fod o wedi crynodi ar y bilen fel dangosir gan y saethau melyn. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm

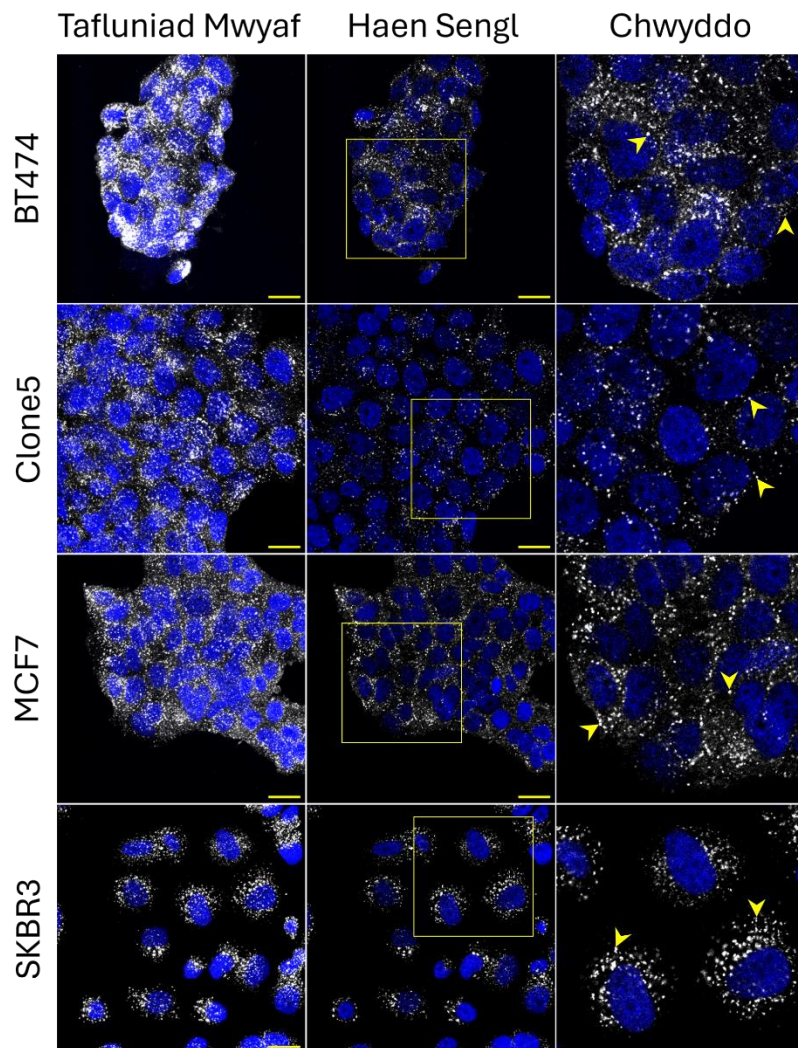
Roedd y staen actin yn amrywio ar draws y gwahanol linellau celloedd. Amlygwyd actin cortigol ar draws yr holl linellau celloedd, fel denodir gan y saethau melyn (Ffigur 3-1), tra yn y celloedd Clone5 gellid gweld rhai ffibrau straen. Ar gyfer y celloedd SKBR3 gwelwyd rhanbarthau o allwthiadau pilen cyfoethog mewn actin (Ffigur 3-1). Trwy gyd-liwio â Hoechst i amlygu'r cnewyllyn gellir arsylwi cyfran y gell sydd wedi'i meddiannu gan hwn ac mae'n rhoi syniad o gyfaint y gell sy'n cytoplasm, lle byddem yn dod o hyd i weddill y targedau endocytig. Mae hefyd yn dangos sut y gall maint celloedd BT474 a Clone5 ymddangos yn amrywiol iawn oherwydd natur 3D eu tyfiant.



Ffigur 3-2: Dosbarthiad tiwbwlin (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron gyda'r saethau yn dangos esiamplau o tiwbwlin wedi crynodi ar bilen y celloedd. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-lliwio'r chwylllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm

Ar ôl delweddu'r actin er mwyn cwblhau mapio'r cytosgerbwd, y cam nesaf oedd lliwio tiwbwlin. Mae'r ddwy gydran gyda'i gilydd yn chwarae rhan hanfodol mewn endocytosis (2,3). Mae ailfodelu actin yn hanfodol ar gyfer macropinocytosis ac mae hefyd yn chwarae rhan hanfodol mewn mathau eraill o endocytosis. Mae cargo yn cael ei fewnosod i fesiglau sydd wedyn yn teithio ar hyd y rhwydwaith tiwbwlin i'w dddoli a'i brosesu ymhellach (4). Yn ffigur 3-2 gellir gweld y rhwydwaith tiwbwlin ar draws y gwahanol linellau celloedd. Gyda'i gilydd, nid oes unrhyw wahaniaeth amlwg rhyngddynt gyda llinynnau tiwbwlin unigol clir i'w gweld ar draws pob delwedd.

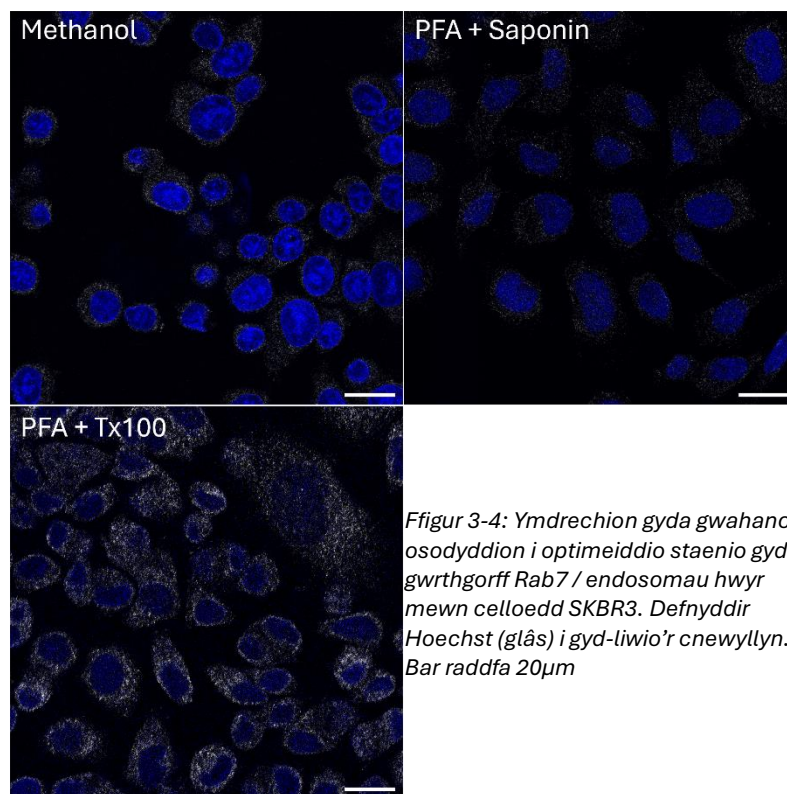
Tu allan i'r cytosgerbwd beth bynnag mae yna llawer o proteinau wahanol gyda swyddogaeth bwysig iawn yn endocytosis. Fel y gwelir yn ffigur 1-9 y mae ambell o rhain yn cael eu darganfod yn yr endosomau, y gyrchfan gyntaf yn aml i rhywbeth sy'n cael ei fewnoli yw'r endosomau cynnar, mae rhain yn cael eu gwahaniaethu o endosomau eraill gan y cyfoeth o'r protein EEA1 sydd ar ar y pilen (5,6). O ran mewnosod nanoronynnau, mae'n bwysig edrych ar yr endosomau i asesu a ydynt yn cael eu dylanwadu gan yr nanoronynnau yn dilyn mewnosod. Yn wir, ar draws ein celloedd mae gwahaniaethau yn nosbarthiad yr endosomau. Er nad yw'n unffurf ar draws y holl boblogaeth, y duedd gyffredinol i'r celloedd SKBR3 yw bod yr endosomau yn casglu i un ochr o'r gell (Ffigur 3-3). Ymddengys bod gan y MCF7 a'r Clone5 ddosbarthiad mwy cyfartal ar draws y gell gyfan, tra yn y celloedd BT474 mae'n ymddangos bod yr endosomau yn fwy clystrog.



Ffigur 3-3: Dosbarthiad EEA1/endosomau cynnar (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron, gelir endomsoau cynnar unigol wedi dynodi gan y saethau. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm

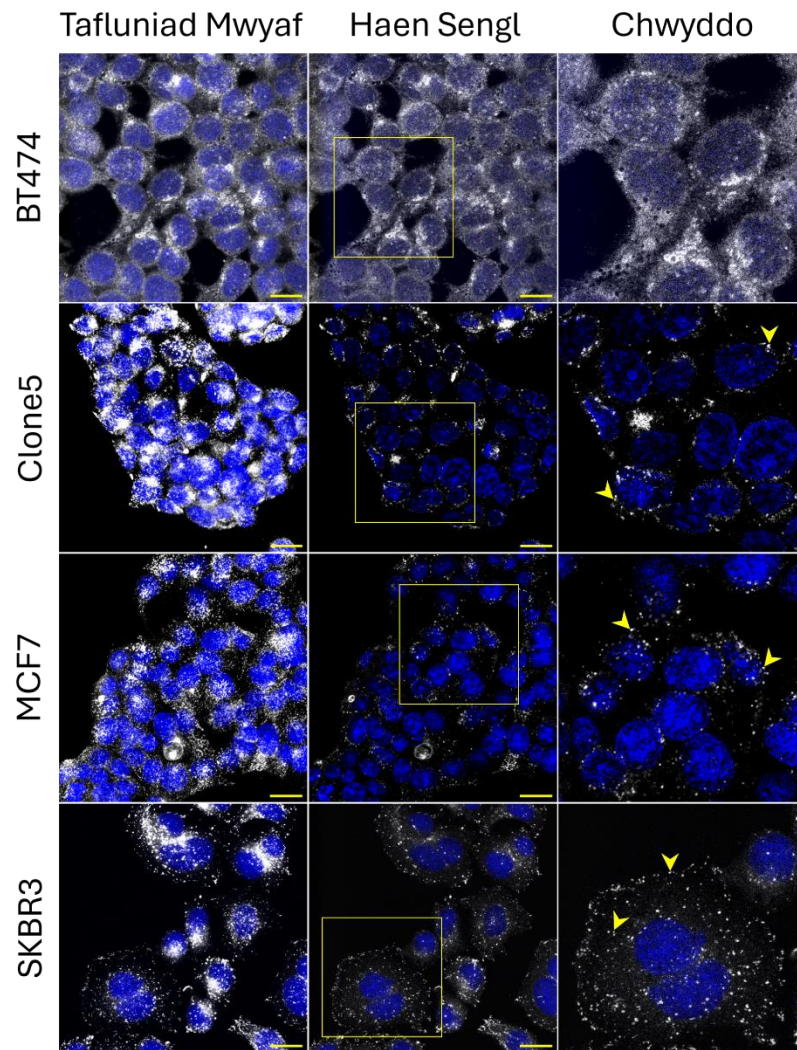
Ar ôl delweddu dosbarthiad yr endosomau cynnar, penderfynon ni symud ar hyd y llwybr endocytig, yn dilyn siwrna cargo yn aml, a ffocysu ar yr endosomau hwyr sydd yn gyfoethog mewn Rab7. Er mwyn amlygu gwahanol gydrannau'r llwybr endocytig, defnyddiwyd protocol tebyg ar gyfer pob un. Fel y disgrifiwyd yn gryno yn flaenorol, defnyddiwyd yr un byffer blocio a gwanhawr gwrthgorff (2% BSA, 2% FBS mewn PBS) ar draws pob sampl. Fodd bynnag, yn dibynnu ar y gosodiad a ddefnyddiwyd, cafodd hyn

effaith ar y toddiannau golchi fel yr amlinellwyd yn flaenorol yn y bennod dulliau. Yr eithriad i hyn oedd gyda'r gwrthgorff ar gyfer Rab7 sydd wedi ei leoli ar endosomau hwyr a lysosomau. I geisio optimeiddio'r gwrthgorff, defnyddiwyd sawl wahanol osodiadau, asiantau athreiddiad a byfferau (Ffigur 3-4). Yn anffodus, ni chynhyrchodd yr un o'r rhain welliant amlwg. Yn gyffredinol, roedd gan y delweddau fflworoleuedd cefndir eithaf cryf gyda signal cytosolig yn hytrach nag un mwy fesiglaidd. Oherwydd hyn, ni fu ymdrechion pellach gyda'r gwrthgorff yma ac yn hytrach anelu i labelu'r lysosomau.

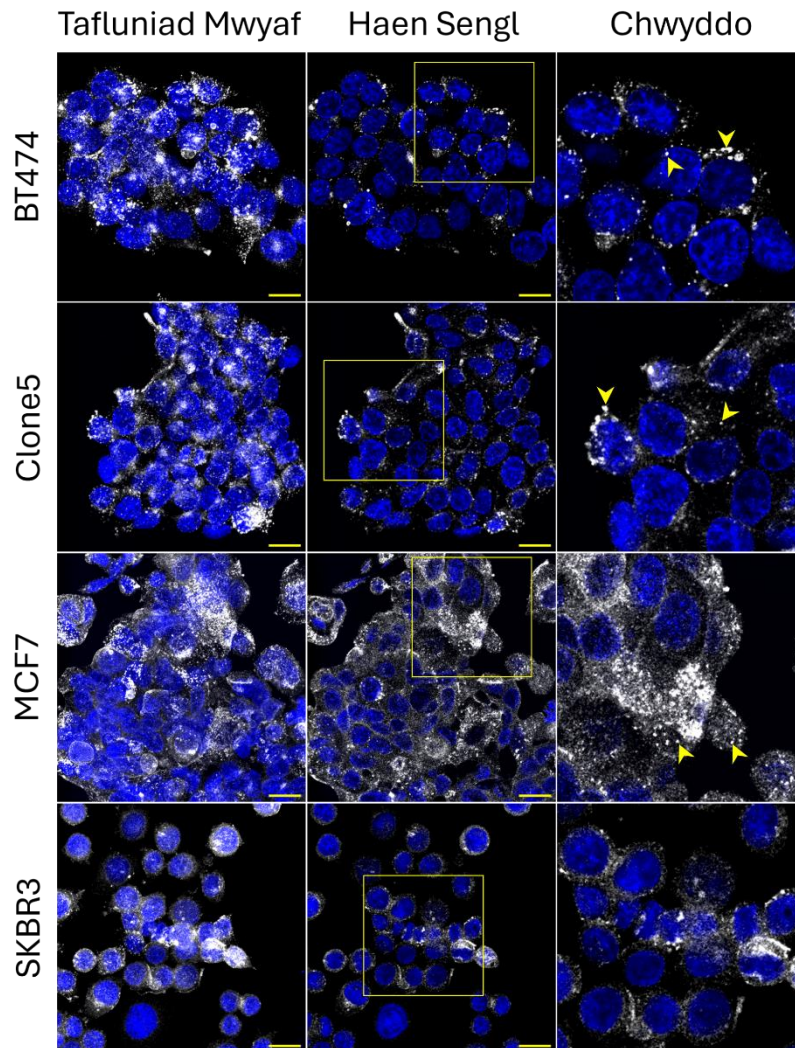


Yn dilyn yr endosomau hwyr benderfynon i barhau dilyn yr llwybr endosomal ac edrych ar lleoli'r lysosomau. Mae rhain yn cael eu adnabod o mynegiant uchel o'r teulu protein LAMP felly ar gyfer eu delweddu defnyddiwyd cyfuniad o staenio LAMP II a III (Ffigyrau 3-5 a 3-6). Y rheswm dros gynnwys y ddau, oedd i gael darlun mwy cyflawn o ddosbarthiad

lysosomaidd ar draws ein holl linellau celloedd. Ar gyfer y staenio LAMP II, mae'n ymddangos unwaith eto fod gan gelloedd SKBR3 boblogaethau lle mae'r lysosomau ar un ochr i'r gell, yn ôl pob tebyg oherwydd y ffaith bod y cnewyllyn yn hawlio rhan fawr o gyfanswm cyfaint y gell. O ran y celloedd MCF7 a Clone5, maent hefyd yn dilyn patrwm tebyg i'r hyn a welwyd gyda'u staenio EEA1. Mewn cyferbyniad â hyn, dangosodd y celloedd BT474 lefelau llawer uwch o rwymo anbenodol gan wneud lleoleiddio isgellog yn anodd. Ar ôl staenio ar gyfer LAMP III, fodd bynnag, daeth y staenio lysosomaidd yn llawer mwy amlwg. Nawr gellid gweld bod y celloedd BT474 yn dilyn tuedd debyg i'r staenio EEA1. Yn ddiddorol, er bod y lysosomau yn dal i fod yn wahaniaethadwy, gwelwyd gradd uwch o rwymo anbenodol o fewn celloedd MCF7 ac SKBR3 o'i gymharu â'r staen LAMP II.



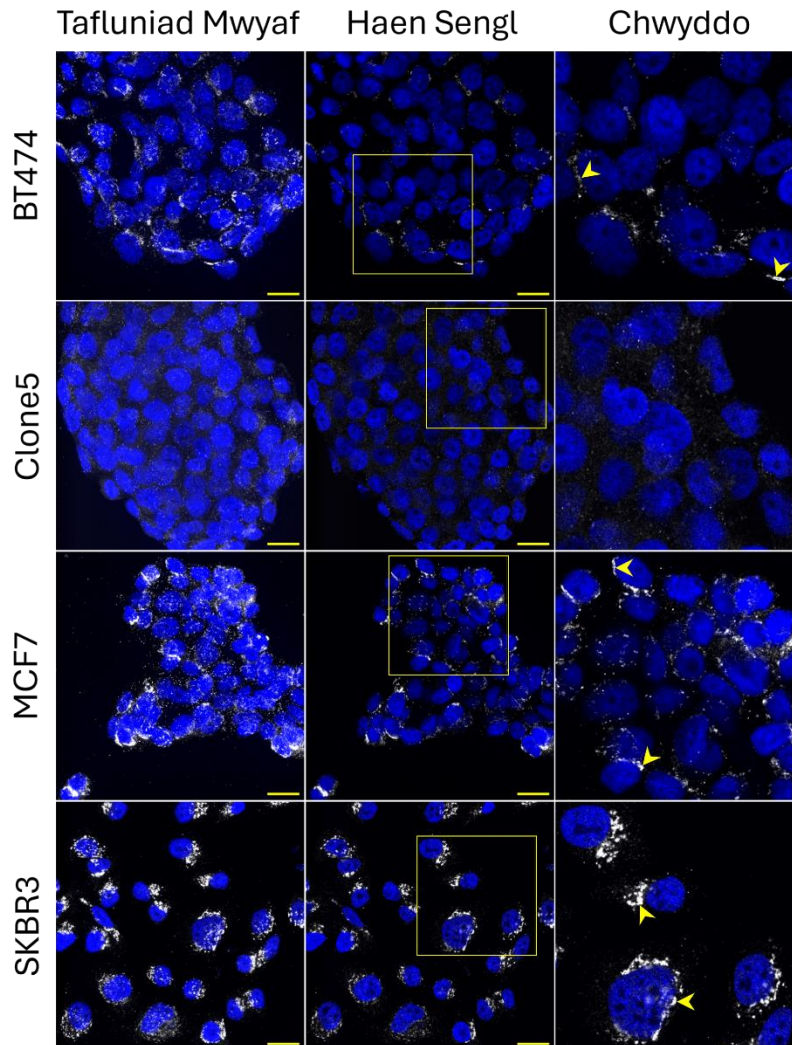
Ffigur 3-5: Dosbarthiad o'r lysosomau (gwyn) wedi'u staenio gyda LAMP II ar draws y modelau celloedd y fron, gwelir lysosomau penodol wedi'u dynodi gan saethau. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm



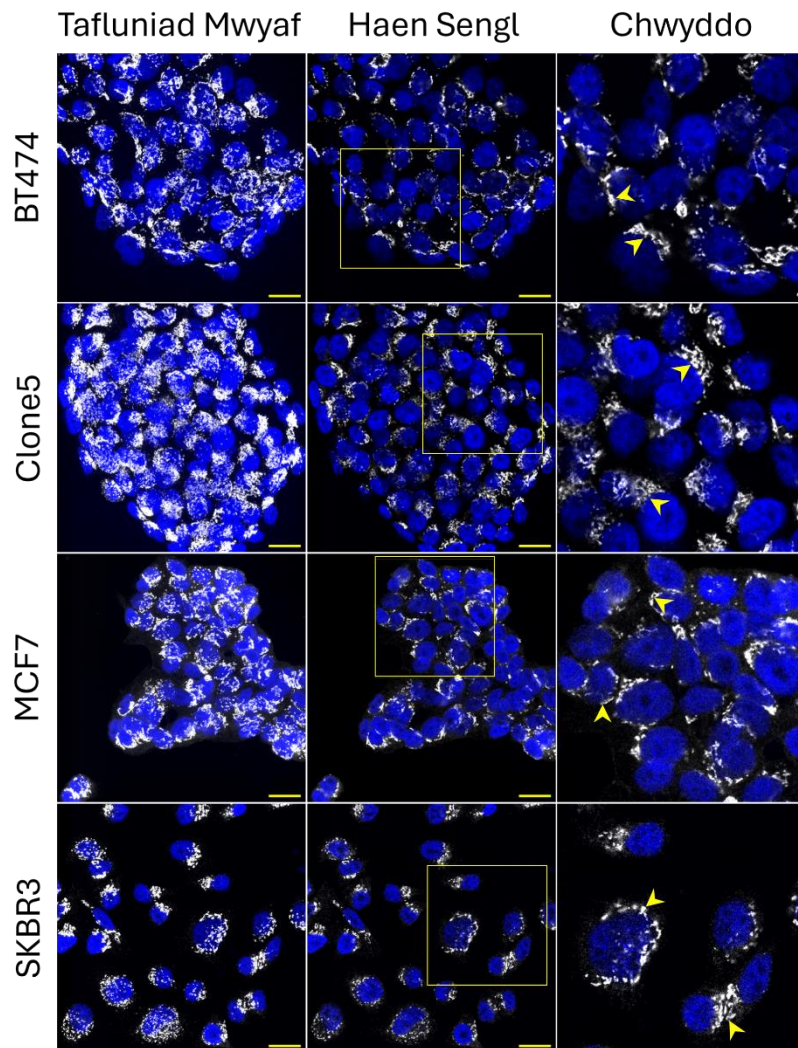
Ffigur 3-6: Dosbarthiad o'r lysosomau (gwyn) wedi'u staenio gyda LAMP III ar draws modelau celloedd y fron. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm

I gwblhau'r proffil endocytig, fe wnaethom penderfynu i orffen trwy staenio'r Golgi-cis a'r trans. Gan fod fesiglau'n cael eu cludo'n aml i'r Golgi i'w prosesu ymhellach yn seiliedig ar y cargo, penderfynwyd ei gynnwys yn ein proffil. Ar gyfer y Golgi-trans, ein marciwr oedd TGN46 (Ffigur 3-7) tra ar gyfer y Golgi-cis, labelwyd GM130 (Ffigur 3-8). Ar y cyfan, ac ar draws yr holl samplau, gwelwyd signal llawer mwy amlwg gyda'r staen GM130. Mae hyn yn fwyaf amlwg yn y celloedd Clone5 sy'n mynd o ddangos ychydig iawn o labelu Golgi-trans i'r strwythurau ddod yn llawer mwy amlwg. Gwelwyd hyn hefyd ar draws y celloedd BT474 ac MCF7. Yn y celloedd SKBR3, fodd bynnag, roedd staenio TGN46 yn unig yn ddigonol i bennu lleoliad y Golgi mewn lleiafrif o gelloedd, ond mae'r strwythurau

presennol hyn yn dod yn llawer mwy amlwg wrth edrych ar y staenio GM130 ac yn gyffredinol i'w weld yn dilyn dosbarthiad periniwclear ar draws ein celloedd..



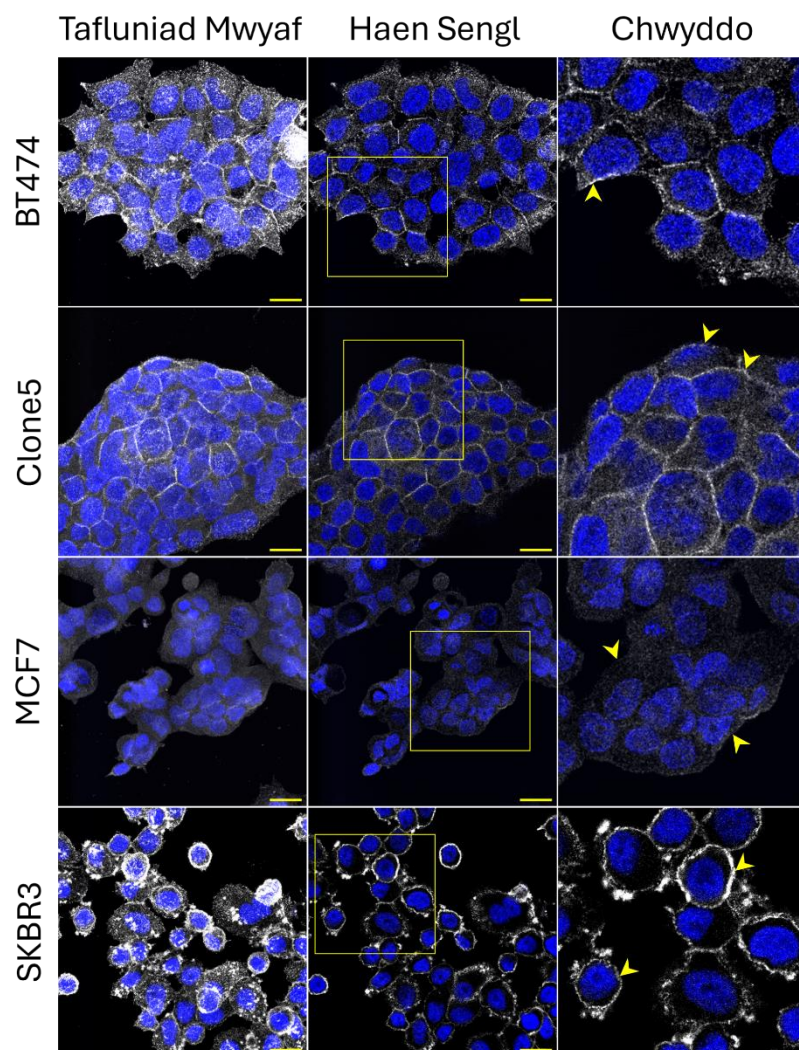
Ffigur 3-7: Dosbarthiad o'r Golgi-trans (gwyn), wedi staenio gyda gwrthgorff TGN46 ar draws modelau celloedd y fron. Lle posib dynodi'r gyda saethau. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm



Ffigur 3-8: Dosbarthiad o'r Golgi-cis (gwyn), wedi staenio gyda gwrthgorff G130 ar draws modelau celloedd y fron. Dynodir y Golgi gan saethau. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm

Nawr roeddwn ni wedi adeiladu ein proffiliau, ar gyfer yr arbrofion imiwno-fflworoleuedd terfynol, penderfynwyd labelu HER2 gan mai dyma oedd ein prif brotein o ddiddordeb a hefyd HER3 oherwydd ei rôl fel partner rhwymo delfrydol HER2. Er nad yw'n dechneg fwyaf cywir ar gyfer pennu mynegiant, mae hyn yn rhoi gwybodaeth i ni ynghylch lleoliad y derbynyddion ac o ran y HER2, lle byddem yn disgwyl i'n nanoronynnau rwymo. At ei gilydd, yn Ffigur 3-9 gellir gweld gradd uchel o staenio sy'n dilyn y bilen blasma yng nghelloedd BT474, Clone5 a SKBR3 sy'n cyd-fynd a hyn sy'n cael ei wybod am y protein.

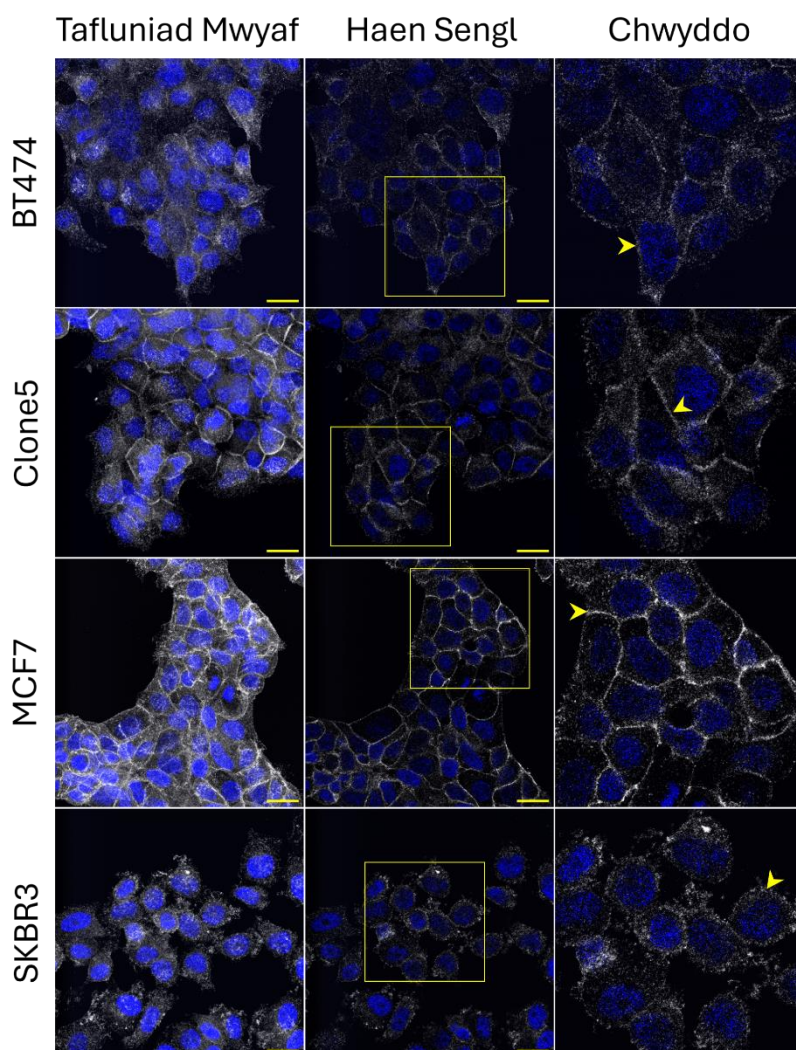
Mae celloedd MCF7 yn dangos rhywfaint o leoliad pilen er gyda dwysedd llawer gwannach, fel y disgwyli'r oherwydd diffyg gor-fyneigiant HER2. Mae'n debyg mai'r rheswm dros y radd uchel o staenio cytosolig yng nghelloedd BT474 a Clone5 yw rhwymo amhenodol yr wrthgorff cynradd gan na welwyd ef yn y rheolaeth eilaidd yn unig.



Ffigur 3-9: Dosbarthiad HER2 (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron. Dynodir y saethau HER2 wedi crynodi ar y gell bilen. Defnyddir Hoechst (glâs) i gyd-liwio'r cnewyllyn. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm

O ran y staenio HER3 yn Ffigur 3-10, gwelwyd gradd uchel o staenio ar draws y bilen blasma dros pob llinell gell i ryw raddau. I gymharu a'r HER2 mae'i weld fel petai'r

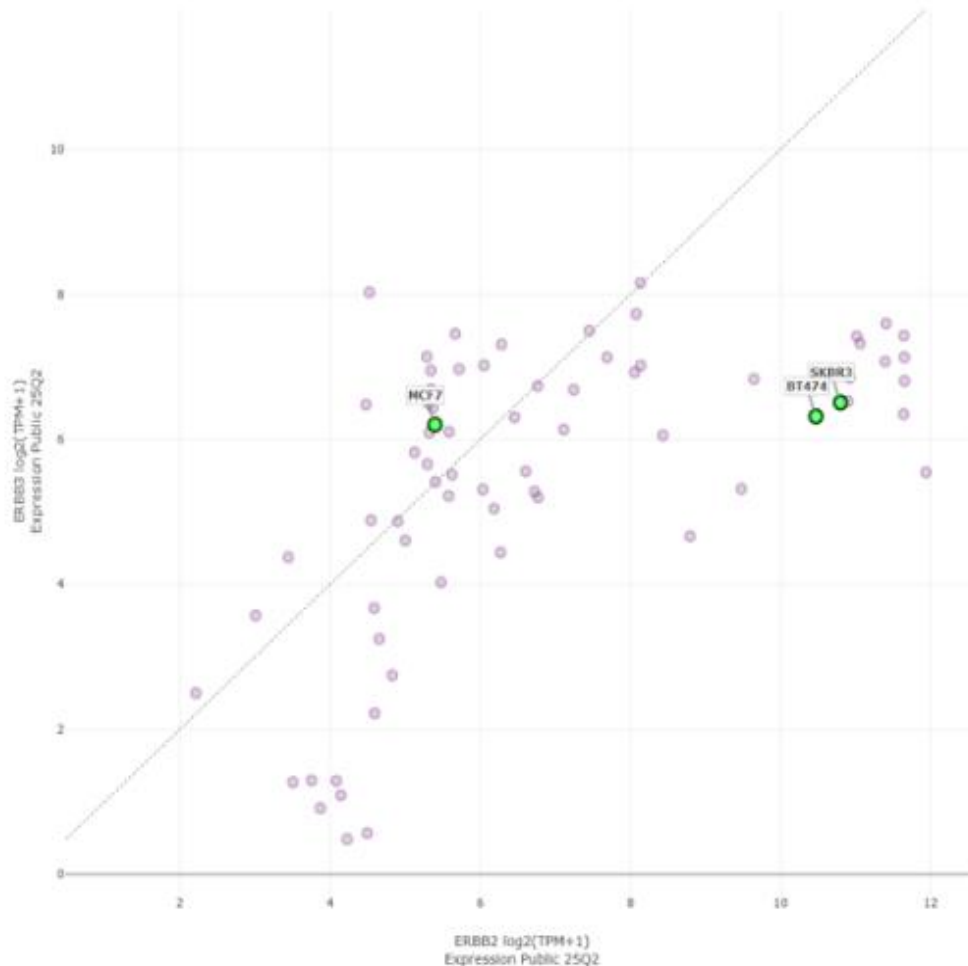
mynegiant yn eithaf tebyg ar draws y celloedd. Mae hyn yn wahanol iawn i'r patrwm a welir efo HER2 oherwydd yr wahaniaeth mewn mynegiant rhwng yr celloedd yma.



Ffigur 3-10: Dosbarthiad HER3 (gwyn) ar draws modelau celloedd y fron, dangosir crynodiad ohono ar y gell bilen fel dangosir gan y saethau. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Defnyddir Hoechst (glâs) i gydlwio'r cnewyllyn. Bar raddfa 20µm

Drwy ddadansoddi data sydd ar gael yn gyhoeddus ar gyfer mynegiant HER2 a HER3, gellir gael darlun mwy cywir o sut mae'r llinellau celloedd yn cymharu â'i gilydd. Mae'r cronfa data DepMap yn cynnwys gwybodaeth am mynegiant proteinau ar draws modelau celloedd cyffredin mewn sawl canserau. Yn anffodus fodd bynnag, gan fod celloedd

Clone5 wedi'u deillio'n wreiddiol o gelloedd BT474, a doedd y linell hon ddim yn y bas data. Mae mynegiant HER2 yn dilyn patrwm o SKBR3, > BT474 > MCF7 (Ffigur 3-11) ac yn ddiddorol, mae mynegiant HER3 ar draws yr holl linellau celloedd sydd wedi'u cynnwys yn debyg iawn i'w gilydd. Gallai hyn, i ryw raddau, esbonio pam y gwelir mwy o signalau cytoplasmig yn y celloedd HER2+. Oherwydd ei rôl fel y partner rhwymo delfrydol ar gyfer HER2, mae'n debygol y bydd y signalau cynyddol yn arwain at gyfran lai o'r HER3 yn cael ei leoli yn y bilen.



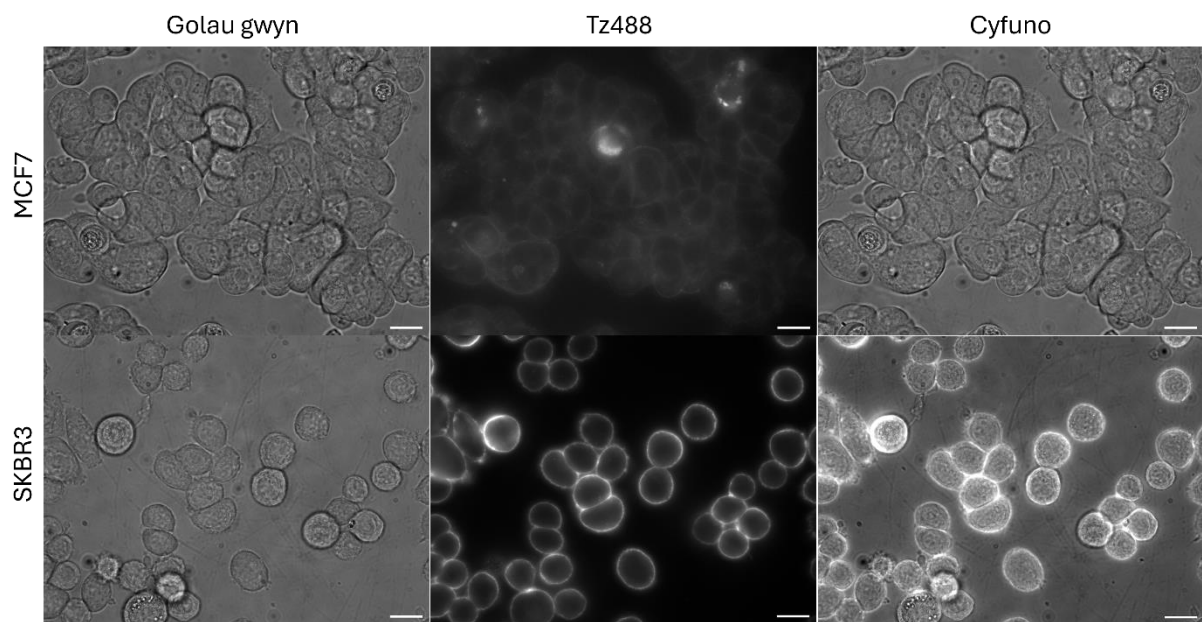
Ffigur 3-11: Mynegiant HER2 a HER3, BT474, SKBR3 ag MCF7 i gymharu gyda modelau cancer y fron eraill. Cynhyrchir y graff gan defnyddio'r gwybodaeth cyhoeddus sydd ar gael gan DepMap. Doedd dim data ar gael ar gyfer y celloedd Clone5.

3.1 Cynhyrchu Tz-Alexa488

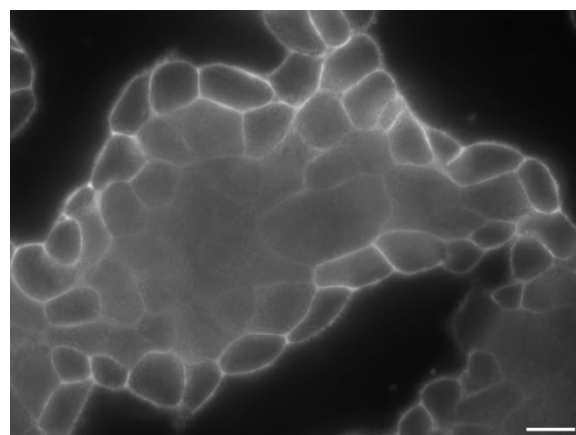
Nawr roedd y proffil endocytig wedi ei gwblhau wnaethom penderfynu i labelu Tz gydag Alexa Fluor 488 er mwyn gallu cael well syniad o'r wahaniaeth mewn mynegiant HER2 ar draws ein celloedd. Roedd hefyd yn caniatáu i ni all olrhain y gwrthgorff a hefyd asesu effeithiolrwydd rhwymo a fasa'n werthfawr iawn i'w ddarganfod cyn cynhyrchu ein nanoronnau PLGA-Tz. Yn gyntaf cafodd y gwrthgorff ei grynodi a'i buro o'i doddiant storio gwreiddiol fel y gellid ailgyfansoddi'r Tz mewn byffer sodiwm bicarbonad i grynodiad o 94.16µM. Yna labelwyd y Tz gyda'r fflworoffor trwy gymysgu'r dau am 3 awr gan ei gadw yn y tywyllwch. Wedi hynny, purwyd yr hydoddiant o'r fflworoffor rhydd ac yna ailgyfansoddwyd y gwrthgorff wedi'i labelu mewn dŵr distyll. Yna casglwyd y gwrthgorff wedi'i labelu, ac ail-fesurwyd crynodiad y protein gan ddefnyddio sbectroffotomedr UV-Vis. Crynodiad protein terfynol y gwrthgorff oedd 61.25µM a chanfuwyd bod y gymhareb fflworoffor:protein yn 2.4:1.

Ar ôl labelu'r gwrthgorff yn llwyddiannus, y cam nesaf oedd pennu a oedd yn dal i fod â'i benodolrwydd HER2 ac nad oedd y broses labelu wedi cael effaith andwyol ar ei allu i adnabod a rhwymo i'r derbynnydd. I werthuso hyn, fe wnaethom drin celloedd MCF7 ac SKBR3 gyda 50nM o Tz488 am 1 awr. Fel y gwelir yn Ffigur 3-12, mae'r Tz488 yn dangos penodolrwydd rhwymo amlwg ar y bilen blasma yn y celloedd HER2+ SKBR3 dim ond fflworoleuedd cefndir prin a welwyd yn y HER2-MCF7 sy'n adlewyrchu'r prinder o HER2 yn y celloedd yma o gymhariaeth. Ar ôl sefydlu ei benodolrwydd ar gyfer HER2, yna fe wnaethom ymchwilio a allai rwymo'n llwyddiannus i'r celloedd Clone5. Fel y soniwyd yn flaenorol, deilliodd y llinell gelloedd hon yn wreiddiol o gelloedd BT474 a gafodd eu

meithrin ym mhresenoldeb Tz nes nad oedd ganddo unrhyw effeithiau ataliol ar dwf y celloedd (2). Oherwydd hyn fe'i cydnabyddir fel llinell gelloedd sy'n gwrthsefyll Tz. Fodd bynnag, gan nad yw'r union fecanwaith gwrthsefyll yn glir, roedd angen i ni asesu a allai'r Tz rwymo'r derbynnydd o hyd ai peidio. Fel y gwelir yn Ffigur 3-13 mae'r Tz488 yn amlwg yn gallu bachu i HER2 yn llwyddiannus gel dangosir gan yr fflworoleuedd cryf ar y bilen blasma.



Ffigur 3-12: Celloedd MCF7 HER2- (Top) a SKBR3 HER2+ (Gwaelod) ar ôl cael eu trin gyda Tz488 (gwyn) am awr. Gwelir crynodiad of HER2 llawer uwch ar draws bilen y celloedd SKBR3. Bar raddfa 20µm



Ffigur 3-13: Celloedd Clone5 wedi'u trin gyda Tz488 (gwyn) am 1 awr. Gwelir fod y HER2 wedi crynodi ar draws y bilen plasma Bar raddfa 20µm

3.2 Trafodaeth

Fel y soniwyd yn flaenorol, mae ein grŵp wedi defnyddio proffilio endocytig o'r blaen i sefydlu map mewngellol ar gyfer celloedd i gael dealltwriaeth gwell o fynediad a traffig endosomaidd Nanogronynnau Lipid (LNP) mewn llinellau canser y colon a'r ysgyfaint (1). Roedd y gwaith cyntaf yn y prosiect PhD hwn yn bwysig i ni gael darlun cyntaf o leoliad organynnau endosytig yn y celloedd canser y fron gwahanol cyn gwneud arbrofion pellach gyda gwrthgyrff, chwiliedyddion endosytic fel Transferrin a hefyd gyda nanogronynnau. O'u gymharu a'r proffilio gwreiddiol a'i gyhoeddwyd yn 2019 penderfynnwyd dileu mynd i fanylion pellach fel mesur y pH yn y system endolysosomaidd ac felly yn rhoi mwy o wybodaeth am y model (1). Ond mae'r profile llawn yn cymeryd llawer iawn mwy o amser nad oedd ar gael i gwblhau'r gwaith gyda 4 llinell canser y fron yn cael ei astudio. Mae proffilio llawn hefyd yn caniatáu i ni geisio amcangyfrif trwy ba ddull y mae'r nanogronynnau'n cael eu mewnosod gan y gallai ddarparu mewnwelediadau hanfodol i dynged derfynol y nanogronynnau, gan fod ganddynt nifer o gyrchfannau posibl ar ôl eu mewnosod (3). Roedd ein strategaeth ni yn ddibynnol ar dargedu HER2 a cael mynediad drwy'r derbynnydd hwn ac yn wahannol iawn i'r fformiwla LNP sydd yn ôl y llenyddiaeth y gallu cael mynedid via y derbynnydd LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*) ac drwy'r wedd hylifol (7–9).

O hyn, gallem hefyd fesur pa mor hir y byddai'n ei gymryd i'r nanogronynnau gyrraedd gorsafoedd endocytig, a'r gyfran ohonynt sy'n llwyddo i wneud hynny. Yn ogystal, gallai hyn roi gwybod i ni am oddefgarwch y celloedd i'n nanogronynnau gan ei fod wedi'i sefydlu, yn ddifater o'r llwythi wedi'u capsiwleiddio, y gall y nanogronynnau eu hunain fod yn cytotocsig (4,5). Nid yw ein nanogronynnau wedi'u heithrio rhag effeithiau cytotocsig

anfwriadol posibl. Bydd cyfran o'r PVA a ddefnyddir fel rhan o'r broses weithgynhyrchu yn parhau i fod wedi'i rhyngwynebu â'r gronynnau eu hunain a gall ddylanwadu'n fawr ar briodweddau'r nanoronnau eu hunain gyda photensial zeta, hydroffobigrwydd, maint a mewnnoli yn cael eu heffeithio (6,7). O ganlyniad, er gwaethaf bod yn elfen hanfodol o weithgynhyrchu nanoronnau PLGA ers degawdau, bu ymdrechion i ddatblygu nanoronnau PLGA heb ddefnyddio PVA er mwyn osgoi'r effeithiau diangen hyn (8,9). Oherwydd y problemau hyn, roedd sefydlu gwaelodlin yn ein celloedd o sut oedd y llwybr endosytig yn edrych yn hanfodol er mwyn i ni allu monitro unrhyw wenwyndra posibl. Defnyddiwyd y dull hwn gan grwpiau eraill yn y llenyddiaeth i bennu tynged nanoronnau o fewn celloedd canser y fron. Defnyddiodd Gimondi *et al* y dechneg hon i bennu pa gam o'r llwybr endocytig yr oedd nanoronnau wedi cyrraedd ar wahanol adegau a cheisio mesur sut y newidiodd nifer y clystyrau mewnol dros amser (10). Ehangodd Vtyurina *et al* ar y dechneg hon a defnyddio plasmidau i drawsffectio celloedd gyda fersiynau o clathrin, cafeolin a Rab5 a oedd yn fflworoleuo i berfformio fersiwn o'r arbrawf hwn gyda chelloedd byw (11). Mantaish hyn yw bod amodau celloedd byw yn fwy cywir tra eu bod hefyd yn caniatáu monitro amser real o sut mae cydleoliad yn datblygu dros amser.

Fodd bynnag, er mai'r cynllun gwreiddiol oedd cynnal yr un arbrefion imiwno-fflworoleuedd ag a gyflwynwyd uchod mewn celloedd sydd un ai wedi'u trin â nanoronnau neu beidio er mwyn gymharu eu heffaith ar y celloedd, yn anffodus nid oeddem yn gallu gwneud hyn. Y rheswm am hyn yw oherwydd bod arbrefion rhagarweiniol yn cynnwys gosod celloedd a oedd eisoes wedi'u trin â nanoronnau wedi bod yn aflwyddiannus gan fod y signal fflworoleuol o'r Tz488 wedi'i golli yn ystod y broses

osodi - yn ddifater o'r gosodydd a ddefnyddiwyd. Ein damcaniaeth ar gyfer hyn yw bod y broses osod wedi dinistrio'r nanoronnau eu hunain a ganiataodd wedyn i'r Tz488 ddianc yn rhwydd dros gyfnod golchiadau pellach. Er i ni hefyd gapsiwleiddio RhB o fewn y nanoronnau, fel y bydd yn cael ei archwilio'n fanylach yn y bennod nesaf, credwn y byddai hyn hefyd wedi bod yn aflwyddiannus wrth gadw cyfanrwydd y signal gan y bydd RhB yn tryledu'n rhydd trwy gelloedd cyfan os yw'r nanoronnau'n cael eu diraddio. Serch hynny, roedd yr adran hon o'r gwaith yn werthfawr gan ei bod yn caniatáu inni ddod i arfer â delweddu'r gwahanol linellau celloedd.

3.3 Ffynonellau

1. Sayers EJ, Peel SE, Schantz A, England RM, Beano M, Bates SM, et al. Endocytic Profiling of Cancer Cell Models Reveals Critical Factors Influencing LNP-Mediated mRNA Delivery and Protein Expression. *Mol Ther*. 2019 Nov 6;27(11):1950–62.
2. Granger E, McNee G, Allan V, Woodman P. The role of the cytoskeleton and molecular motors in endosomal dynamics. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 July;31(100):20–9.
3. Wu LG, Chan CY. Multiple Roles of Actin in Exo- and Endocytosis. *Front Synaptic Neurosci*. 2022;14:841704.
4. Barlan K, Gelfand VI. Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017 May;9(5):a025817.
5. Wilson JM, de Hoop M, Zorzi N, Toh BH, Dotti CG, Parton RG. EEA1, a Tethering Protein of the Early Sorting Endosome, Shows a Polarized Distribution in Hippocampal Neurons, Epithelial Cells, and Fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2000 Aug;11(8):2657–71.
6. Kamentseva R, Kosheverova V, Kharchenko M, Zlobina M, Salova A, Belyaeva T, et al. Functional cycle of EEA1-positive early endosome: Direct evidence for pre-existing compartment of degradative pathway. *PloS One*. 2020;15(5):e0232532.
7. Hosseini-Kharat M, Bremmell KE, Prestidge CA. Why do lipid nanoparticles target the liver? Understanding of biodistribution and liver-specific tropism. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2025 Mar 13;33(1):101436.
8. Gilleron J, Querbes W, Zeigerer A, Borodovsky A, Marsico G, Schubert U, et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape. *Nat Biotechnol*. 2013 July;31(7):638–46.
9. Sahay G, Querbes W, Alabi C, Eltoukhy A, Sarkar S, Zurenko C, et al. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling. *Nat Biotechnol*. 2013 July;31(7):653–8.

4 Astudio Rhwymo a Mewnoliad PLGA-Tz

Ar gyfer ein NGau penderfynwyd i defnyddio rhai wedi eu wneud o PLGA ac i caniatáu iddynt targedu canser y fron HER2+ wnaethom ni addurno nhw gyda Tz. Nid yw'r dull yma yn un unigryw beth bynnag gyda llawer wedi datblygu NGau PLGA-Tz eu hunain er mwyn cludo amrywiaeth o cargo, ond yn bennaf cyffuriau cemotherapi (1–3). Er hyn credaf fod yr astudiaethau yma yn esgeuluso i astudio'r effaith mae rhwymo'r NGau yn cael ar y celloedd a'r digwyddiadau buan iawn yn dilyn triniaeth. Gan fod rhain o ddiddordeb mawr i ni wnaethom benderfynu i'w ymchwilio i mewn i'r materion. Fodd bynnag, cyn hyn roedd hi'n bwysig iawn i sicrhau fod ein NGau yn perfformio'n debyg i rhai eraill sydd yn y llenyddiaeth er mwyn gwneud siŵr fod ein canlyniadau yn cynrychioli NGau gyda'r allu i targedu, yn gyffredinol.

Amcanion y bennod hon oedd:

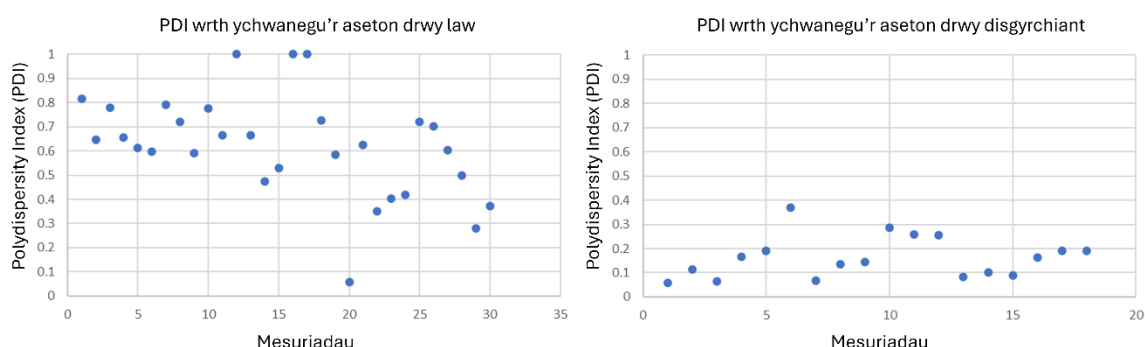
- I ddatblygu NGau wedi addurno gyda Tz a'u nodweddu
- Edrych ar y rhwymo a'r mewnoliaeth o'r NGau hyn
- Mesur effaith y NGau ar mynegiant HER2

4.1 Cymeriadaeth Ffisegol a Biolegol o NGau PLGA

Ar ôl sefydlu proffil endocytig ysgafn o'r modelau celloedd canser y fron, labelu Tz gydag Alexa Fluor488 a dangos effeithlonrwydd yr gwrthgorff wedi'i labelu, roeddem bellach yn barod i gynhyrchu NGau i dargedu HER2. Dangosir nodweddion y NGau hyn yn Ffigur 4.1. Roedd y dull gwreiddiol ar gyfer cynhyrchu NGau yn cynnwys ychwanegu'r toddiant

aseton at y PVA 2% o chwistrell â llaw. Er bod hyn yn caniatáu cynhyrchu NGau ac yn gymharol ddibynadwy, roedd eu maint yn anghyson oherwydd yr elfen ddynol. Er mwyn cadw maint NP i'r lleiafswm, rhaid cadw'r diferion a ychwanegir at y toddiant mor fach â phosibl hefyd er mwyn cymysgu'r toddiant aseton gyda'r PVA mor sydyn a phosibl, felly defnyddiwyd nodwydd 25G⁵/₈ (4). Er mwyn caniatáu i hyn gael ei wneud gyda rhywfaint o reolaeth, roedd hyn yn golygu bod angen chwistrell â chyfaint cyfanswm isel i gadw'r pwysau'n isel i sicrhau ffurfio diferion ar ddiwedd y nodwydd, penderfynwyd ar 1ml. Yn anffodus, gan fod y PLGA a'r PLGA-COOH wedi'u diddymu mewn 8ml o aseton, arweiniodd y blinder o ychwanegu'r diferion dro ar ôl tro at achosion o wallau dynol lle gellid colli rheolaeth fanwl gywir. Oherwydd hyn, penderfynwyd gwneud nifer o welliannau i'r dechneg. Yn gyntaf, cynyddwyd cyflymder y tröydd magnetig. Y rhesymeg dros hyn yw oherwydd y cyflymder uwch, mae'n achosi cymysgu cyflymach trwy greu mwy o ficro-drobyllau. Mae hyn yn caniatáu cyflwyno'r aseton a'r PVA dros cyfaint llawer llai, sy'n golygu bod y NGau sy'n gwaddodi yn llai. Y newid mwyaf, fodd bynnag, oedd y dull o ychwanegu diferion aseton at y toddiant. Er bod y dull gwreiddiol yn dibynnu ar ei wneud â llaw, fe'i newidiwyd fel bod y chwistrell yn cael ei hongian uwchben y fflasg i ganiatáu i'r diferion gael eu gollwng trwy ddisgyrchiant. Er nad oedd gennym reolaeth dros gyflymder yr ychwanegu mwyach, serch hynny, caniatodd lawer mwy o gysondeb yn y NGau a gynhyrchwyd. Adlewyrchir hyn wrth gymharu'r Polydispersity index (PDI) cyn ac ar ôl y newid yn y dull. Gyda'r hen ddull â llaw, mae gan y mwyafrif helaeth o ddarllenïadau PDI o >0.4 gyda'r rhan fwyaf o'r rhain rhwng 0.6 a 0.8. (Ffigur 4-1). Fodd bynnag, arweiniodd defnyddio'r dull bwydo disgyrchiant at gynhyrchu NGau gyda PDI llawer llai. Mae'r PDI yn mesuriad o pa mor unffurf yw'r NGau o ran maint gyda ffigurau agosach i 0 yn cynrychioli sampl hollol unffurf ag gwerthoedd

agosach at 1 yn cynrychioli rai gyda amrywiadau maint mawr. Roedd gan yr holl baratodau hyn PDI o dan 0.4 tra bod gan y mwyafrif ohonynt < dan 0.2. O safbwynt ei dadansoddi mewn model fiolegol, mae hyn yn caniatáu dehongliad mwy dibynadwy o'n canlyniadau gan y gallwn fod yn sicr bod y gronynnau o faint tebyg a dylent ymddwyn yn debyg o ganlyniad. Er enghraifft, mae gan NGau mwy arwynebedd mwy y gellir ei addurno a e.e gwrthgorff a allai ddylanwadu ar rwymo a mewnosod ac ati.



Ffigur 4-1: Gwahaniaeth mewn PDI ar ol addasu'r dull i cynhyrchu NGau. Mae pob dot yn cynrychioli mesuriad unigol a wneir trwy wasgariad golau deinamig. Mesurwyd pob fformwleiddiad mewn drifflyg ($N \geq 6$).

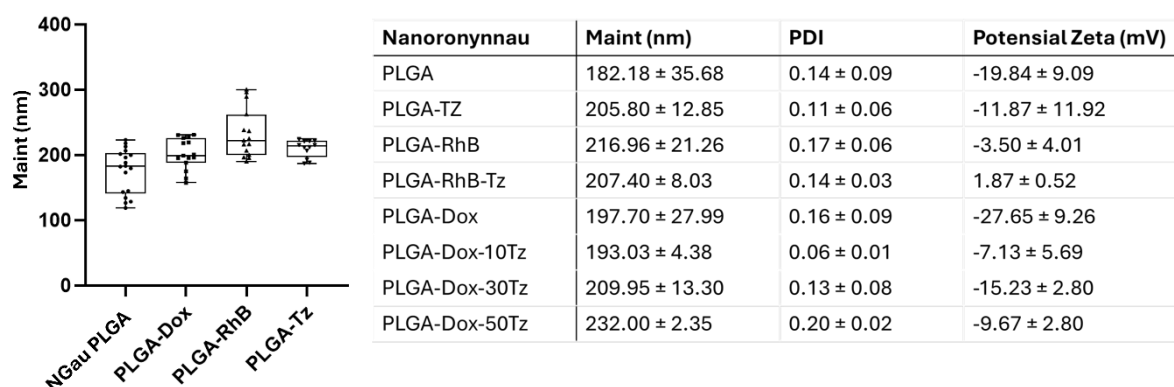
Defnyddiwyd y dull newydd hwn ar gyfer pob fformwleiddiad NGau yn y dyfodol. Er fod cydrannau craidd y gronynnau wedi aros yr un fath, roedd y sylwedd PVA a ychwanegir yr PLGA mewn aseton yn gwahaniaethu ychydig yn dibynnu ar yr arbrofion a gynlluniwyd. Er enghraifft, ar gyfer gronynnau sy'n cynnwys RhB, diddymwyd 1mg o RhB yn y toddiant PVA cyn ychwanegu PLGA. Yn yr un modd, ar gyfer y gronynnau cynnar sy'n cynnwys Dox, diddymwyd 1mg o Dox mewn 70µl o DMSO, gan godi'n ddiweddarach i 10mg o Dox yn yr un cyfaint. Ar y cyfan, ymddengys nad oedd gan yr ychwanegiadau hyn fawr o effaith ar faint a PDI y NGau gyda maint cyfartalog bras a PDI o 200nm a ≤ 0.2 yn y drefn honno (Ffigur 4-2). Yn ogystal, wrth archwilio Tabl 4-1 gellir gweld y tebygrwydd mewn meintiau cyfartalog rhwng gwahanol fformwleiddiadau. Fodd bynnag, ar gyfer y potensial zeta, mae'r dewis o gargo wedi cael effaith fwy amlwg. Gan fod RhB yn

gemegyn â gwefr bositif, adlewyrchir hyn yng ngwefrau'r gronynnau sy'n ei mewngapsiwleiddio. Er enghraifft, mae gan y gronynnau sy'n cynnwys RhB wefr gyfartalog sy'n llawer agosach at niwtral, tra bod gweddill y fformwleiddiadau i gyd â gwefr negyddol. Mae'n ymddangos nad yw'r Dox wedi cael dylanwad er gwaethaf y ffaith bod y PLGA-Dox heb ei addurno yn sylweddol fwy negyddol na gweddill y NGau sy'n cynnwys Dox. Gan fod y NGau PLGA-Dox gyda falensau Tz gwahanol i gyd wedi'u gwneud o baratoad cychwynnol o PLGA-Dox, mae'n annhebygol mai'r cyffur sydd yn gyfrifol am yr anghysondeb.

Yn ogystal â darganod phriodweddau ffisegol y NGau, roedd hefyd angen gwybodaeth am effeithlonrwydd mewngapsiwleiddio Dox. Wnaethom hefyd mewngapsiwleiddio RhB i gael signal fflwroleuol o dan y meicrosgob ond ni chafodd y effeithlonrwydd mewngapsiwleiddio ei fesur i'r cargo hwn. Roedd sefydlu crynodiad y doxorubicin a gyflenwir yn llawer pwysicach. Fel y soniwyd yn flaenorol, ffurfiwyd y gronynnau hyn gydag 1mg o Dox a godwyd yn ddiweddarach i 10mg. Y rheswm am hyn oedd yr union ddull a ddefnyddiwyd i gynhyrchu'r NGau sef nanodyddodi. Er bod y dechneg yma'n rhatach ac angen llai o offer arbenigol i gymharu a system microlifydd, mae angen y defnydd o cyfeintiau fwy yn gynhenid (5). Er enghraifft, roedd cyfanswm y gyfaint yn y fflasg ar ôl ychwanegu aseton oddeutu 22ml, sy'n gwanhau unrhyw cyffur toddedig. Adlewyrchwyd hyn yn yr arbrofion effeithlonrwydd mewngapsiwleiddio cynnar a sefydlodd ein bod yn gallu mewngapsiwleiddio tua 25% o'r doxorubicin a oedd yn bresennol yn y cymysgedd. Er mwyn asesu ei ddefnydd fel cerbyd dosbarthu effeithiol o gyffur fel Dox, roedd angen cynyddu crynodiad y Dox oedd wedi'i fewngapsiwleiddio'n

sylweddol. Y rheswm am hyn yw oherwydd y crynodiad isel cyffredinol o Dox wedi'i mewngapsiweiddio, byddai angen trin y celloedd â chrynodiadau perthnasol yn glinigol o doxorubicin, er mwyn i ni drin y celloedd â'r hyn a ystyriom yn ormodedd o NGau.

Tabl 4-1 Dosbarthiad maint, potensial zeta a PDI y gwahanol fformweiddiadau NGau a ddefnyddiwyd yn y traethawd ymchwil hwn. $N \geq 3$ i bob grwp.



Ffigur 4-2: Dosbarthiad maint y gwahanol fformweiddiadau NGau a ddefnyddiwyd yn y traethawd ymchwil hwn. Mae pob pwynt ar y graff yn cynrychioli mesuriad unigol a wneir trwy wasgariad golau dinamig. $N \geq 3$

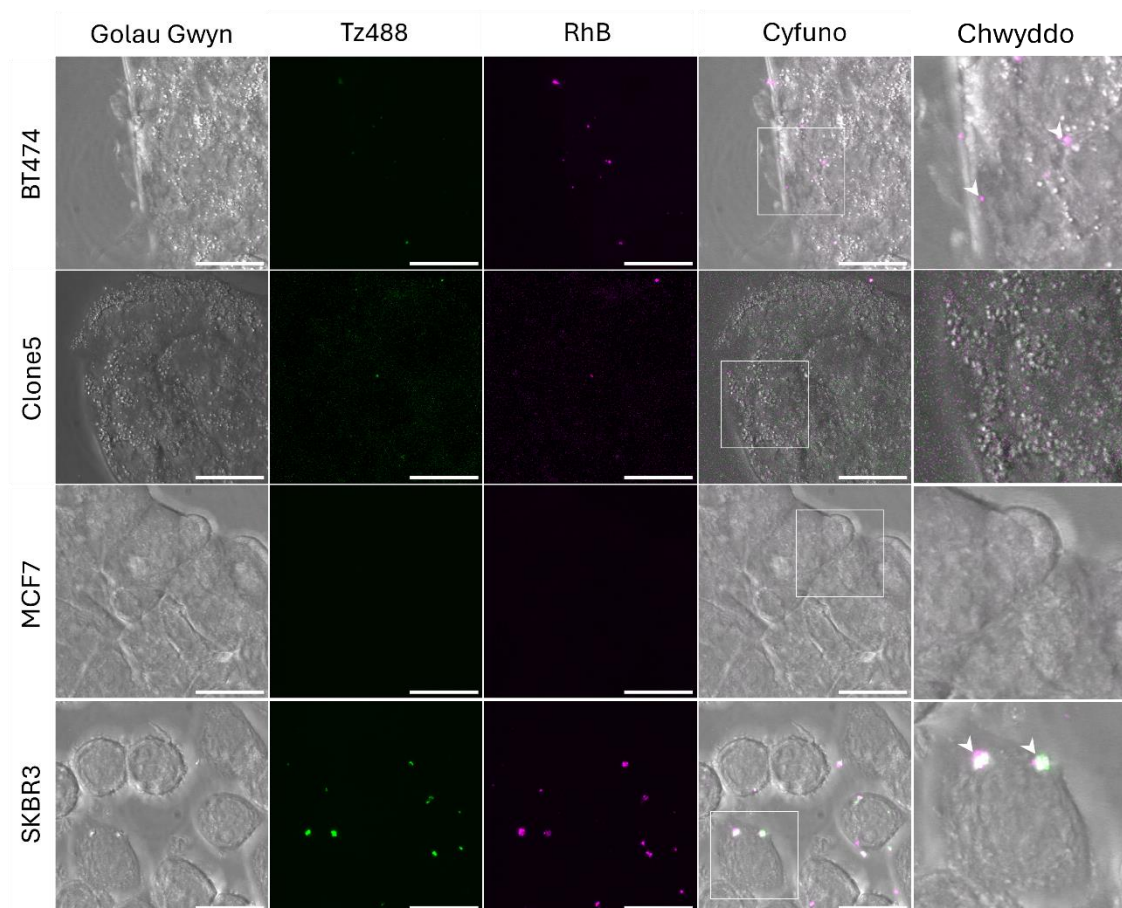
O fan hyn roedd nifer o opsiynau gwahanol y gallem eu defnyddio i gynyddu effeithlonrwydd y mewngapsiweiddio. Un opsiwn fyddai defnyddio llestr adwaith gwahanol ar y cyd â lleihau'r cyfanswm cyfrolau a ddefnyddir. Penderfynon ni yn erbyn y newid hwn gan y byddai'n newid y protocol gormod. O ganlyniad i newid y llestr adwaith, byddai'n rhaid i ni hefyd newid y bar cymysgu a ddefnyddir. Effaith hyn yw, gan y byddai'n rhaid i ni newid i ddefnyddio bar llai, nid yw'n glir a fyddai hyn yn cynhyrchu'r un grym ac yn gyrru ffurfio micro-drobyll i'r un graddau. Oherwydd hyn, mae'n bosibl, trwy newid y bar cymysgu, y gallem gael dylanwad anfwriadol ar faint ein gronynnau. Gellid defnyddio technegau gweithgynhyrchu microhylifol i sicrhau gradd llawer uwch o fewngapsiweiddio ond fel y soniwyd yn gynharach mae mwy o gymhlethdodau'n

gysylltiedig ag optimeiddio. Rhaid optimeiddio'r math o sianel a'r gyfradd llif yn ofalus ond unwaith eto byddai hyn yn cael effaith ar faint gronynnau a fyddai'n gwahanu'r NGau hyn oddi wrth y rhai a ddefnyddir ar gyfer gweddill y traethawd ymchwil hwn. Er, mewn theori, gan ddefnyddio'r dulliau hyn, y byddech chi'n gallu addasu rhai paramedrau i ffafrio ffurfio NGau o'r un dimensiynau â'n rhai ni oherwydd cyfyngiadau amser, fe wnaethom ni ddewis cynyddu crynodiad y doxorubicin wedi'i fewngapsiwleiddio trwy gynyddu crynodiad y doxorubicin yn yr hydoddiant yn unig. Er nad dyma'r ffordd fwyaf effeithlon o gynyddu effeithlonrwydd y fewngapsiwleiddio, yn enwedig o ran uwchraddio, roedd y dull hwn yn caniatáu inni gadw'r data hyfywedd a drafodir yn y pennod nesaf yn gyson â gweddill y data yn y traethawd ymchwil hwn.

4.2 Archwiliad in vitro o'r NGau

Ar ôl cynhyrchu a nodweddu ein NGau, gan ein bod yn gobeithio i defnyddio'r NGau i danfon cyffuriau y cam nesaf oedd gwerthuso eu galluoedd i rwymo i HER2 ar bilen blasma'r gell gan ddefnyddio gwaith *in vitro* i sefydlu pa ddos oedd ei angen i symud ymlaen. Roedd o'n bwysig i wneud hyn heb trin y celloedd gyda ormodedd o NGau. Yn gyntaf dewiswyd archwilio NGau PLGA-RhB-Tz ar grynodiad o 100µg/ml mewn 1ml wedi iddynt gael ei cyflwyno i'r celloedd am 5 awr mewn amgylchedd 37 ° C/ 5% CO₂ .

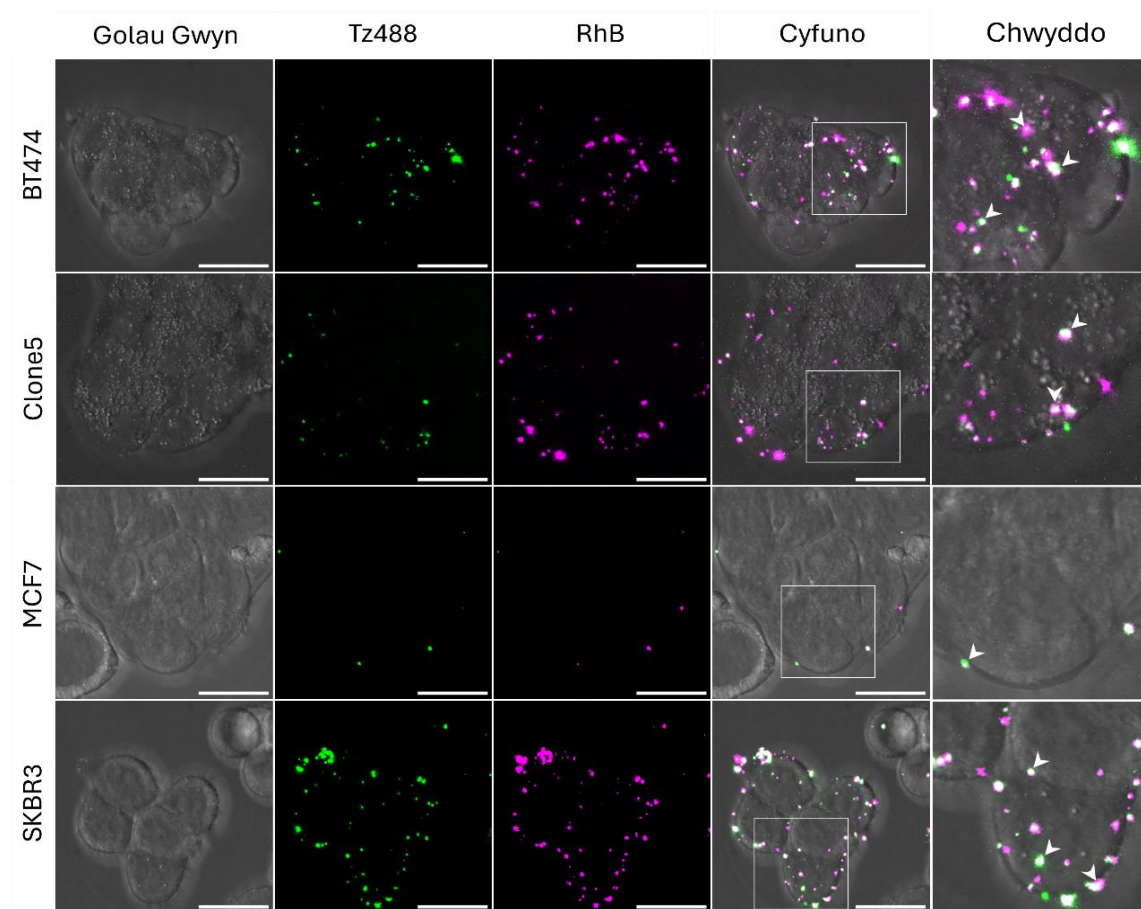
Dewiswyd y NGau hyn gan y gallem eu holrhain mewn celloedd trwy fesur fflwroleuedd y RhB a'r Alexa488 oedd wedi ei glymu i'r Tz. Mae'r Tz488 sydd wedi'i gysylltu â thu allan y NGau hefyd yn rhoi gwybodaeth am allu'r Tz i addurno'r gell a'r RhB oedd wedi'i mewngapsiwleiddio yn rhoi syniad i ni o leoliad y nanoronyn ei hun. Gall y cyfuniad yma o fflwroleuedd hefyd roi syniad i ni os oedd y Tz a'r NGau yn gwahanu. Yn dilyn y gwaith yma roedd siawns i brofi'r NGau mewn celloedd canser y fron â mynegiant gwahanol o HER2 trwy ddefnyddio microsgopeg cydffocal celloedd byw (Ffigur 4-3). Yn dilyn 5 awr o drin y celloedd â PLGA-RhB-Tz doedd dim ond fflwroleuedd amlwg yn y llinell SKBR3 gyda peth i'w weld yn amlwg y tu allan i'r gell neu yn agos iawn i wyneb y gell. Doedd dim arwydd clir fod y gwrthgorff (Alexa 488) na'r RhB wedi cael mynediad i'r gell.



Ffigur 4-3: Celloedd wedi'u trin â 100µg/ml PLGA-RhB-Tz am 5 awr. Dangosir tafluniad mwyaf. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos NGau. Bar graddfa 20µm

Oherwydd hyn, er mwyn gwerthuso galluoedd rhwymo gwirioneddol y gronynnau hyn yn well, ailadroddwyd yr arbrawf gyda dos NGau uwch o 500µg/ml (Ffigur 4-4). Yma mae'r signal yn llawer uwch ac yn bwysig mae gwahaniaeth mawr rhwng signal uchel y ddau fflwroffor, yn aml wedi ei cydleoli, yn y celloedd HER2 uchel (BT474, Clone 5, SKBR3) ar isel MCF7. Unwaith eto, gwelwyd rhai gwahaniaethau yn nwyster y signal rhwng y ddwy sianel fflwroleuol a allai fod oherwydd y rhesymau uchod. Roedd hefyd dystiolaeth cryf (saethau) fod y NGau wedi cael mynediad i'r cell ac yn amlygu fel ffurfiadau brychniog. Roedd y canlyniadau hyn yn galonogol ond roedd pryder y gall y ganran uchel o'r signal ddeillio o bilen blasma y celloedd. Yn ogystal, os oeddent wedi'u mewnnoli, roedd angen

mwyr o wybodaeth am y ffordd yr oedd a y NGau yn cael mynediad ac os oedd un llwybr endocytig penodol yn cael ei ddefnyddio.



Ffigur 4-4: Celloedd wedi'u trin â 500µg/ml PLGA-RhB-Tz am 5 awr. Dangosir tafluniad mwyaf. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos NGau. Bar graddfa 20µm

4.3 Astudiaethau Mewnoliaeth Cyntaf

Nawr roedden wedi gweld tystiolaeth fod ein NGau yn rhwymo i celloedd yn lwyddiannus oedd o'n bwysig sicrhau os oedd ein NGau yn cael ei fewnoli i'r gell. Roedd rhai o'r fflworoleuedd yng ffigur 4-4 i'w weld yn tarddu o tu mewn i'r gell ond o'r data yma roedd o'n amhosib dweud hyn yn bendant, Er mwyn pennu'n syml a oedd y NGau wedi cael mynediad i'r celloedd ceisiwyd sawl dull yn aflwyddiannus cyn penderfynu ar defnyddio dextran fel chwiliedydd endocytig sydd yn cael mynediad i'r y gell yn yr endocytosis gwedd hylifol ac yn teithio i'r lysosomau (6). Yn gyntaf, ystyriwyd dull golchi asid, sef delweddu'r celloedd ar y microsgop cyn eu golchi ag asid cryf (pH 2) ac yna ail-ddelweddu'r i asesu a oedd unrhyw newid yn y fflworoleuedd (7,8). Yn y llenyddiaeth, defnyddiwyd y dull hwn o dynnu unrhyw wrthgorff neu brotein arall fel transferrin (Tf) sy'n rhwym o'i dderbynnydd ar y bilen plasma ond yn yr achos hwn ni welwyd unrhyw newid yn y fflworoleuedd (data heb ei ddangos), felly fe benderfynon ni roi cynnig ar ddulliau eraill fel trochoeri'r fflworoleuedd allgellog gan defnyddio Trypan Blue (9).

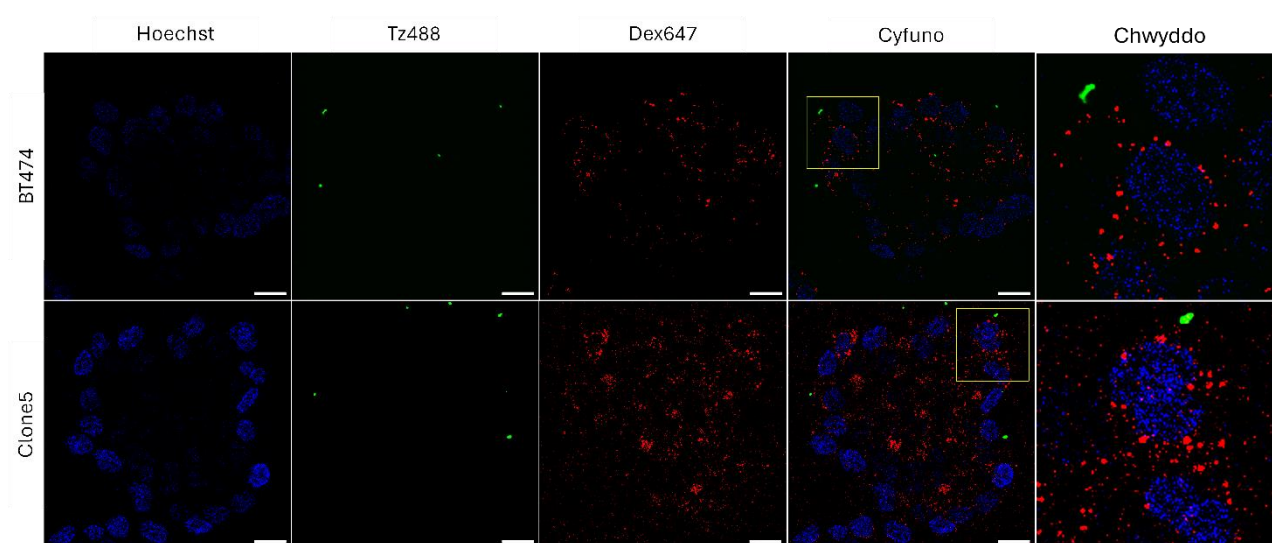
Ar ôl methu â tynnu'r PLGA-Tz o'r bilen blasma gyda asid, y cam nesaf oedd ceisio diffodd fflworoleuedd y Tz488 sy'n addurno'r NGau. I gyflawni hyn, y cynllun oedd defnyddio Trypan Blue i ddiffodd yr allyriad o'r Tz488. Mewn dull tebyg i'r golchiad asid, delweddwyd y celloedd, eu trin â'r Trypan Blue; unwaith eto ail-delweddwyd yr un ardaloedd. Yn anffodus, fodd bynnag, daeth i'r amlwg bod Trypan Blue yn cynyddu hunan-fflworoleuedd y gell yn fawr gan wneud y dull hwn yn aneffeithiol (10) [Data heb ei ddangos]. Fel y soniwyd yn flaenorol, ni weithiodd gosodi'r NGau ac felly, fe wnaethom newid i ddefnyddio'r NGau ochr yn ochr â dextran a transferrin (Tf).

4.4 Mewnoliaeth wedi 5 awr

Gan fod dulliau eraill i astudio graddfa'r mewnnoli'r NGau drwy cael gwared o unrhyw fflwroleuedd allgellog wedi bod yn aflwyddiannus wnaethom penderfynu i symud ymlaen i edrych ar dulliau sy'n dibynnu ar mesur cydleoliad ein NGau gyda chwiliedyddion fflwroleuol fel dextran a Tf. Fel y soniwyd mae dextran (10KDa) yn cronni yn y lysosomau tra fod Tf, sy'n cael mynediad drwy endosytosis clathrin yn cael ei ailgylchu'n gyflym i wyneb y gell ac i'r hylif allanol. Trwy ddefnyddio'r ddau farciwr hyn, gellir canfod os oedd y NGau, yn dilyn eu mewnnoli, yn hailgylchu neu a oeddent yn symud yn ddyfnach i'r gell ac yn casglu yn y lysosomau. Gwnaed yr arbrofion rhagarweiniol hyn yn y celloedd BT474 a Clone5 yn unig, gan mai nhw oedd y celloedd anoddaf i'w astudio o safbwynt delweddu. Buasai llwyddiant yn y linellau hyn yn caniatáu i'r protocol gael ei optimeiddio'n gyflym gyda'r modelau eraill. Er mwyn rhoi lleoliad manwl-gywir o'r NGau, defnyddiwyd PLGA-Tz488 heb gargo. Roedd hyn er mwyn lleihau unrhyw effeithiau y gallai cargo fflwroleuol fel RhB neu Dox ei gael ar y broses o gasglu'r signal (bleedthrough). Pe buasai'r NGau'n cael eu diraddio, mae'r Alexafluor488 yn llawer mwy tebygol o aros yn yr adran endocytig tra gall y RhB wasgaru'n hawdd ledled y gell.

Er mwyn labelu'r lysosomau wnaethom trin y celloedd gyda dextran647 am 2 awr cyn eu golchi a trin wedyn gyda NGau am 5 awr. Tra bod hyn yn caniatáu i ni weld os oedd y NGau yn cael ei mewnnoli yr wendid o'r dull yma yw does yna ddim cydleoliad i'w weld os yw'r NGau dal yn yr endsomau cynnar. Wrth ymchwilio drwy'r data fesul sleisen, ychydig iawn o gydleoliad, os o gwbl, a welwyd rhwng Dex647 a PLGA-Tz488 dros y ddwy linell gell (Ffigur 4-5). Yn yr un modd, ni welwyd unrhyw gydleoliad rhwng y NGau

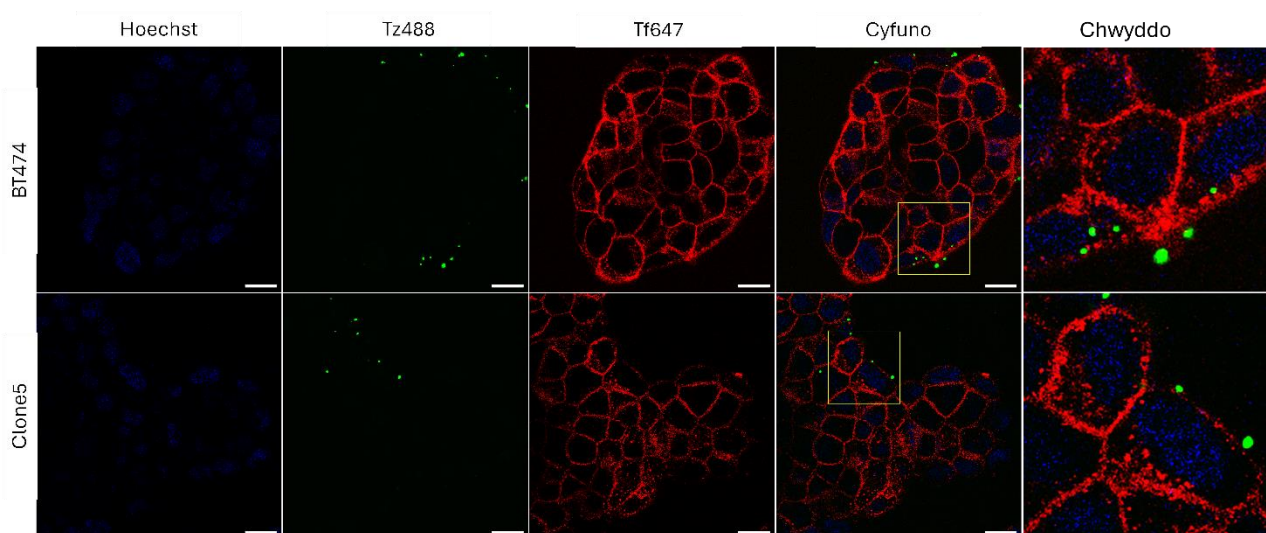
a'r Tf er ei fod yn ymddangos fod rhai gronynnau wedi'u mewnloli. Gan y byddai'r dextran wedi cronni yn y lysosomau, byddai'n bosibl i'r NGau fod o fewn organyn endocytig cynharach. Bu ymdrechion i gyd-drin'r gronynnau ochr yn ochr â'r dextran ond roeddent yn aflwyddiannus gan eu bod yn arwain at labelu fesiglaidd gwael a'r NGau yn agregu [Data heb ei ddangos]. Roedd y rhesymau dros hyn yn aneglur ond arweiniodd at roi'r gorau i'r methodoleg hyn o astudio mewnloliad.



Ffigur 4-5: Celloedd BT474 a Clone5 wedi'u trin â 50µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 5 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar raddfa 20µm

Wrth wneud y dadansoddiad dextran, fe wnaethom hefyd gynnal ymchwiliadau i weld a oedd y NGau cael eu hailgylchu'n ôl allan o'r gell trwy archwilio eu cydleoliad â Transferrin Alexa Fluor647 (Tf647) gan fydd hyn yn dangos os ydynt yn cael eu ailgylchu allan o'r gell ne beidio. Oherwydd fod cyfrwng llawn yn gyfoethog mewn Tf mae rhaid tyfu'r celloedd mewn cyfrwng di-serwm er mwyn amddifadu'r celloedd ohono. Mae llwgu'r celloedd yn y modd yma'n hwyluso ymlifiad y Tf, sydd yn cael ei ychwanegu mewn cyfrwng di-serwm er mwyn cael gwared o unrhyw cystadleuaeth rhwng Tf sydd wedi labelu neu beidio. Unwaith eto, ni welwyd unrhyw gydleoliad rhwng y Tf a'r NGau,

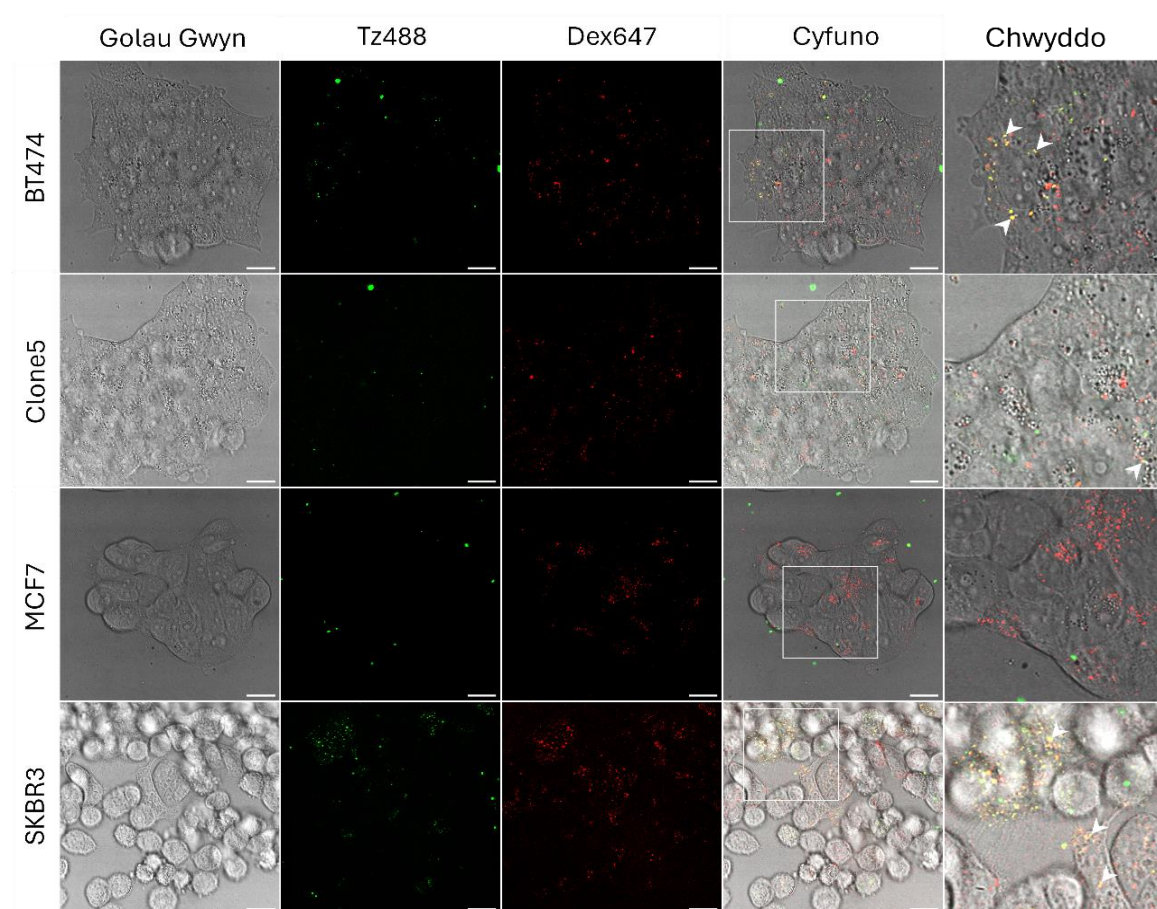
sy'n awgrymu nad ydynt yn cael eu hailgylchu'n ôl i wyneb y gell (Ffigur 4-6). Fodd bynnag, mae'n werth nodi y gallai'r dull arbrofol fod wedi newid cyfradd o endocytosis arferol y NGau. Er mwyn hwyluso mewnoli'r Tf, mae'n bwysig cadw'r celloedd mewn cyfryngau di-serwm ymlaen llaw i ryddhau Tf yn y serwm *bovine* o'r model a'i cyfoethogi â derbynnydd transferirn gwag . I arbed gorfod golchi'r celloedd droeon i lanhau'r bilen blasma penderfynwyd trin y celloedd â NGau wedi'u hatal mewn cyfryngau di-serwm. Mae'n bosibl y gallai'r newyn serwm hwn fod wedi cynyddu mewnleoliad NGau gwahanol i'r angen am HER2 a drwy wedd endosytosis hylifol. Yn mae Ffigur 4-6 eto yn amlygu ychydig iawn o dystiolaeth o NGau ar neu yn y celloedd gyda'r Tf647 yn amlwg iawn ar y bilen blasma ac mewn pilenni yn y gell . Gan na welwyd rhwymo effiethiol y NGau ar y gell a unrhyw dystiolaeth o fewnleoliad penderfynwyd ymestyn yr amser triniaeth rhwng y NGau a'r celloedd i 24 awr



Ffigur 4-6: Celloedd BT474 a Clone5 wedi'u trin â 20nM Transferrin647 cyn eu golchi a'u trin am 5 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs melyn. Bar graddfa 20µm

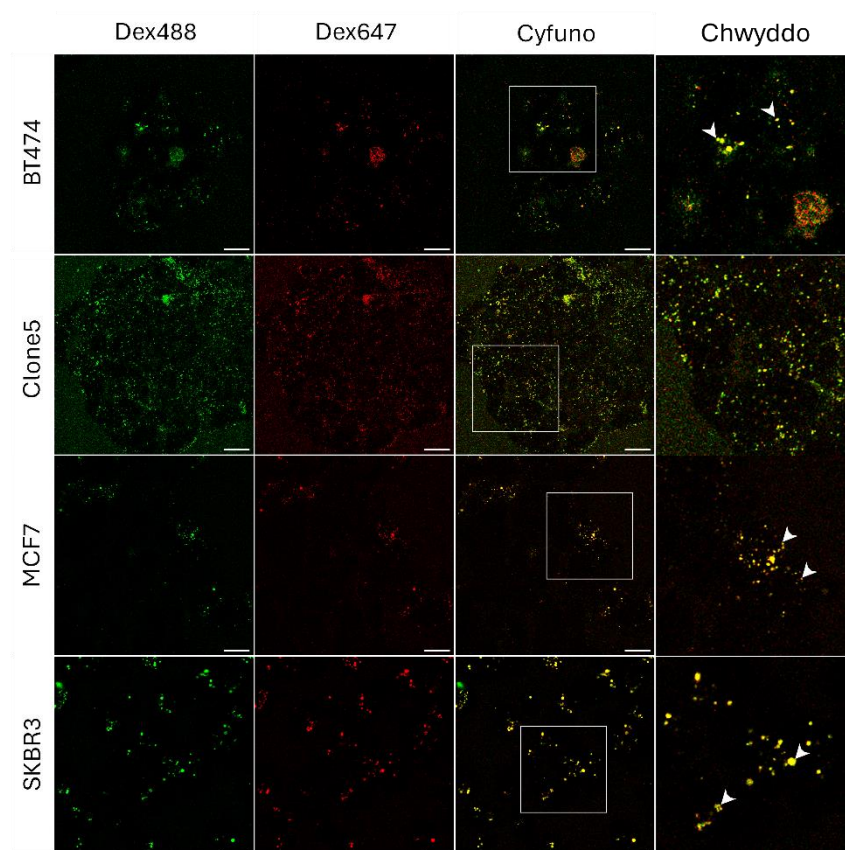
4.5 Mewnoliaeth wedi 24 awr

Gan fod y data yn edrych ar mewnoliad yr NGau ar ôl 5 awr heb di dangos tystiolaeth o unrhyw cydleoliad wnaethom benderfynu i ymestyn amser y triniaeth gyda NGau o 5 awr i 24 awr. Drwy wneud hyn fydd o'n rhoi fwy o amser i'r NGau cyrraedd y lysosomau a sicrhau fod nhw'n symud allan o'r endosomau cynnar. Ar gyfer yr arbrofion hyn bu canolbwyntio ar y NGau a dextran yn unig yn hytrach na hefyd ddefnyddio Tf. Gydag amser mor hir buasai'n anodd iawn dehongli data gyda'r Tf gan ei fod yn cylchu o'r gell i'r hylif allanol yn hytrach na ymgaslu mewn un organyn fel y lysosom. Yn gyntaf defnyddiwyd 50µg/ml o dextran647 ond mae data yn Ffigur 4-7 yn amlygu signal gwan iawn dros y cefndir a felly penderfynwyd codi'r crynodiad i 75µg/ml.



Ffigur 4-7: Celloedd wedi'u trin â 50µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos NGau. Bar graddfa 20µm

Er fod ni'n gweld tystiolaeth o cydleoliad rhwng y NGau, wedi labelu gyda Tz488, a'r dextran647 mae angen datblygu cymhariaeth dibynadwy i adael i ni benderfynu faint gryf ydi'r perthynas rhwng y NGau a'r dextran647. Wnaethom cyflawni hyn drwy mesur y cydleoliaeth rhwng dextran647 a dextran488 ag yn wir drwy edrych â llygad yn unig mae'r cydleoliad yn ymddangos bron yn berffaith, yn eithrio'r grŵp Clone5 sydd â fflwroleuedd cefndir uchel. Fodd bynnag, wrth bennu'r cyfernod cydleoliad, rhoddodd hyn uchafswm damcaniaethol i ni gymharu y cydleoliad. Mewn celloedd MCF7 ac SKBR3, gwelwyd y gwerthoedd cyfernod Pearson a Manders uchaf o 0.799 a 0.833 yn y drefn honno ar gyfer celloedd MCF7, a 0.772 a 0.822 ar gyfer celloedd SKBR3. Ar gyfer celloedd BT474, a Clone 5 cafwyd gwerthoedd llawer is (Tabl 4-2). Ar gyfer celloedd BT474 a Clone5, ni allai'r algorithm trothwy Otsu a ddefnyddiwyd i segmentu'r delweddau i wahanu'r labelu fesiglaidd o'r sŵn cefndir, gan arwain at werthoedd is nag a ddisgwyliwyd.

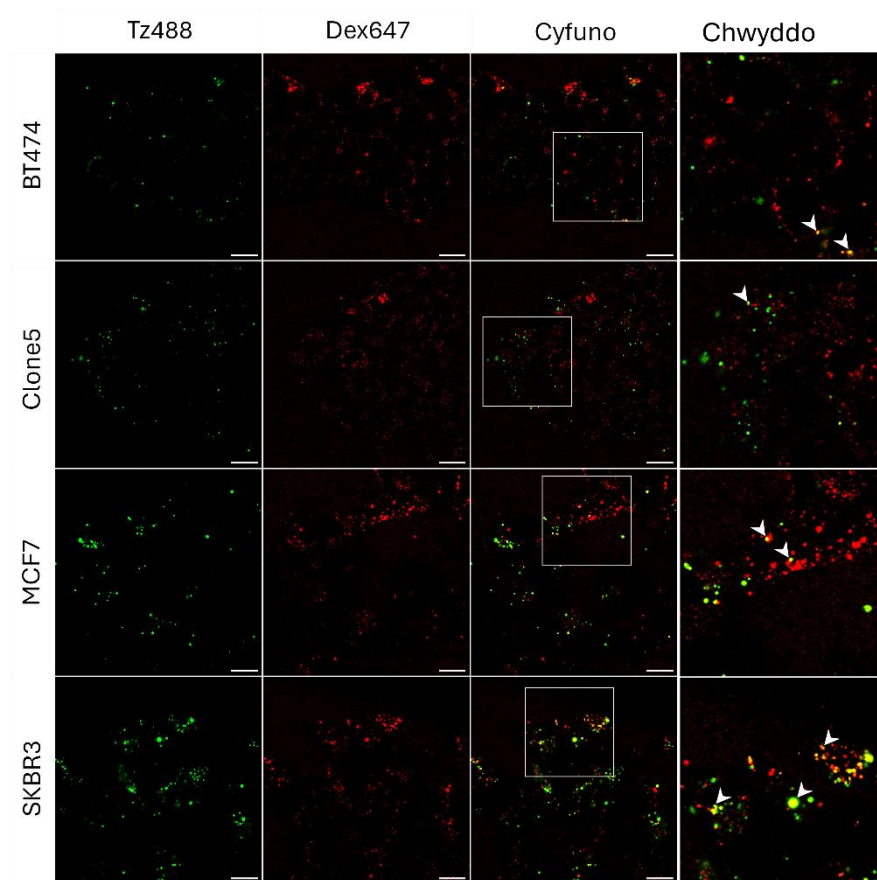


Ffigur 4-8: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 75µg/ml Dextran488. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-2. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos cydleoli

Tabl 4-2: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-8

	Pearson	Manders
BT474	0.497	0.188
Clone5	0.505	0.382
MCF7	0.799	0.833
SKBR3	0.772	0.822

Gan ein bod wedi ystyried y cefndir fflworoleuol yn yr arbrawf blaenorol i fod rhy uchel er mwyn allu cynnal cynnal dadansoddiad cywir o'r cydleoliad, bu rhaid ei ailadrodd. Ar gyfer y samplau NGau-dextran, gwelwyd y graddau uchaf ac isaf o gydleoliad yn y celloedd SKBR3 a MCF7 yn y drefn honno (Ffigur 4-9). Cofnodwyd gwerthoedd cyfernod Pearson a Manders cymharol uchel o 0.422 a 0.683 yn y drefn honno ar gyfer y celloedd SKBR3 (Tabl 4-3). O ystyried y gwerthoedd gyda'i gilydd, mae hyn yn dangos bod gradd gymharol uchel o gydleoliad o fewn y model gell hon. O'i gymharu, mae'r gwerthoedd llawer is a welwyd yn y celloedd MCF7 (0.167 a 0.048). Mae arsylwadau ar gyfer y ddwy linell gelloedd hyn yn cyd-fynd â'r hyn a welir yn y delweddau. Fel y soniwyd, ni allai'r trothwy Otsu segmentu'r celloedd BT474 a Clone5, felly fe wnaethom ymatal rhag eu dadansoddi'n fanwl iawn, fodd bynnag, o'r delweddau mae rhywfaint o gydleoliad yn bresennol, er nad i'r un graddau ag a welir yn y celloedd SKBR3.



Ffigur 4-9: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn tabl 4-3. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos cydleoliad.

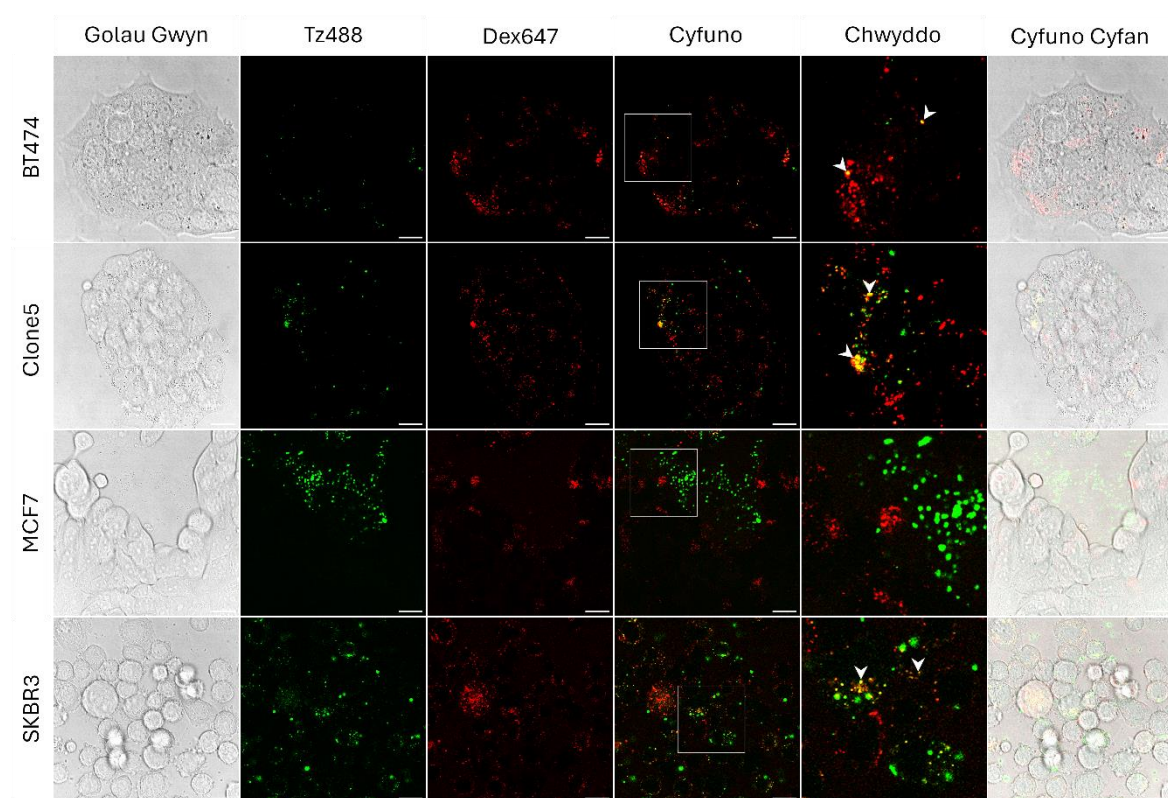
Tabl 4-3: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-9

	Pearson	Manders
BT474	0.204	0.206
Clone5	0.142	0.822
MCF7	0.167	0.048
SKBR3	0.422	0.683

4.6 Ailedrych ar gydleoliad NGau gyda Dextran647

Yn dilyn yr ymchwiliad aflwyddiannus i raddau'r cydleoliad a welwyd yn y BT474 a'r Clone5, fe benderfynon ni ailadrodd yr arbrawf gyda golchiad mwy trylwyr ar ôl y staenio dextran647 cychwynnol i leihau sŵn cefndir. Tro yma er mwyn cael syniad fwy cywir am y cydleoliad oedd yn cael ei fesur wnaethom benderfynu i ddim golchi cyn delweddu a oedd, yn anffodus, yn atal ni rhag rhedeg yr arbrawf rhwng dau dextran eto. Yn ogystal â chynhyrchu dadansoddiad mwy cywir a chynrychioliadol yn lle delweddu un ardal yn unig, y tro hwn, delweddwyd tair ardal wahanol. Drwy wneud hyn, mae'n rhoi gwell dealltwriaeth o sut mae'r NGau'n rhwymo ac yn mewnosod dros y boblogaeth gyfan o gelloedd. Yn ogystal, mae cynnwys delweddu golau gwyn yn caniatáu gwell syniad o ba mor dda y mae'r dextran yn mewnosod ac yn rhoi syniad faint o'r NGau sy'n rhydd o gelloedd.

Mae hyn yn fwyaf amlwg yn y celloedd MCF7, mae'r gwerthoedd cyfernod Pearson a Manders isel dros y tair sampl eisoes yn dangos nad oes perthynas rhwng dosbarthiad NGau a dextran wrth edrych ar y delweddau cynrychioliadol ar gyfer y setiau data hyn, fodd bynnag, mae'n amlwg sut mae cael gwared ar y cam golchi cyn delweddu yn datgelu graddfa lawn y diffyg rhwymo sydd gan ein NGau PLGA-Tz ar gyfer y llinell gelloedd HER2-isel (Ffigur 4-10). Yn ddiddorol, wrth archwilio'r celloedd BT474 a Clone5, mae rhai celloedd lle mae'r dextran wedi staenio'n llawer cryfach nag eraill, gan gynnwys y rhai y tu allan i ganol y clystyrau celloedd.



Ffigur 4-10: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-3. Dangosir haen sengl gyda'r ardal sydd wedi chwyddo'n cael ei dynodi gan sgwâr gwyn, saethau yn dangos cydleoliad. Bar graddfa 20µm

Tabl 4-4: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-10 a 2 ardal delweddu arall o'r un arbrawf

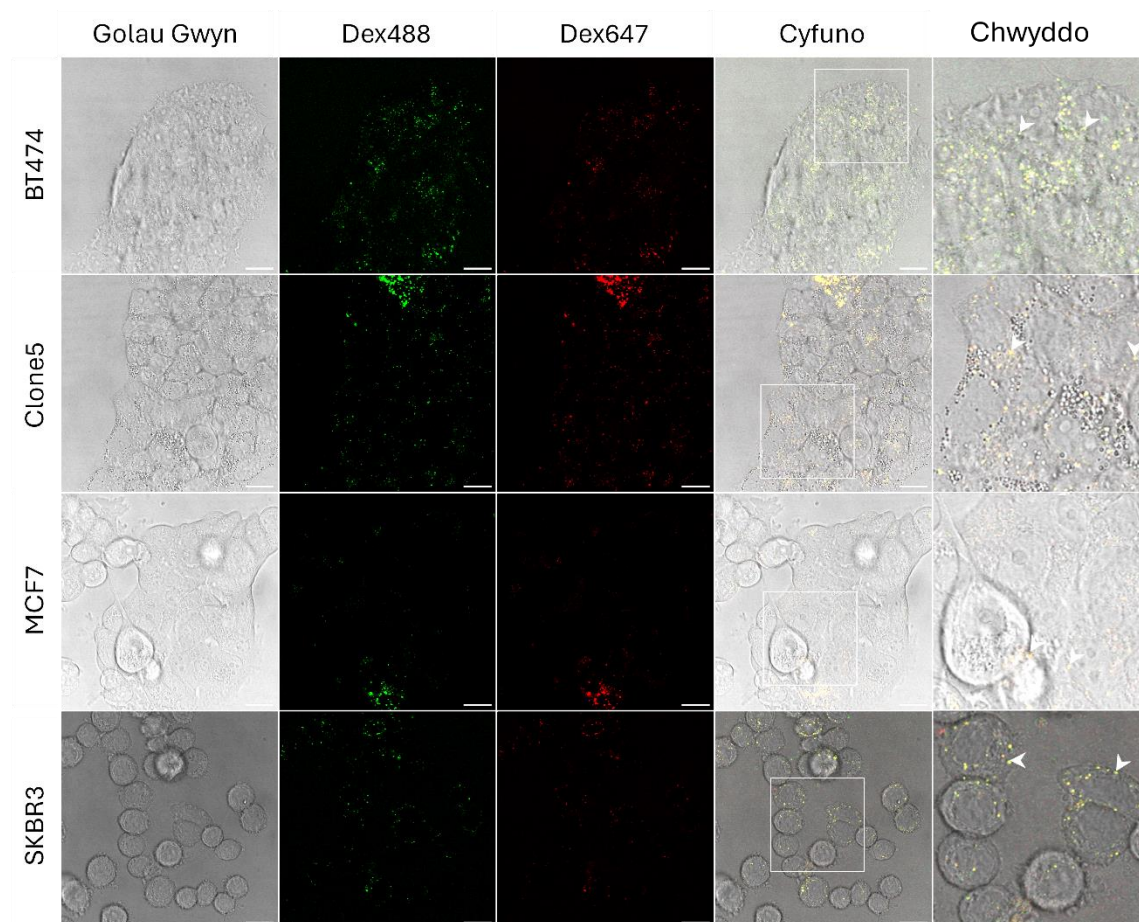
	Pearson 1	Manders 1	Pearson 2	Manders 2	Pearson 3	Manders 3
BT474	0.297	0.413	0.343	0.382	0.173	0.163
Clone5	0.309	0.424	0.117	0.058	0.113	0.091
MCF7	0.057	0.013	0.083	0.045	0.05	0.18
SKBR3	0.238	0.131	0.213	0.184	0.03	0.146

Yn ogystal, mae'n ymddangos mai'r celloedd sy'n dangos cymeriant dextran gwell hefyd yw'r rhanbarthau gyda'r cymeriant NGau uchaf. Gan fod dextran yn mewtleoli trwy wedd hylfol endocytig a maropinocytosis, mae'n bosibl bod y celloedd penodol hyn o ganlyniad yn fwy effeithiol yn y prosesau hyn ac felly yn arwain at gymeriant uwch o

NGau. O edrych ar y data MCF7 mae o'n ymddangos fel petai oherwydd y cyn lleiad o HER2 oedd ar gael i gymharu a'r celloedd HER2+ fod hyn wedi achosi i'r NGau cydgasglu ar gwyneb yr dysgl delweddu. Gan fod yr dysglau wedi orchuddio gyda haen o broteinau, haen sy'n cael ei osod yn arferol gan cynhyrchwyr plastigion labordy i hwyluso rhwymo'r celloedd i'r arwyneb, mae'n debycach mai i'r haen yma mae'r NGau wedi cydgasglu ar yn hytrach na'r gwydr.

4.7 Edrych ar cydleoliad Dextran488 a Dextran647

Mewn ymgais i sefydlu'r terfyn uchaf ar gyfer cydleoliad llwyddiannus, fe wnaethom ailymweld edrych ar y gydleoliad mewn y ddau dextran dros y modelau celloedd. Unwaith eto, gellir gweld bod y gwerthoedd a gofnodwyd rhywfaint o bellter i ffwrdd o'r gwerthoedd cyfernod cydleoliad damcaniaethol uchaf o 1 (Ffigur 4-11). Yn wir, y gwerthoedd uchaf a gofnodwyd oedd yn y celloedd Clone5, ac yna'r celloedd MCF7 ac yna'r celloedd BT474. Ar gyfer y celloedd BT474, mae'r gwerthoedd a gofnodwyd yn disgyn rhwng 0.6 a 0.7, sef y cyfernodau dibynadwy isaf a gofnodwyd. Er bod y gwerthoedd ar gyfer y celloedd SKBR3 yn is, y rheswm am hyn yw nad oeddem yn gallu trothwyo'r ddwy sianel yn gywir, a arweiniodd at ailadrodd yr arbrawf. Fodd bynnag, o hyn, roeddem yn gallu sefydlu'r amodau delweddu gorau posibl wrth symud ymlaen.



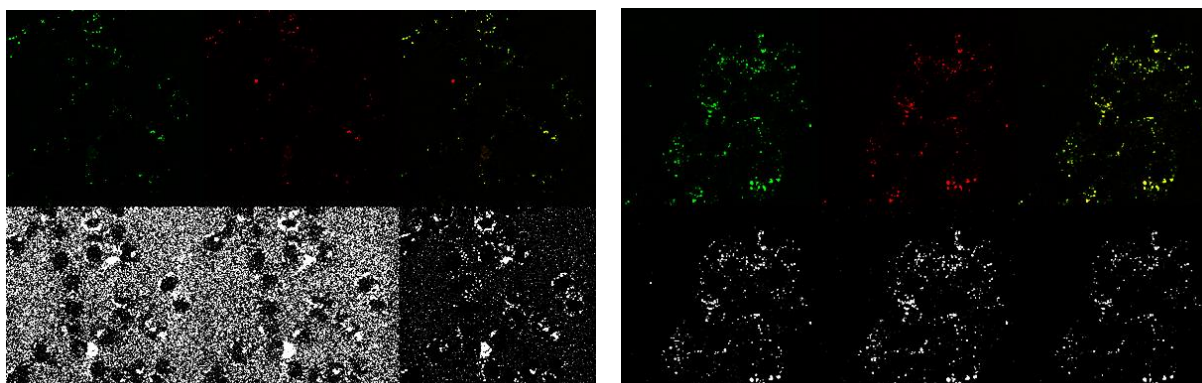
Ffigur 4-11: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 75µg/ml Dextran488. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-5. Dangosir haen sengl gyda'r ardal sydd wedi chwyddo'n cael ei dynodi gan sgwâr gwyn, saethau yn dangos cydleoli. Bar graddfa 20µm

Tabl 4-5: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-11

	Pearson	Manders
BT474	0.676	0.611
Clone5	0.865	0.714
MCF7	0.784	0.626
SKBR3	0.51	0.313

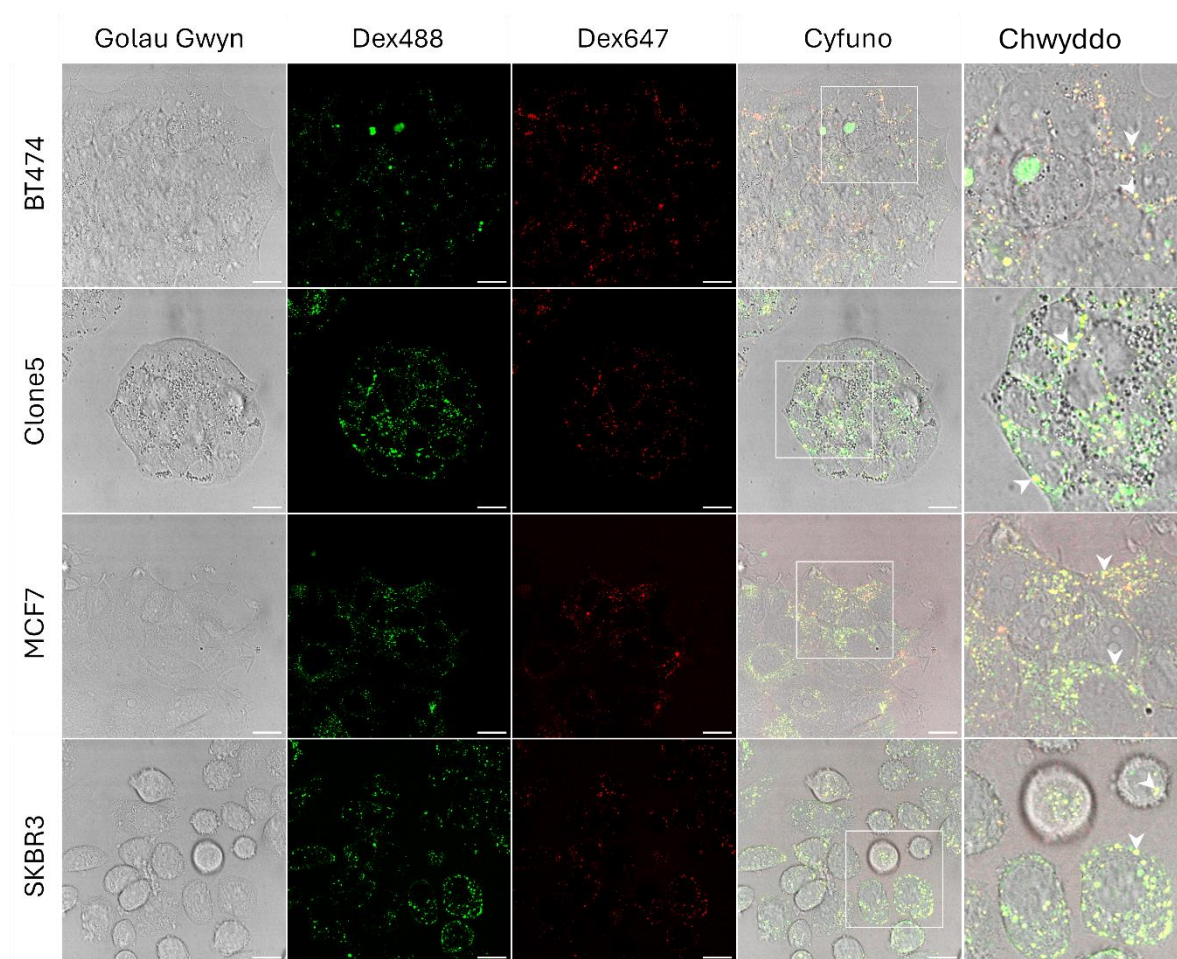
4.8 Mesur y Cydleoliad

Ddefnyddiwyd yr ategyn BIOP JaCOP i fesur y gwerthoedd cydleoleiddio. Ar gael drwy imageJ mae'r ategyn yma'n trothwyo delwedd ac wedyn yn mesur y goryffyrddiad rhwng dau sianel, mae hefyd yn caniatáu cynhyrchu fflworogram y gellir ei ddefnyddio i asesu pa mor gywir yw'r trothwy ar gyfer pob sianel. O hyn, mae'n amlwg a yw trothwy Otsu wedi segmentu'r ddelwedd yn ddibynadwy ai peidio. Mae'n amlwg o'r cefndir anhygoel o uchel yn y celloedd SKBR3 nad oedd y segmentu'n llwyddiannus ac o ganlyniad mae gradd uwch o orgyffwrdd i'w weld rhwng y ddwy sianel fel y gwelir yn ffigur 4-12. Canlyniad terfynol hyn, yn ddigon ddiddorol, yw ei fod yn cynhyrchu gwerthoedd cydleoleiddio is na'r disgwyl. Gan fod y cefndir uchel hefyd yn cynhyrchu nifer o ffynonellau signal newydd wedi'u dosbarthu ar hap ledled y ddelwedd, mae gradd wirioneddol y gorgyffwrdd o fewn y sŵn yn isel, gan arwain at gyfernod Manders is. Mae'n debygol bod y cyfernod Pearson wedi'i effeithio i raddau llai oherwydd ei ffocws ar ddwyster y signal. Er y byddai'r sŵn wedi cael effaith yn ddiamau, gan y bydd fflwroleuedd y dextran yn llawer mwy, mae'n helpu i wneud iawn, i ryw raddau, am y cefndir uchel. Mae hyn yn rhannol yn egluro'r anghysondeb a welir mewn gwerthoedd cydleoleiddio o fewn y celloedd SKBR3. Serch hynny, ailadroddwyd hyn i sicrhau bod y methodoleg yn atgynhyrchadwy ac yn addas i'w ddefnyddio.



Ffigur 4-12: Esiamplau o fflwrogramau sy'n dangos trothwyo llwyddiannus (dde) ac un aflwyddiannus (chwith) lle mae llawer fwy o'r cefndir yn cael ei cynnwys.

Wrth ailadrodd yr arbrawf, fe wnaethom ddelweddu sawl ardal o bob dysgl i gael syniad cymharol gynrychioliadol o'r cydleoliad a oedd yn digwydd. Ar gyfer yr arbrawf hwn, y nod oedd sefydlu beth fyddai'r cydleoliad mwyaf y gellid ei gyflawni gyda'r ddau liw gwahanol o ddextran a defnyddio hynny fel llinell sylfaen i ganiatáu normaleiddio'r cydleoliad rhwng y gwahanol linellau celloedd (Ffigur 4-13). Delweddwyd dwy ardal wahanol fesul dysgl i gael syniad o sut y gallai'r gwahanol ranbarthau amrywio dros yr un poblogaethau. Unwaith eto, fel y disgwyliwyd, gwelwyd gradd uchel o gydleoliad dros y celloedd a gafodd eu trin â'r ddau ddextran o wahanol liwiau ac eto nid oedd hyn yn agos at y gwerth uchaf a adroddwyd o 1 dros y ddau gyfernod cydleoliad fel y gwelir yn Tabl 4-6.



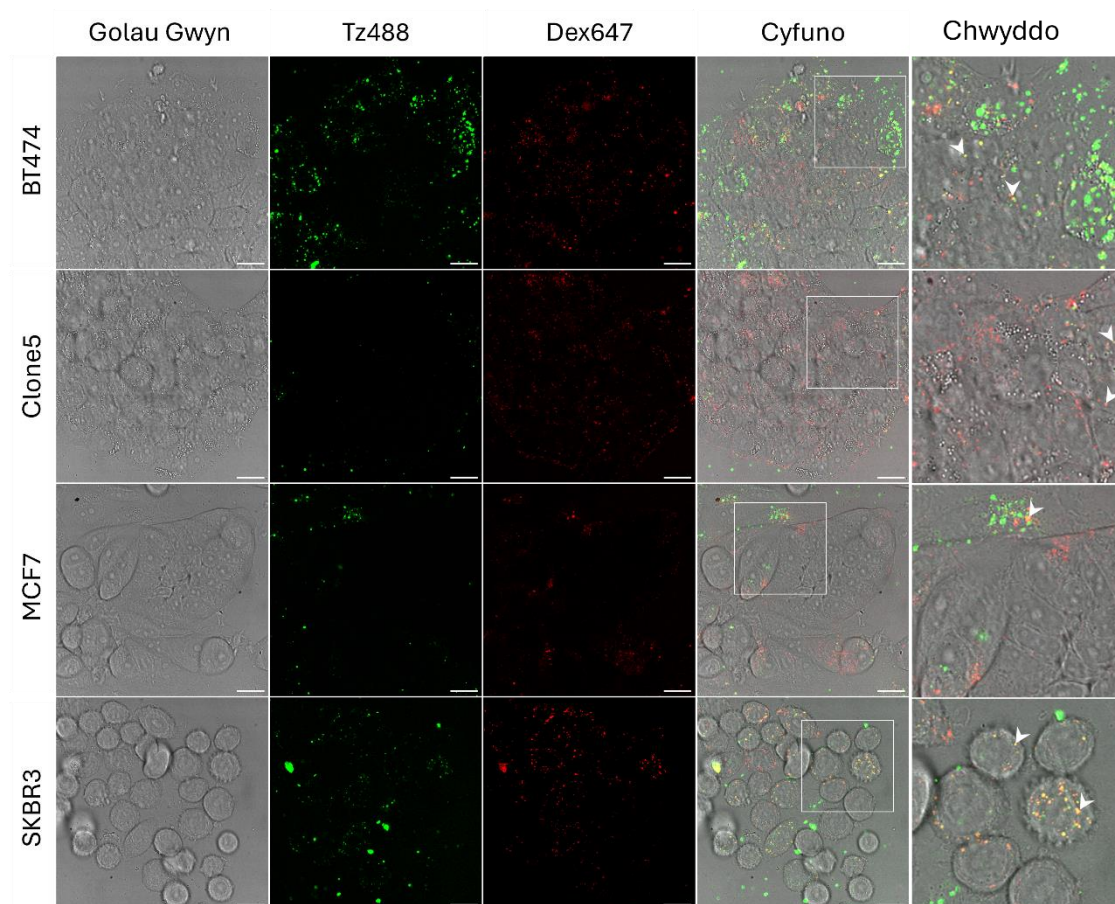
Ffigur 4-13 : Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 75µg/ml Dextran488. Mae'r cyfernodau cydleoli wedi'u rhestru yn Tabl 4-6. Dangosir haen sengl. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn, saethau yn dangos cydleoliad. Bar graddfa 20µm

Tabl 4-6: Cyfernodau cydleoliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-13 ag un ardal arall a delweddir yn yr un arbrawf

	Pearson 1	Manders 1	Pearson 1	Manders 1
BT474	0.569	0.537	0.735	0.705
Clone5	0.648	0.526	0.711	0.498
MCF7	0.501	0.844	0.561	0.374
SKBR3	0.629	0.468	0.65	0.531

Drwy ailadrodd edrych ar yr cydleoiliad rhwng y NGau a'r dextran gyda'r llygad yn unig gellir amcan gradd uchel o rwymo NGau yng nghelloedd SKBR3 a BT474 (Ffigur 4-14). O fewn celloedd SKBR3 mae awgrymiadau bod y NGau'n crynhoi ar wyneb y gell, sy'n amlygu fel clystyrau cymharol fawr o ddwyster fflwroleuol uchel. Yn diddorol, nid yw hyn i'w weld wedi cael unrhyw effaith amlwg ar y cyfernodau cydleoieiddio gyda gwerthoedd Pearson a Manders yn debyg i'w gilydd (Tabl 4-7). Ar gyfer celloedd BT474 unwaith eto mae'r signal wedi'i ganolbwyntio ar gyrion y celloedd gyda gradd uchel o rwymo a mewnosod i'w weld. Yn ddiddorol fodd bynnag y tro hwn mae rhywfaint o fflwroleuedd yn dynodi mewnlifiad y NGau yn deillio o ganol y clwstwr celloedd. O ran celloedd Clone5 ar y llaw arall, er bod rhwymo'n bresennol, mae i raddau llawer is na'r hyn a welir yng nghelloedd BT474 er eu bod hefyd yn dangos rhywfaint o dystiolaeth o gydleoieiddio y ddau fflwroffor o ddyfnder y clwstwr celloedd. Yng nghelloedd MCF7 mae awgrymiadau y gallai'r NGau fod wedi cydleoieiddio gyda'r dextran. Oherwydd bod y NGau'n bresennol yn y dysglau ac, o ganlyniad, yn eistedd ar y celloedd am gyfnod mor hir, mae'n debygol y bydd y amser triniaeth estynedig hwn yn arwain yn naturiol at fewnoli rhai NGau. Er gwaethaf hyn, fodd bynnag, mae'r gwerthoedd cydleoieiddio ar gyfer celloedd MCF7 yn sylweddol is na'r rhai ar gyfer celloedd SKBR3 a BT474, er bod y gwerthoedd a gofnodwyd yn debyg ar gyfer Clone5. Unwaith eto, fodd bynnag, mae'n ymddangos bod y staenio dextran o fewn celloedd MCF7 yn anhygoel o wan o fewn is-boblogaeth o'r celloedd. Byddai'r staenio gwannach hwn yn effeithio ar y cyfernodau cydleoieiddio oherwydd mae posibilrwydd y bydd lysosomau'n parhau i fod heb eu staenio neu, os yw'r signal yn rhy wan, na fydd yn cael ei segmentu'n gywir gan algorithm trothwy Otsu. Mae'r ymddygiad hwn wedi bod yn gyson dros yr holl samplau MCF7 a ddelweddwyd, sy'n dangos ei fod yn nodwedd nodedig o'r linell gell.

At ei gilydd, penderfynwyd cyfartaleddu'r gwerthoedd o fewn pob llinell gell er mwyn cael llinell sylfaen effeithiol i normaleiddio yn ei herbyn, ac o hyn wedyn cymharwyd y rhanbarthau unigol ar gyfer yr arbrofion NGau-dextran yn ei herbyn ac yna mynegwyd y gwerthoedd fel canran o'r cydleoiliad dextran-dextran (Tabl 4-8).



Ffigur 4-14: Celloedd wedi'u trin â 75µg/ml Dextran647 cyn eu golchi a'u trin am 24 awr gyda 500µg/ml PLGA-Tz. Mae'r cyfernodau cydleoili wedi'u rhestru yn Tabl 4-7. Dangosir haen sengl gyda'r ardal sydd wedi chwyddo'n cael ei dynodi gan sgwâr gwyn, saethau yn dangos cydleoiliad. Bar graddfa 20µm

Tabl 4-7: Cyfernodau cydleoiliad Pearson a Manders ar gyfer Ffigur 4-14 ag un ardal arall a delweddir yn yr un arbrawf

	Pearson 1	Manders 1	Pearson 1	Manders 1
BT474	0.305	0.209	0.303	0.09
Clone5	0.161	0.1	0.166	0.166
MCF7	0.124	0.107	0.189	0.087
SKBR3	0.33	0.329	0.247	0.215

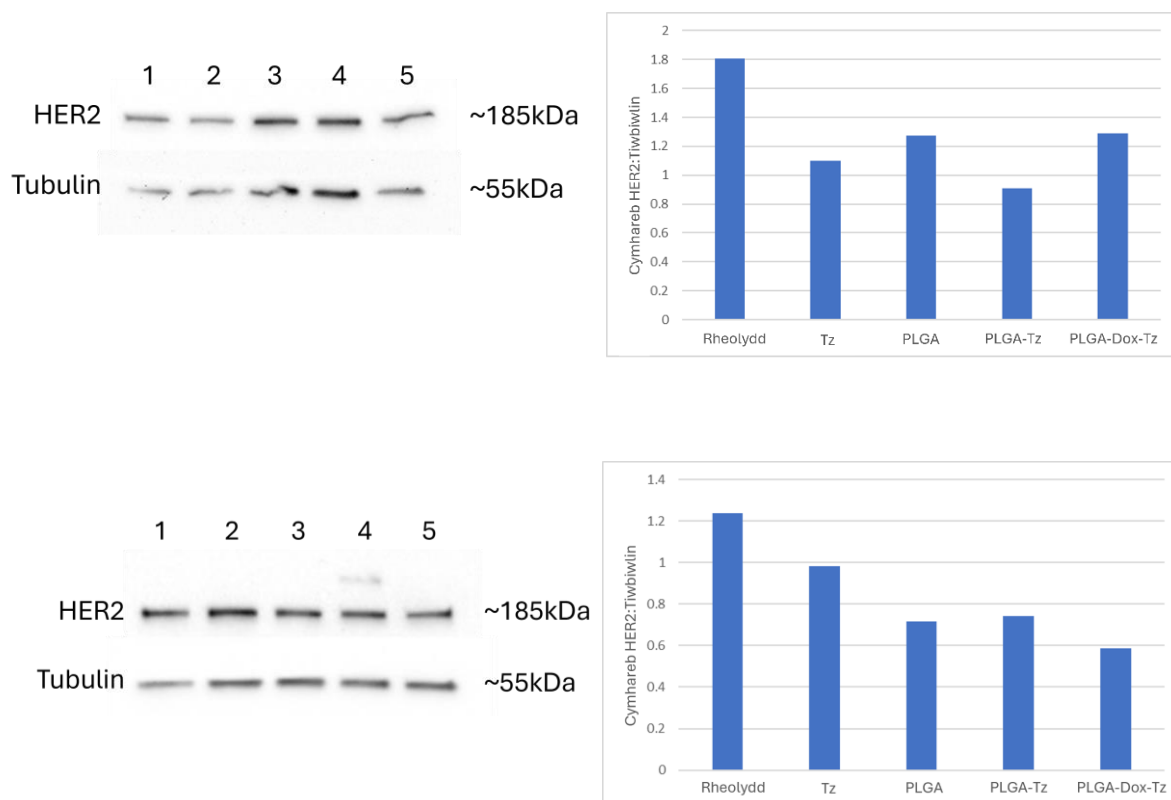
Drwy ddefnyddio'r dull hwn i werthuso'r cyfernodau cydleoleiddio, mae'n amlwg drwy edrych ar Tabl 4-8 bod y gwerthoedd Pearson a Manders cryfaf wedi'u mesur yn y celloedd SKBR3 (51.6 a 65.87 yn y drefn honno). Er bod y gwerthoedd Pearson yn gyson ar y cyfan, mae cyfernodau Manders yn dangos amrywiad mawr rhyngddynt, gyda gwahaniaeth o tua 20% yn cael ei weld rhwng y ddau ranbarth o BT474 ac SKBR3. Mae celloedd MCF7, fel y disgwylir, yn arddangos gradd gymharol isel o gydleoleiddio, fodd bynnag, mae cyfernod Pearson ar gyfer yr ail ranbarth a ddelweddwyd yn llawer uwch na'r disgwyl. O ran celloedd Clone5, roedd y gwerthoedd Pearson a Manders a fesurwyd yn gyson isel i'r rhan fwyaf, gyda'r gwerth Manders yn yr ail ranbarth yn awgrymu y gallai rhywfaint o gydleoleiddio ddigwydd. At ei gilydd, fodd bynnag, o ran mewnosod NGau, mae yna dal cwestiwn gyda'r celloedd sy'n gwneud hi'n anodd amcangyfrif pa mor agored i niwed y byddent i'n NGau ni.

Tabl 4-8: Cyfernodau Cydleoli o Tabl 4-7 wedi normaleiddio'n defnyddio'r gwethoedd yn Tabl 4-6 er mwyn gallu cymharu'n fwy dëg rhwng y modelau celloedd

	NG/Dex P1	NG/Dex M1	NG/Dex P1	NG/Dex M1
BT474	46.78	33.66	46.47	14.49
Clone5	23.69	19.53	24.43	32.42
MCF7	23.35	17.57	35.59	14.29
SKBR3	51.60	65.87	38.62	43.04

4.9 Effaith y NGau ar fynegiant HER2

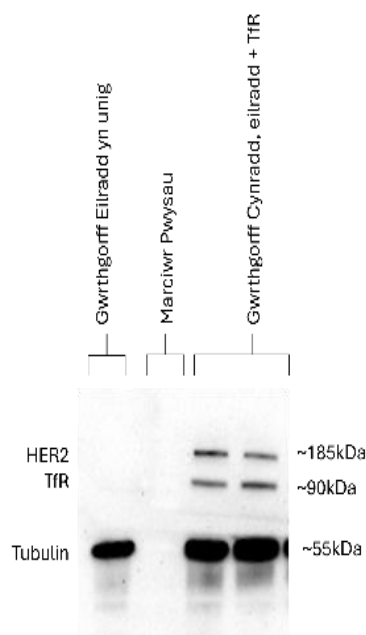
Ar ôl sefydlu bod ein NGau wedi'u mewnnoli ac, i raddau gwahanol yn y modelau cell, yn teithio i'r lysosomau, y cam nesaf oedd canfod os oedd yr HER2 hefyd yn teithio i'r organyn hwn ac yn cael ei ddiraddio gan proteasau e.e Cathepsinau. Fel y soniwyd yn flaenorol, canfu gwaith blaenorol yn ein grŵp yn canolbwyntio ar groesgysylltu HER2 ei fod yn achosi diraddio effeithiol, felly'r cam amlwg nesaf oedd cynnal arbrofion blotio Western i ymchwilio i effeithiau ein NGau, wedi addurno gyda Tz neu beidio, ar fynegiant HER2 (12). Yn gychwynol penderfynwyd dewis pwynt amser 7 awr ar ôl triniaeth gyda NGau mewn celloedd SKBR3. Roedd yr amser yma'n caniatáu digon o amser i'r derbynnydd gyrraedd y lysosomau a cael ei ddiraddio (12). Gwanaed arbrofion hefyd â PLGA-Dox-Tz. Er nad oedd wedi'i gynnwys yn y gwaith arbrofol a drafodwyd uchod roeddem yn bwriadu defnyddio'r NGau hyn ymhellach ymlaen yn y prosiect i ddarganfod ei effeithiau ar fynegiant HER2 y celloedd (Ffigur 4-15). Gan fod effaith y groesgysylltu yn holl bwysig i'r prosiect roedd o'n bwysig iawn i cymharu'r wahaniaeth mewn effaith rhwng y NGau PLGA, rhai PLGA-Tz ac wrth gwrs Tz rhydd yn cael ar y celloedd. I osgoi cymhlethdodau a allai codi gyda faint o'r celloedd BT474 a Clone5 mae'r NGau yn gallu cyrraedd wnaethom canolbwyntio ar rhai SKBR3.



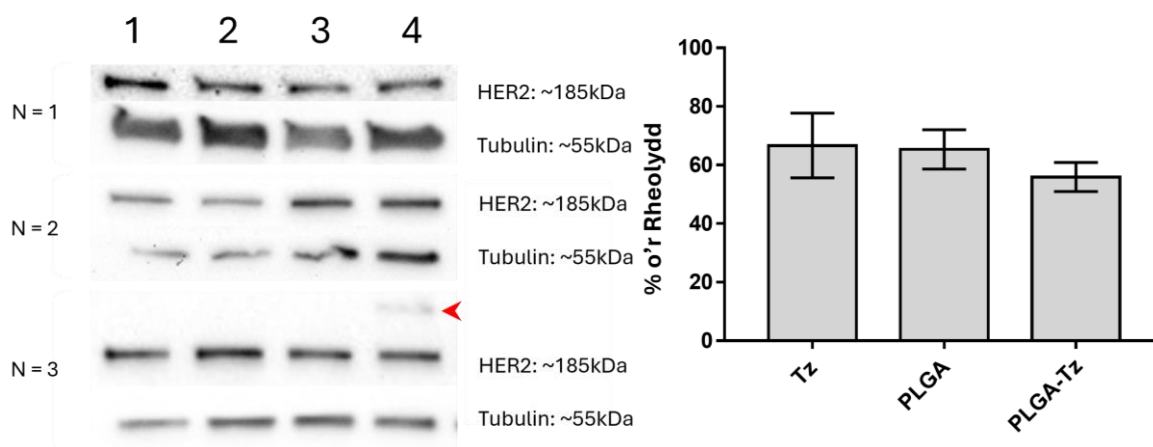
Ffigur 4-15: Effaith wahanol triniaethau ar mynegiant HER2 ar ol 7 awr yn celloedd SKBR3. 1: Rheolydd, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz, 5: 500µg/ml PLGA-Tz-Dox. Defnyddir Tubulin fel rheolydd llwytho er mwyn gallu cymharu'r effaith ar mynegiant ar rhwng triniaethau.

Awgrymodd y canlyniadau blotio cyntaf fod y NGau wir yn effeithio ar y bilen plasma gyda'r triniaeth PLGA-Tz yn dangos gostyngiad cymedrol o tua 40-50% yn mynegiant HER2 o'i gymharu â'r rheolydd . Yn gyffredinol, fodd bynnag, oherwydd natur anghyson y canlyniadau, penderfynwyd peidio a gwneud unrhyw ddadansoddiad ystadegol or data yma. Yn wir, gyda'r canlyniad cyntaf, mae'n debygol bod y gwahaniaethau yn y rheolaeth llwytho wedi cael effaith ar yr arbrawf, yn yr un modd yn yr ail set o ganlyniadau mae'r holl fandiau rheolwyr llwytho yn edrych yn gymharol debyg ac eithrio band y grŵp rheolwyr sy'n ymddangos yn llai amlwg.

Yn ddiddorol, yn ôl hyn, mae pob un o'r triniaethau wahanol wedi cael effaith ar fynegiant HER2 ac nid yw'n ymddangos bod unrhyw wahaniaeth nodedig rhwng NGau addurnedig a heb eu haddurno. Canfyddiad annisgwyl oedd effaith trastuzumab ar fynegiant HER2. Er ei ddefnydd hir fel therapiwtig, mae ei fecanweithiau gweithredu manwl gywir yn bwynt dadlau er y credir yn gyffredinol nad yw'n gyrru mewnoli'r derbynnydd. Cododd hyn amheuan ynghylch a oedd rhan o'r gwrthgorff wedi goddef y paratoad lysad ai peidio gan rwystro'r gwrthgorff cynradd rhag rhwymo. I ateb y cwestiwn yma wnaethom trin celloedd gyda'r brif gwrthgorff am HER2 ac wedyn ar gyfer y blotio defnyddio'r gwrthgorff eilradd yn unig i darganfod os fydd hi'n bosib i gwrthgorff parhau drwy'r camau ar gyfer blotio Western (Ffigur 4-16). Yn ogystal, yn dilyn trin y pilen a delweddu'r bandiau, gellir gweld band gwan ychwanegol ar bwysau moleciwlaidd uwch na HER2 er mai dim ond yn sianel PLGA-Tz ar y bilen N = 3 (Ffigur 4-17, saeth coch). Ar gyfer yr atgynhyrchiad terfynol, penderfynon ni roi'r gorau i'r NGau PLGA-Dox-Tz gan nad oeddem yn siŵr ar y pryd ynghylch eu gwenwyndra posibl. Y rhesymeg oedd, gan nad oeddem wedi sefydlu eu gwenwyndra, ei bod yn bosibl y gallai hyn ymyrryd â chymeriant gronynnau ac o ganlyniad mynegiant HER2.



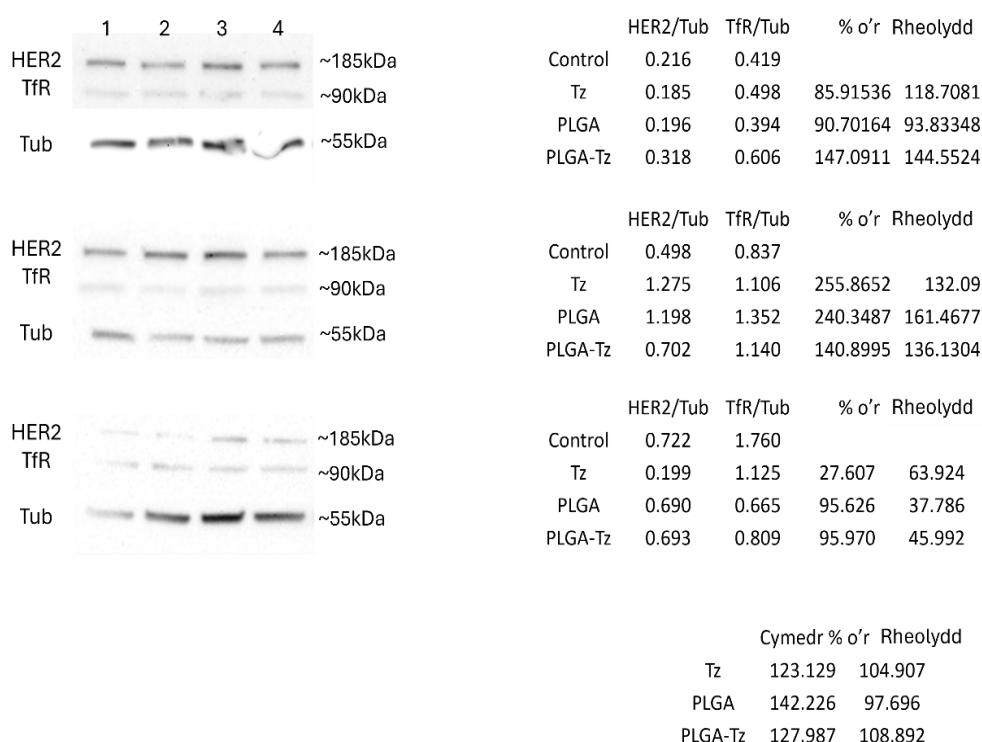
Ffigur 4-16: Ymchwiliad i weld a oedd yn bosibl i wrthgorff oroesi'r broses o baratoi lysat. Cafodd celloedd SKBR3 eu trin â'r gwrthgorff cynradd cyn lysis ac yna eu trin â'r gwrthgorff eilaidd yn unig ar gyfer blotio.



Ffigur 4-17: Gall ein NGau achosi gostyngiad mewn mynegiant HER2 o fewn celloedd SKBR3. N=3. 1: Rheolydd, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz. Graff yn dangos yr cyfartaledd gyda'r bariau cyfeiliornad yn dynodi'r gwyrriad safonol

4.10 Mynegiant y Derbynnnydd Transferrin

Ar ôl yr ymchwiliadau rhagarweiniol i fynegiant HER2 yn y celloedd SKBR3, i roi data oedd yn anodd i'w dehongli, penderfynwyd gwneud mwy o arbrofion yn cynnwys mewn llinellau eraill HER2 uchel a'r linell MCF7. Roedd yr arbrawf hefyd yn cynnwys mesur derbynnnydd bilen blasma arall sef y derbynnnydd transferrin (TfR). Drwy gynnwys y derbynnnydd hwn, mae'n caniatáu inni weld a yw'r effaith ar fynegiant HER2 yn effaith benodol neu a yw'n lawr-reoleiddio amhenodol a achosir gan y NGau yn setlo ar y celloedd ac yna'n cael eu mewnnoli. Ar gyfer yr arbrawf hwn, cynhyrchwyd set ffres o lysadau protein ar gyfer y celloedd SKBR3 i gynnal cysondeb dros llinellau celloedd.



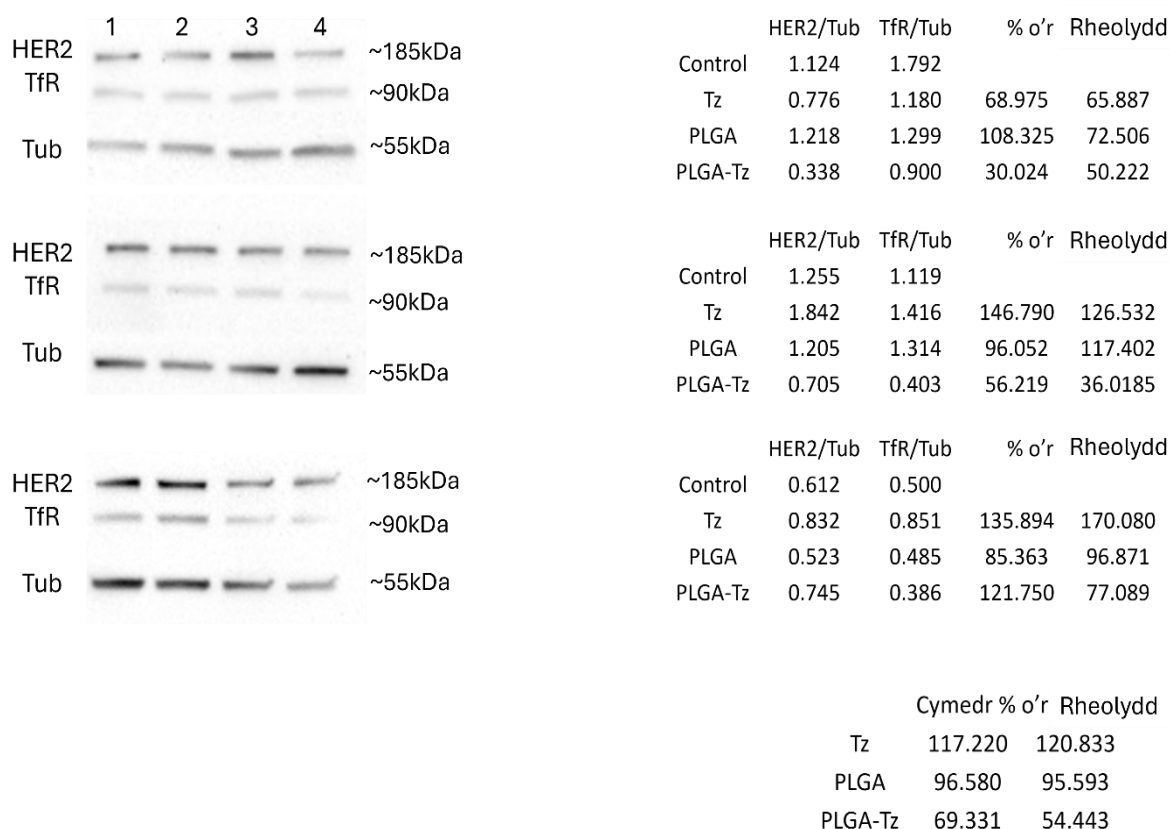
Ffigur 4-18: Tri dyblygiad annibynnol yn archwilio effaith ein NGau ar fynegiant HER2 mewn celloedd BT474 ochr yn ochr â'r densitometreg berthnasol a'r cyfartaledd wedi'i normaleiddio dros pob un ohonynt. Defnyddir Tubulin fel y rheolydd llwytho a'r derbynnnydd transferrin (TfR) fel marciwr i cadarnhau os oedd unrhyw effaith yn penodol i HER2 neu beidio. 1: Rheolydd, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz

Ar gyfer celloedd BT474, yn y atgynhyrchiad cyntaf a'r ail, ni welwyd unrhyw ostyngiad ym mynegiant HER2 (Ffigur 4-18). Nid yw'r atgynhyrchiad cyntaf yn dangos unrhyw newid yn mynegiant HER2 dros y gwahanol grwpiau triniaeth ac eithrio'r grŵp PLGA-Tz a ddangosodd, yn annisgwyl braidd, gynnydd yn y mynegiant - er ein bod yn cyfrannu hyn at yr anghysondeb yn y band tiwbiwlin, sef y rheolaeth llwytho, sydd o ganlyniad yn effeithio ar y dadansoddiad densitometrig dilynol. O ran y TfR, gwelir ychydig o uwchreoleiddio o ganlyniad i triniaeth gyda'r Tz, tra bod triniaeth gyda NGau PLGA yn cael gymaint o effaith ar y mynegiant a'r rheolydd ac mae'r broblem uchod gyda'r band tiwbiwlin PLGA-Tz yn atal dadansoddiad cywir. Unwaith eto, fodd bynnag, yn yr ail atgynhyrchiad, mae mynegiant HER2 a TfR ar eu gwannaf yn y lôn rheolydd. Mae'r atgynhyrchiad hwn hefyd yn awgrymu nad oes unrhyw dystiolaeth o berthynas rhwng mynegiant HER2 a TfR gyda'r grŵp Tz yn dangos cymhareb mynegiant o 1.28 ac 1.11 o HER2/Tub a TfR/Tub yn y drefn honno, tra ar gyfer y grŵp PLGA-Tz, y gwerthoedd cyfatebol yw 0.7 ac 1.14 yn y drefn honno. Mae hyn yn dangos bod gostyngiad sylweddol wedi bod yn mynegiant HER2 nad oedd ganddo unrhyw effaith ar fynegiant y TfR. Ar gyfer y drydedd atgynhyrchiad, ymddengys nad oes gan y NGau fawr ddim effaith ar fynegiant HER2, tra bod y Tz i bob golwg wedi cael effaith sylweddol – gan leihau'r gymhareb HER2/Tub o 0.72 i 0.20. O ran y gymhareb TfR/Tub, mae gostyngiadau sylweddol dros yr holl samplau eraill o'i gymharu â'r rheolydd. Gallai'r bandiau gwan esbonio'r canlyniadau gwrthgyferbyniol ynghylch mynegiant o fewn y atgynhyrchiad hwn. Ar y cyfan, fodd bynnag, o fewn llinell gelloedd BT474, nid yw'n ymddangos bod y NGau yn achosi effaith mewn mynegiant HER2 na TfR. Er y bu effeithiau ar fynegiant derbynnydd o fewn atgynhyrchiadau unigol, nid yw'r effeithiau hyn wedi bod yn gyson.

O ran mynegiant TfR, wrth gymharu dros samplau, nid oes unrhyw wahaniaeth rhwng samplau.

Wedi cwblhau edrych ar y newidiadau mewn mynegiant yn y BT474 y cam nesaf oedd i edrych ar y rhai Clone5 ac er gwaethaf y tebygrwydd rhyngddynt wrth ymchwilio i fynegiant HER2 roedd y canlyniadau yn wahanol. Ar gyfer yr atgynhyrchiad cyntaf o ran mynegiant HER2, gwelwyd gostyngiad o tua 31% yn y grŵp Tz, ond dim gostyngiad gyda'r NGau PLGA ac o ran y NGau PLGA-Tz addurnedig, roedd gostyngiad sylweddol o bron i 70% (Ffigur 4-19). Yn ddiddorol, nid yw hyn yn cyd-fynd â mynegiant y TfR lle mae pob grŵp triniaeth yn dangos gostyngiad. Ar gyfer y grŵp Tz, mae'r gostyngiad mewn mynegiant yn debyg i'r hyn a welir yn HER2, mae'r grŵp NGau PLGA yn dangos gostyngiad o ~28% tra yn y grŵp PLGA-Tz roedd gostyngiad o ~50%. Ar gyfer y grŵp triniaeth PLGA-TZ, er bod y gostyngiad hwn yn sylweddol, nid yw i'r un radd â'r un mewn mynegiant HER2. O ran yr ail atgynhyrchiad, y tro hwn, nid oedd unrhyw ostyngiad yn mynegiant HER2, na'r TfR oedd wedi codi ar ôl triniaeth Tz. Cynhyrchodd y NGau PLGA ostyngiad dibwys o 4% yn mynegiant HER2, fodd bynnag, y tro hwn ni chafwyd unrhyw ostyngiad yn mynegiant y TfR. Yn y grŵp PLGA-Tz gwelir tuedd debyg lle mae'r NGau'n cynhyrchu gostyngiad yn HER2 a'r TfR, fodd bynnag, y tro hwn roedd gan yr olaf y gostyngiad mwyaf amlwg o'i gymharu â'r rheolydd - gostyngiad o ~44% ar gyfer HER2 a ~64% ar gyfer y TfR. Ar gyfer yr atgynhyrchiad Clone5 terfynol, eto ni welwyd unrhyw newidiadau yn mynegiant HER2 na'r TfR yn y grŵp triniaeth transferrin, gan adael yr atgynhyrchiad cyntaf fel yr allanolyn. Ar gyfer y NGau PLGA, y tro hwn, roedd gostyngiad bach yn HER2 a'r TfR gyda gostyngiad dibwys o ~15% a gostyngiad dibwys o ~3% yn y drefn honno. Methodd y PLGA-Tz ar gyfer yr atgynhyrchiad hwn â chynhyrchu gostyngiad yn mynegiant HER2, fodd bynnag, fe gynhyrchwyd gostyngiad o 23% yn mynegiant y TfR.

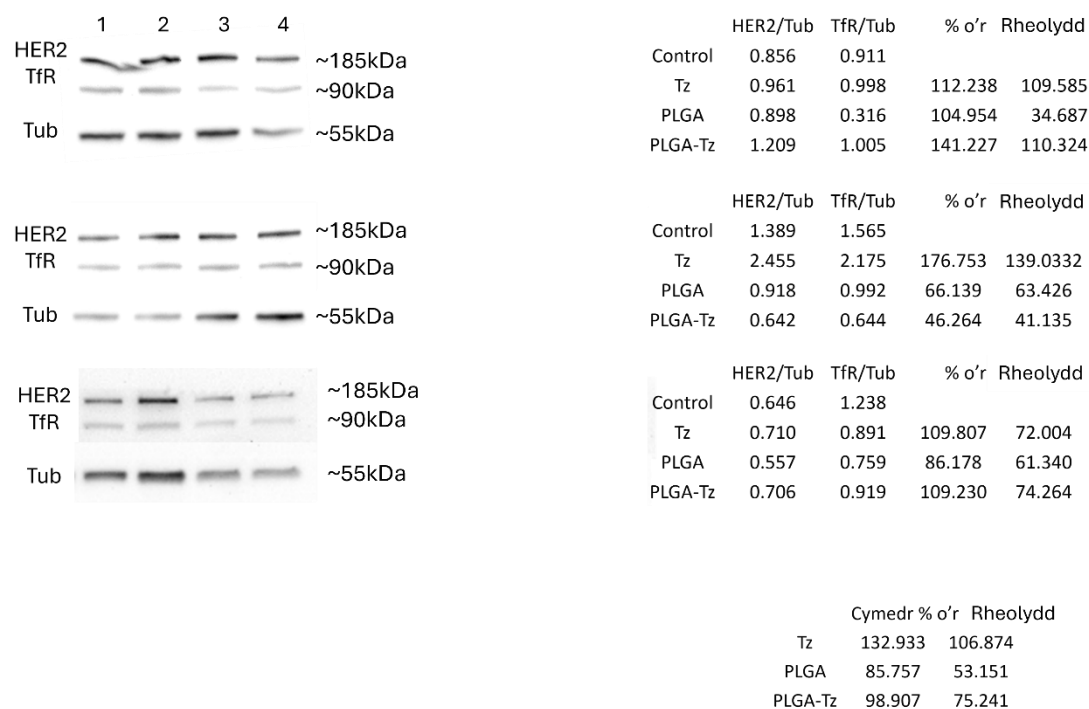
At ei gilydd, wrth gasglu'r canlyniadau at ei gilydd nid oes unrhyw ostyngiad yn y mynegiant a gynhyrchir gan y Tz tra ar gyfer y NGau PLGA mae gostyngiad dibwys ym mynegiant HER2 a TfR gyda gostyngiad o ~3.5% a ~4.5% yn y drefn honno. O ran y PLGA-Tz ar y llaw arall mae gostyngiad cymedrol ym mynegiant HER2 gyda gostyngiad o ~30% a welir tra yn y TfR mae'r gostyngiad yn fwy sylweddol ~46%.



Ffigur 4-19: Tri dyblygiad annibynnol yn archwilio effaith ein NGau ar fynegiant HER2 mewn celloedd Clone5 ochr yn ochr â'r densitometreg berthnasol a'r cyfartaledd wedi'i normaleiddio dros pob un ohonynt. Defnyddir Tubulin fel y rheolydd llwytho a'r derbynydd transferrin (TfR) fel marciwr i cadarnhau os oedd unrhyw effaith yn penodol i HER2 neu beidio. 1: Rheolydd, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz

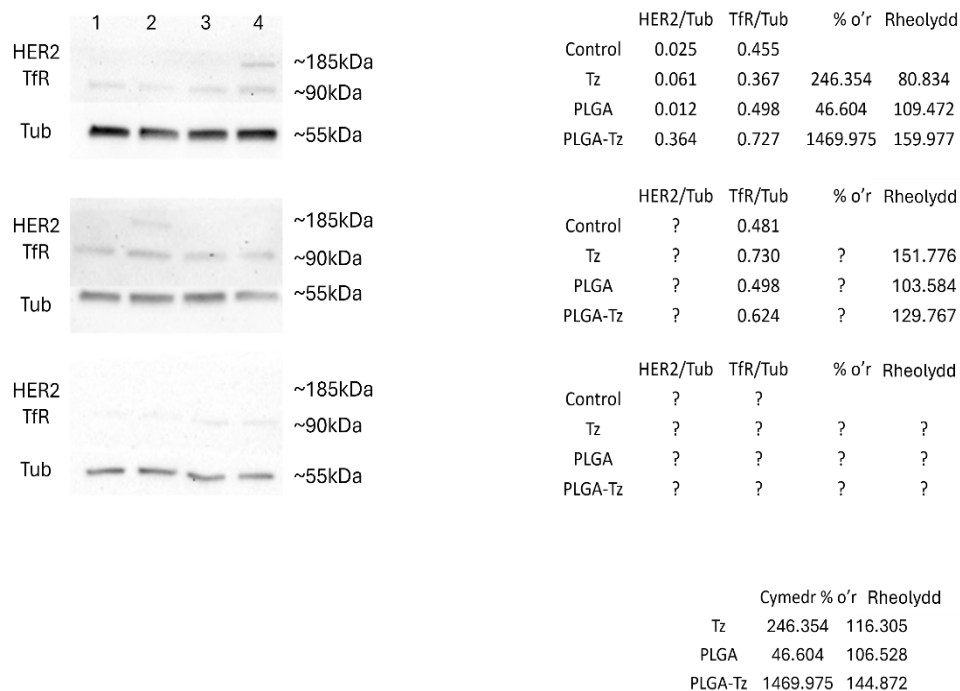
I orffen yr ymchwiliad i'r newidiadau mewn mynegiant HER2 a'r TfR a ysgogwyd gan ein NGau yn y celloedd HER2+ BT474 a Clone 5, gwnaethom yr un arbrofion yn y linell SKBR3 (Ffigur 4-20). Ar gyfer yr atgynhyrchiad cyntaf, ni chynhyrchodd yr un o'r triniaethau ostyngiad mewn mynegiant HER2, tra o ran mynegiant TfR, yr unig ostyngiad

a welir yn y grŵp PLGA, sef gostyngiad sylweddol o ~65%. Gellid priodoli'r diffyg effaith ar gyfer mynegiant HER2 i'r band HER2 anffurfiedig ar gyfer y grŵp rheolydd, gan wneud densitometreg yn anodd. Byddai hyn o bosibl wedi gostwng y dwysedd a gofnodwyd ar gyfer y band, gan arwain at oramcangyfrif y mynegiant cymharol ar gyfer gweddill y bandiau HER2. Ar gyfer yr ail ailadrodd, nid oedd unrhyw newid yn mynegiant HER2 na TfR ar gyfer y grŵp Tz. Fodd bynnag, o ran y grwpiau PLGA a PLGA-Tz, llwyddodd y ddau i gynhyrchu gostyngiad sylweddol mewn mynegiant ar gyfer y derbynyddion HER2 a TfR. Ar gyfer y grŵp PLGA, mesurwyd y gostyngiad mewn derbynyddion HER2 a TfR fel ~34% a ~37% yn y drefn honno, tra ar gyfer y grŵp PLGA-Tz roedd yn fwy amlwg sef ~54% a ~59% yn y drefn honno. O safbwynt yr atgynhyrchiad terfynol, unwaith eto ni achosodd y grŵp Tz unrhyw newid yn mynegiant y derbynydd. Ar gyfer y NGau PLGA, roedd y newid yn mynegiant HER2 yn llai, tra bod yr un ar gyfer y TfR yn yn debyg gyda gostyngiadau o ~14% a ~39%. Ni chynhyrchodd y triniaeth PLGA-Tz ostyngiad yn mynegiant HER2 y tro hwn, er y gwelwyd gostyngiad o ~26% ar gyfer y TfR. At ei gilydd, wrth gyfuno'r canlyniadau, nid oes unrhyw ostyngiad yn mynegiant HER2 na'r TfR a achosir gan Tz. Cynhyrchodd y NGau PLGA heb Tz ostyngiad bach o ~14% yn mynegiant HER2 a gostyngiad mwy sylweddol o ~39% yn mynegiant y TfR. O ran y grŵp PLGA-Tz, yn annisgwyl braidd, cawsant effaith llai amlwg ar fynegiant HER2 – gan gynhyrchu gostyngiad dibwys o 1%. Fodd bynnag, o ran y TfR, roedd y gostyngiad yn llawer mwy sylweddol gan ei fod wedi'i fesur fel ~25%.



Ffigur 4-20: Tri dyblygiad annibynnol yn archwilio effaith ein NGau ar fynegiant HER2 mewn celloedd SKBR3 ochr yn ochr â'r densitometreg berthnasol a'r cyfartaledd wedi'i normaleiddio dros pob un ohonynt. Defnyddir Tubulin fel y rheolydd llwytho a'r derbynydd transferrin (TfR) fel marciwr i cadarnhau os oedd unrhyw effaith yn penodol i HER2 neu beidio. 1: Control, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz

Ar ôl sefydlu effeithiau'r gronynnau PLGA heb eu haddurno, a'r NGau PLGA-Tz ar fynegiant HER2 a TfR dros y llinellau celloedd HER2+, cafwyd ymchwiliad ei heffaith ar y MCF7 HER2-isel (Ffigur 4-21). Yn ymarferol, fodd bynnag, roedd hyn yn her oherwydd y mynegiant sylweddol is o HER2 o'i gymharu â'r llinellau celloedd HER2+. Yn wir, dros pob un o'r 3 dyblygiad, roedd y signalau yn y band HER2 yn rhy wan i allu cynnal densitometreg ddibynadwy. Yn yr un modd, roedd y bandiau a oedd yn nodi mynegiant TfR yn wanach nag a ragwelwyd, er bod densitometreg yn bosibl yn y ddau ddyblygiad cyntaf. Dros y rhain, dim ond y grŵp Tz yn y dyblygiad cyntaf a gynhyrchodd ostyngiad mewn mynegiant, a fesurwyd yn ~19%.



Ffigur 4-21: Tri dyblygiad annibynnol yn archwilio effaith ein NGau ar fynegiant HER2 mewn celloedd MCF7 ochr yn ochr â'r densitometreg berthnasol a'r cyfartaledd wedi'i normaleiddio dros pob un ohonynt. Defnyddir Tubulin fel y rheolydd llwytho a'r derbynydd transferrin (TfR) fel marciwr i cadarnhau os oedd unrhyw effaith yn penodol i HER2 neu beidio. 1: Control, 2: 50nM Tz, 3: 500µg/ml PLGA, 4: 500µg/ml PLGA-Tz

4.11 Trafodaeth

Yn gyffredinol, mae ein NGau yn eithaf tebyg i'r hyn a geir yn y llenyddiaeth. Yn fras, gall maint cyfartalog, PDI a photensial zeta NGau PLGA amrywio'n fawr yn seiliedig ar y broses weithgynhyrchu yn bennaf. Wrth optimeiddio sglodion microfluidig ar gyfer cynhyrchu NGau PLGA, defnyddiodd Chiesa et al nifer o fformwleiddiadau gwahanol a rhyngddynt gynhyrchwyd baratoadau NGau rhwng 63.2-260.6nm o ran maint gyda PDIs o 0.063-0.461 a photensialau zeta rhwng -8.8 a -45.9 (13). Yn ddiddorol, roedd yna anghysondebau yng nghryfder y signal rhwng y Tz488 a'r Rhb yng ffigyrau 4-3 a 4-4; dyw'r rheswm dros hyn ddim yn amlwg. Ar gyfer signal Tz488 gallai fod oherwydd gradd anghyson o labelu dros y NGau tra ar gyfer y RhB gallai fod oherwydd gwahaniaethau yn faint o RhB oedd wedi'i mewngapsiwleiddio rhwng gronynnau unigol drwy amrywiadau yn eu maint. Yn ogystal, gallai fod rhywfaint o golled fflwroleuedd yn dilyn mewnosod ond wedi wneud yr arbrofion dextran mae hyn yn annhebygol. Ar y cyfan, fodd bynnag, gyda 100µg/ml roedd dwyster y gronynnau yn llawer gwannach nag a ragwelwyd gyda signalau anhygoel o wan yn cael eu gweld yn y celloedd BT474 a Clone5 gyda chynnydd cymedrol, ond yn dal yn siomedig, yn cael ei weld yn y celloedd SKBR3. Fodd bynnag ar ôl codi crynodiad y triniaeth i 500µg/ml roedd graddfa gref o rwymo detholus i'w weld a oedd yn galonogol, yn enwedig gan fod rhwymo llwyddiannus wedi'i weld yn y celloedd Clone5. O safbwynt clinigol, roedd hyn yn galonogol gan ei fod yn awgrymu y gellid, mewn theori, defnyddio'r NGau mewn cleifion a oedd wedi cael triniaeth Tz yn aflwyddiannus o'r blaen neu mewn achosion eraill o wrthwynebiad.

Y tu allan i'r astudiaeth hon mae grwpiau eraill wedi cynhyrchu NGau sy'n cynnwys Dox sy'n llawer llai (50-80nm), yn debyg (150-220nm) neu'n llawer fwy o ran maint (100-800nm) (3,14,15). Yn ddiddorol, er nad oes gwahaniaeth maint mawr rhwng ein NGau gwag a'n NGau wedi'u llwytho, mae astudiaethau eraill wedi dangos gwahaniaeth maint sylweddol rhwng fformwleiddiadau, er enghraifft y cynnydd o 88nm ym maint a achoswyd gan lwytho â Dox (16). Roedd effeithlonrwydd capsiwleiddio'r fformwleiddiadau hyn yn amrywio'n fawr, gyda'r uchaf yn 83% a'r isaf yn 15.09% (16). Er y gall y dull gweithgynhyrchu ddylanwadu ar effeithlonrwydd yn sicr, adroddwyd y gall priodweddau'r PVA ei hun effeithio'n fawr ar effeithlonrwydd capsiwleiddio (17).

O ganlyniad i hyn, gall ddylanwadu'n fawr ar nifer y gronynnau sydd eu hangen i ddarparu crynodiad digonol o gyfansoddyn effeithiol mewn astudiaethau in vitro ac in vivo. Yn wir, un o'r heriau a wynebwyd gennym gyda'r arbrofion hyn oedd penderfynu pa grynodiad i'w ddefnyddio i drin y celloedd. O fewn y llenyddiaeth, mae'r gwerthoedd a adroddwyd yn amrywio'n fawr gyda'r rhan fwyaf yn dewis adrodd crynodiadau triniaeth yn seiliedig ar y cyfansoddyn wedi'i gapsiwleiddio. Ar y cyfan, mae adrodd nifer y gronynnau yn fwy aml, fodd bynnag, mae angen offer dadansoddi olrhain NGau mwy arbenigol, nad oedd gennym fynediad atynt ar adeg yr arbrofion hyn. Yn wir, nid yw nifer o astudiaethau'n adrodd ar nifer y NGau a defnyddir ganddynt (1,2,18). Adroddwyd y gall triniaeth â gormod o NGau, yn annibynol o beth sydd wedi ei fewngapsiwleiddio, arwain at digwyddiad lle mae'r celloedd yn mynd drwy broses o endocytosis a achosir gan niwed i, neu straen ar, ffisioleg y celloedd (10). Mae hyn wedi ei nodi gyda NGau â chineteg ymlifiad uchel lle mae canlyniad y galw metabolaidd o fewnoli'r NGau yn

cynhyrchu galwad sylweddol am ATP sydd yn ei dro yn achosi straen mitochondriaidd (19). O ganlyniad, os yw'r straen yn ddigonol, gall sbarduno awtoffagi a all gyfrannu at y gwenwyndra a welir mewn astudiaethau hyfywedd. Effaith hyn yw y gall achosi i wenwyndra ac effeithiolrwydd y NGau gael eu goramcangyfrif a fydd yn ei dro yn cyfrannu at gyfieithiad gwael NGau wrth iddynt fynd i mewn i'r treialon clinigol.

Ar gyfer yr astudiaethau i fewnoli NGau, efallai y dylsid yn y dyfodol gynnal microsgopeg amser-dros-amser i fonitro cyflymder y mewnoli, sut mae'r cydleoliad yn newid dros amser, a gweld y duedd wrth i fwy o NGau gael eu mewnoli. O hyn gallem bennu pa mor hir y mae'n ei gymryd i NGau gael eu mewnoli ac amcangyfrif pa mor hir y bydd y signal fflwroleuol yn y lysosomau yn parhau. O ran y cydleoliad, mae Moreno-Echeverri et al wedi tynnu sylw at werth defnyddio cyfernodaau cydleoliad Pearson a Manders gyda'i gilydd ar gyfer dadansoddi cydleoliad NGau-lysosomau yn benodol. (11). Maen nhw'n dadlau nad yw cyfernod cydleoliad Pearsons yn rhoi gwybodaeth fanwl am ddosbarthiad lysosomaidd y NGau, a gellir cywiro hyn drwy adrodd cyfernod Manders ochr yn ochr.

Gyda'r data a ddangosir yn ffigur 4-9, wrth i ni ymchwilio i'r cyfernodaau cydleoliad rhwng yr NGau a'r dextran647, penderfynon ni eu bod yn annibynadwy a byddai angen ailadrodd yr arbrawf yn yr amod mwy optimaidd gan fod y sŵn presennol yn golygu ei bod hi'n anodd trothwyo sianel y dextran yn ddibynadwy. Mae'n ymddangos serch hynny gan fod cydleoliad yn bresennol yn y llinellau celloedd HER2+ gyda gorgyffwrdd yn y signal yn weladwy yn y celloedd BT474 a Clone5 er nad i'r un graddau ag a welir yn y

celloedd SKBR3. Ar gyfer celloedd BT474 a Clone5, mae dwyster y NGau yn isel yng nghanol y clystyrau, ac yn llawer uwch o amgylch eu cyrion, er bod hyn yn debygol o fod oherwydd nad yw'r NGau'n gallu cyrraedd y canol yn gorfforol. Ar gyfer celloedd SKBR3, fodd bynnag, gallai'r mynediad mwy sydd ar gael i'r NGau esbonio'r cymeriant mwy a welir yn y celloedd hyn. Mae'n bwysig nodi, fodd bynnag, nad yw pob cell yn cael ei heffeithio'n gyfartal, ac nid yw rhai celloedd yn dangos unrhyw arwyddion o fewnoli'r NGau, gyda morffoleg yn ffactor dibwys. Er na welwyd unrhyw fewnoli yn llinell gelloedd MCF7, mae proffil y dextran yn dangos patrwm rhyfedd. Mae rhai rhanbarthau'n arddangos signalau fesiglaidd clwstwr amlwg tra bod gan ranbarthau eraill ychydig iawn o ddwyster signal neu ddim dwyster signal o gwbl. O edrych ar y data golau gwyn, nid yw'r duedd hon yn dilyn celloedd unigol. Roedd hyn yn ffactor yn ein penderfyniad i godi crynodiad y dextran ar gyfer arbrofion yn y dyfodol.

Ar ôl y setiau hyn o arbrofion, fe benderfynon ni eu hailadrodd gan ddefnyddio'r crynodiad dextran uwch ac ochr yn ochr â grŵp triniaeth ychwanegol. Gwnaed cyfrif hefyd o'r cyfernod cydleoliad Pearson, sy'n mesur gorgyffwrdd mewn dwyster signal i bennu'r berthynas rhwng dau grŵp (11). Yn ddamcaniaethol, os oes gorgyffwrdd perffaith, yna mae gwerth Pearson yn 1, os nad oes perthynas, yna mae'r gwerth yn 0, ac os oes cydberthynas gwrthdro berffaith rhyngddynt, mae'r gwerth yn -1. Mae cyfernod Manders, ar y llaw arall, yn canolbwyntio'n gyfan gwbl ar y gorgyffwrdd mewn ffynonellau signal rhwng y ddwy sianel ac mae'n annibynnol ar ddwyster signal (11). Oherwydd hyn, rydym yn ystyried mai'r ffordd orau o ddehongli graddfa'r cydleoliad yw mesur y ddau gyfernod. Mae natur yr arbrawf yn tanselio hyn gan na ellir dibynnu ar y

naill werth na'r llall yn gyfan gwbl. Gan fod cyfernod Pearson yn dibynnu ar ddwyster signal, mae'n bosibl y bydd rhan o'r fflworofforau wedi diraddio wrth i'r dextran gronni yn y lysosomau. Ar gyfer cydleoliad Manders, gan ei fod yn rhoi mwy o bwyslais ar ffynhonnell y signal, mae'n agored i danamcangyfrif y cydleoliad. Wrth i ni ymchwilio i gyd-leoliad lysosomaidd, bydd cargo mewnoledig yn cronni o fewn yr adrannau hyn gan leihau cyfanswm nifer y ffynonellau signal unigol yn y ddelwedd.

Er y gellir mesur y radd uchaf damcaniaethol o gydleoliad ar gyfer y ddau gyfernod gydag 1, yn ymarferol bydd amrywiadau yn yr hyn fydd yr uchafswm damcaniaethol rhwng gwahanol linellau celloedd. I fynd i'r afael â hyn, mae'r grŵp arbrofol ychwanegol sydd wedi'i gynnwys yn defnyddio dau wahanol liw o ddextran wedi'i dagio'n fflwroleuol. Yn yr un broses union â'r grŵp a gafodd driniaeth NGau, byddant yn cael eu thrin â dextran647 ac yna'n cael eu golchi cyn ychwanegu triniaeth bellach. Ar gyfer y grŵp NGau, bydd hyn yn 500µg/ml PLGA-Tz, tra ar gyfer y grŵp newydd hwn bydd yn 75µg/ml dextran488 yn lle hynny. Bydd hyn yn gwasanaethu fel meincnod ar gyfer y radd uchaf damcaniaethol o gydleoliad y dylai ein NGau allu ei chyflawni.

Ar gyfer dadansoddi cydleoliad, gan fod gan y celloedd forffolegau twf gwahanol iawn, mae'n anodd cymharu'r cydleoliad rhwng gwahanol linellau celloedd yn ddibynadwy. Fel y soniwyd, mae'r clystyrau trwchus y mae celloedd BT474 a Clone5 yn eu tyfu yn rhwystro mynediad NGau i'w canol, tra bod celloedd SKBR3 ac MCF7 yn haws eu cyrraedd. Yn yr un modd, gan fod y clystyrau hyn yn llawer talach, mae'n creu problem o ran sut allwn ni gymharu'n deg faint o gydleoliad dros y gwahanol linellau celloedd.

Mewn ymgais i fynd i'r afael â hyn, rydym wedi dewis canolbwyntio'r dadansoddiad o fewn 4µm gwaelod y celloedd, felly o ganlyniad ni fydd y gwerthoedd cyfernod a nodwyd o reidrwydd yr uchaf dros y pentwr cyfan.

Mae'n amlwg o edrych dros y cyfernodau cydleoleiddio bod amrywiad mawr yng ngraddfa'r cydleoleiddio a welir yn y llinellau celloedd HER2+. Dros y tri ohonynt maent i gyd yn cynnwys ardaloedd o gydleoleiddio cymedrol a hefyd ardaloedd lle nad oes dim. Er mewn arbrofion blaenorol gwelwyd y radd uchaf o gydleoleiddio yn y celloedd SKBR3, y tro hwn roedd gwerthoedd cydleoleiddio llawer llai. At ei gilydd, roedd gan y celloedd hyn ddau ranbarth yn dangos cydleoleiddio cymedrol ac un yn dangos ychydig iawn. Dangosodd y celloedd BT474 a'r celloedd Clone5 ranbarthau gyda gwerthoedd cydleoleiddio mwy wedi'u mesur, er bod y cyntaf yn dangos y cydleoleiddio cyffredinol mwyaf. Wrth ganolbwyntio ar y delweddau yn unig, mae rhanbarthau â chydleoleiddio cryf yn weladwy dros yr holl linellau celloedd HER2+. Mae'n bwysig nodi bod rhai o'r ffynonellau signal NGau fflwroleuol sy'n cydleoleiddio yn ymddangos yn llawer gwannach na'r rhai nad ydynt. Gallai hyn ddangos bod rhan o'r fflworoffor wedi diraddio cyn delweddu a byddai i ryw raddau'n egluro'r anghysondeb a welwyd rhwng cyfernodau Pearson a Manders a welwyd yn yr ardaloedd cyntaf ar gyfer celloedd BT474 a Clone5 (0.297 yn erbyn 0.413, a 0.309 yn erbyn 0.424 yn y drefn honno) (Tabl 4-4).

Yn ogystal, ar ôl myfyrio ar y dyluniad arbrofol blaenorol, roedd yn amlwg ei bod hi'n bosibl y byddai wedi chwyddo'r gwerthoedd cydleoliad yn artiffisial. Mae hyn oherwydd, er bod golchi cyn delweddu yn angenrheidiol er mwyn cael gwared ar y dextran488

rhydd ac i gynnal cysondeb yn y ffordd y cafodd y ddau grŵp triniaeth eu trin, gwnaed yr un peth i'r grŵp a gafodd driniaeth NGau. Fodd bynnag, byddai hyn wedi cael gwared ar gyfran sylweddol o NGau heb eu rhwymo neu wedi'u rhwymo ar wyneb y celloedd, a fyddai o ganlyniad wedi chwyddo'r gwerthoedd cydleoliad. Oherwydd hyn, gwnaed ymchwiliadau pellach yn archwilio'r cyfernodau cydleoliad, ond y tro hwn eithriwyd y fraich dextran, ac ni olchwyd y samplau cyn delweddu.

Wrth ddadansoddi'r cydleoliad rhwng y dextranau o wahanol liwiau, er bod rhai gwahaniaethau yn y dosbarthiad a welir rhwng y ddwy sianel, nid yw hyn o reidrwydd yn trosi'n staenio anwastad y lysosomau gan y gallai rhan o'r dextran⁴⁸⁸ fod wedi'i lleoleiddio i endosomau neu fesiglau eraill ar adeg y delweddu. Fodd bynnag, i'r rhan fwyaf, mae gwerthoedd Pearson a Manders a gofnodwyd rhwng y gwahanol ardaloedd delweddu yn debyg ar gyfer y ddwy linell gell gyda'r cyfernodau a gofnodwyd ymhell o fewn 0.1 i'w gilydd. Yr unig eithriadau i hyn yw gyda gwerthoedd Manders yn y celloedd MCF7 sy'n dangos 0.47 sylweddol rhwng rhanbarthau. Er gwaethaf hyn, fodd bynnag, mae gwerthoedd Pearson ar gyfer y ddau yn parhau'n gyson. Ar wahân i'r celloedd MCF7, o fewn y celloedd BT474 cynyddodd y gwahaniaeth rhwng rhanbarthau gyda'r ddau werth cydleoliad yn 0.17 ar wahân, er bod gwerthoedd Pearson a Manders yn debyg i'w gilydd o fewn yr un rhanbarth. Byddai wedi fod yn diddorol iawn i edrych ar cydleoliad ein NGau â'r dextran drwy defnyddio llif cytometreg. Er ni fydd o'n bosibl i weld os oedd y dextran a'r NGau yn yr un fesiglau fydd o'n diddorol i weld os oedd yna tuedd ar draws boblogaeth llawer uwch nag delwedddwyd. Er enghraifft fydd hi wedi fod yn diddorol i weld pa ganran o'r celloedd oedd wedi fewnoli'r NGau ac os oes yna berthynas rhwng lefelau dextran uwch ag mewnoliad o'r NGau.

Mae astudiaethau eraill sy'n ymchwilio i gydleoiliad gyda'u NGau yn defnyddio amodau arbrofol ac adrodd gwahanol i'n rhai ni. Dewisodd Tracey et al gynnal dadansoddiad cydleoliad endosomau hefo'r lysosomau mewn celloedd HeLa gan ddefnyddio gwrthgyrff gwrth-LAMP I a -EEA1 ar ôl 1 awr. (20). Yn ddiddorol, doedd dim tystiolaeth o gydleoiliad rhwng eu NGau PLGA a LAMP I, ond roedd cysylltiad cymedrol rhwng eu gronynnau ac EEA1. Gan fod eu NGau'n cynnwys His-Tag, roeddent yn gallu dangos bod mewnleoiliad eu gronynnau wedi digwydd o fewn 3 awr ac ar ôl 6 awr bod y gronynnau wedi dechrau diraddio fel y dangosir gan ostyngiad yn y His-Tag canfyddadwy.

Er i Wymant et al ddangos bod croesgysylltu HER2 yn strategaeth effeithiol ar gyfer ysgogi diraddio HER2, doedd dim tystiolaeth fod hynny'n digwydd gyda ein NGau. Ar gyfer eu hastudiaethau diraddio, defnyddwyd 50nM o Tz-biotin cyn croesgysylltu â streptavidin i groesglymu HER2 a'i fewnleoli via macropinosytosis (12). Fodd bynnag, ar gyfer ein PLGA-Tz mae llawer llai na 50nM o Tz dros eu harwyneb. Er y gallem gynyddu crynodiad y triniaethau i ddarparu ar gyfer hyn, gallai effaith cynyddu nifer y NGau cael effeithiau annisgwyl. Er enghraifft mae'n bosib os rydant yn cynyddu nifer o'r NGau i ormodedd mae'n posib efallai fysa HER2 yn cael ei fewnoli a'i ddiraddio yn annibynol o'r effaith groesgysylltu oherwydd y nifer uchel o NGau yn yr hydoddiant yn unig. Fel iddynt setlo ar ben y celloedd mae yna siawns fysa hyn yn achosi iddynt cael eu fewnoli a tynnu'r HER2 i'r lysosomau yn y broses. Wrth edrych yn ôl, er iddynt ymchwilio i'r effaith ar ôl 7 awr a ddilynwyd gennym, buasai'n ddiddorol ymestyn yr amser triniaeth yn enwedig yn dilyn y data dextran er ei bod yn hanfodol dewis pwynt amser nad yw'n caniatáu digon o amser i'r gell ymadfer. Hefyd er bod yna ddim newid mewn mynegint

HER2, fydd hi wedi fod yn diddorol iawn i ymchwilio i fewn effaith ein NGau ar dosbarthiad y HER2 drwy'r celloedd. Hefo'r dull a ddefnyddiwyd roedd hyn yn rhoi mesuriad o holl cynnwys HER2 yn y celloedd ond drwy gwneud dadansoddiad ar ffracsiynau is-gellog fydd o wedi efallai dangos symudiad o HER2 oddi ar wyneb y gell neu unrhyw newid arall mewn dosbarthiad y derbynnydd. Drwy paru hyn gydag cyfres amser fysa'i wedi bod yn posib i weld faint hir oedd unrhyw effaith yn cymeryd ag am faint oedd o'n parhau.

Ymchwiliodd Weisser et al hefyd i botensial croesgysylltu HER2 trwy wrthgorff deubaratopig zanidatamab, sy'n rhwymo i ddau Barth gwahanol o HER2 ar yr un pryd (21). Un o'r modelau celloedd o ddiddordeb yn eu hastudiaeth oedd ein model HER2+ SKBR3. Roedd croesgysylltu'r derbynnydd dros celloedd SKBR3 yn lleihau mynegiant HER2 dros wyneb y gell tua 40% a chyfanswm mynegiant HER2 dros 50% ar ôl 24 awr. Yn ogystal, roedd Tz yn achosi gostyngiad o tua 30% mewn HER2 dros wyneb y gell ond dim ond tua 20% ar gyfer cyfanswm mynegiant HER2. Mae hyn yn cyd-fynd i ryw raddau â'n canlyniadau o ran yr effaith a gafodd Tz ar fynegiant HER2 er y dylid nodi bod yr awduron wedi canfod bod difrifoldeb yr effaith hon yn benodol i linell gelloedd gyda'r model celloedd HER2+ arall o ddiddordeb (NCI-N87) yn cael ei effeithio i raddau llai. Hefyd, tra bod ni wedi ddefnyddio blottio Western i asesu'r effaith ar fynegiant protein, defnyddiodd yr astudiaeth hon cytometry llif.

Yma defnyddiwyd Tz i dargedu y NGau yn ddetholus i HER2 ac mae grwpiau eraill wedi defnyddio'r un strategaeth. Er enghraifft, yn ogystal ag addurno wyneb eu NGau PLGA gyda Tz, penderfynodd Vanni et al hefyd ei fewngapsiwleiddio i ganol y NGau a'i

cymharu â NGau-Tz gwag (22). Fodd bynnag, roedd y cyfnod astudio yn hir iawn (72 awr) , ac ar ôl hynny canfuwyd nad oedd 70% o gelloedd yn cael eu mesur fel rhai HER2+ mwyach. Ar ôl 4 diwrnod ychwanegol (wythnos o driniaeth), roedd poblogaeth y celloedd wedi adfer rhywfaint, gyda 30% bellach yn cael eu hystyried yn HER2 negatif. Yn ddiddorol, ar yr adegau hyn, roedd y NGau wedi perfformio'n well na'r Tz rhydd ar ôl 72 awr o 12%, ond erbyn y cyfnod 7 diwrnod cynhyrchodd y Tz rhydd ostyngiad a fesurwyd fel un a oedd 9% yn fwy. Efallai, o ystyried y data hwn, ein bod yn llawer rhy optimistaidd wrth ddisgwyl canfod newid mewn mynegiant ar ôl 7 awr, ac y gallai aros am gyfnod llawer hirach, lysis -celloedd wedi bod yn fwy addysgiadol ynghylch gwir botensial ein NGau i ddiraddio HER2. Fodd bynnag, mae'n werth nodi, yn ddigon rhyfedd, nad yw cael gostyngiad sylweddol ar HER2 ar y bilen blasma heb ei anafanteision. Gall hyn arwain at gynnydd mewn effeithiau y NGau-Tz oddi ar y targed gan ei fod yn y pen draw yn dileu eu targed ac yn agos y drws iddynt gael effeithiau eraill.

O ran NGau sydd wedi cael sy'n targedu HER2, defnyddir amrywiaeth o wahanol ddulliau i sicrhau dewisolïaeth. Er bod addurno â phrotein neu peptid targedu yn ddewis poblogaidd, mae opsiynau eraill wedi cael eu harchwilio (23–25). Defnyddiodd Komedchikova et al yr hyn a alwasant yn system thargedu 'dau gam' gyda NGau PLGA-Dox (26). Roedd hyn yn cynnwys trin celloedd â peptid targedu HER2 wedi'i gysylltu â'r protein barstar cyn triniaeth bellach â PLGA-barnase. Mae gan y proteinau barstar-barnase affinedd anhygoel o uchel i'w gilydd felly mae'r system hon wedi'i disgrifio fel glud moleciwlaidd (27). Yn ymarferol, mantais y system hon yw ei bod yn osgoi'r rhwysr stearig posibl a allai godi os yw'r gronynnau wedi'u dirlawn yn llwyr â peptidau targedu.

Gan ddefnyddio'r dull hwn, mae'r NGau'n glynu wrth y peptid targedu ar ôl iddo rwymo â'r derbynnydd gan osgoi'r broblem. Yn ddiddorol, canfu'r awduron fod y dull hwn yn fwy effeithiol nag os oedd y peptid targedu wedi'i addurno'n uniongyrchol i'r nanoronyn; yn ôl pob tebyg oherwydd gwell rhwymiad y nanoronyn i'r gell. Yn wir, mae hyn hefyd yn atal problem arall y gallai rhywun ei hwynebu os yw'r nanoronyn yn addurno'n uniongyrchol. Er y soniwyd y gallai rhwystr stearig fod yn gyfyngiad ar eu heffeithiolrwydd, nid ydym chwaith yn gwybod sut mae'r gwrthgyrff sydd wedi'u rhwymo wedi'u cyfeirio dros wyneb y gronyn. Gallai osgoi'r problemau hyn esbonio'r effeithiolrwydd gwell o'r dull dau gam mewn modelau llygoden (28).

Er gwaethaf y diffygion amlwg hyn mewn dyluniad a achosir gan addurno wyneb y NGau â peptidau, mae grwpiau eraill wedi dangos bod hyn yn parhau i fod yn ddull dibynnol ar gyfer targedu canserau HER2+ gan ddefnyddio amrywiaeth o wahanol fathau o NGau, yn cynnwys PLGA. (1,29,30). Yn wir, mae NGau sy'n defnyddio'r dull hwn hefyd wedi dangos gobaith mewn astudiaethau in vivo sy'n dangos ei fod yn dal i fod yn opsiwn ymarferol iawn ar gyfer rhoi targedu dethol i NGau (31,32). Er hyn dylid nodi bod y rhain yn ymddangos yn llai effeithlon na thargedu gan ddefnyddio moleciwlau llai (33).

Credai'r awduron mai'r rheswm am hyn oedd y materion a sonnir amdano uchod ynghylch cyfeiriadedd yr gwrthgorff llawn ar wyneb y NGau. Gan fod gan yr gwrthgorff llawn lawer mwy o grwpiau adweithiol rhydd o'i gymharu ag affigorff, er enghraifft, mae llai o reolaeth dros ble mae'r bond sy'n cysylltu'r gwrthgorff â'r gronyn yn ffurfio, sy'n arwain at gyfeiriadedd ar hap yr gwrthgyrff dros wyneb y gell. Fysai'n diddorol iawn i wneud cymhariaeth gyda ein NGau i weld os oes yna effaith ar eu rhwymo neu ar yr

cyfernodau cydleoli os oeddent wedi addurno gydag rhai o'r moleciwlau bychain yma.

Er enghraifft drwy datrys y problem o cyfeiriadaeth y gwrthgorff fydd o'n bosib fod hyn yn arwain tuag at fwy o groesgysylltu'n cael ei weld yn y celloedd HER2+ ac llai o rhwymo ansbesiffig yn y rhai isel am HER2. Gan fod affigorrffau a rhai moleciwlau targedu eraill, fel DARPinau, yn sylweddol lai, mae'n cyfyngu ar faint o gyfeiriadedd posibl, yn rhannol oherwydd bod ganddynt lawer llai o safleoedd adweithiol.

O'n llinellau celloedd roeddem yn rhagweld gweld mwy o fewnoliaeth y NGau-Tz yn y celloedd BT474 ac SKBR3. Roedd hyn yn gyd-fynd i ryw raddau â'n canlyniadau dextran. Er nad oedd hyn yn cyfieithu i ostyngiad yn mynegiant HER2 yn dilyn triniaeth yn y llinellau celloedd hyn. Ar ôl dangos gallu ein NGau-Tz i rwymo'n llwyddiannus i HER2 ac wedi hynny gael eu mewnoli gan y celloedd HER2+ yn unig, cam nesaf oedd ymchwilio i'r effaith bosibl yr oedd rhwystr stearig yn ei chael ar allu ein NGau-Tz i gadwyno â HER-2. I wneud hyn, newidwyd falens Tz ar y NGau ac ymchwilio i'r effaith ddilynol a gafodd hyn ar gyflenwi y cyffur dox. Yn ogystal, fe wnaethom hefyd archwilio'r effaith a gafodd rhwymo gronynnau ar bilen blasma y celloedd gan nodi for ein astudiaethau cynt wedi darganfod newid sylweddol yn ei strwythur (12).

4.12 Ffynhonellau

1. Domínguez-Ríos R, Sánchez-Ramírez DR, Ruiz-Saray K, Ocegüera-Basurto PE, Almada M, Juárez J, et al. Cisplatin-loaded PLGA nanoparticles for HER2 targeted ovarian cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019 June 1;178:199–207.
2. Shipunova VO, Sogomonyan AS, Zelepukin IV, Nikitin MP, Deyev SM. PLGA Nanoparticles Decorated with Anti-HER2 Affibody for Targeted Delivery and Photoinduced Cell Death. *Molecules*. 2021 June 28;26(13):3955.
3. Choi Y, Yoon HY, Kim J, Yang S, Lee J, Choi JW, et al. Doxorubicin-Loaded PLGA Nanoparticles for Cancer Therapy: Molecular Weight Effect of PLGA in Doxorubicin Release for Controlling Immunogenic Cell Death. *Pharmaceutics*. 2020 Nov 29;12(12):1165.
4. Botet R, Roger K. How do interactions control droplet size during nanoprecipitation? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2016 Apr 1;22:108–12.
5. Gimondi S, Ferreira H, Reis RL, Neves NM. Microfluidic Devices: A Tool for Nanoparticle Synthesis and Performance Evaluation. *ACS Nano*. 2023 July 27;17(15):14205–28.
6. Barral DC, Staiano L, Guimas Almeida C, Cutler DF, Eden ER, Futter CE, et al. Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function. *Traffic*. 2022 May;23(5):238–69.
7. Kameyama S, Horie M, Kikuchi T, Omura T, Tadokoro A, Takeuchi T, et al. Acid wash in determining cellular uptake of Fab/cell-permeating peptide conjugates. *Biopolymers*. 2007;88(2):98–107.
8. Gong S, Li Y, Su W, Ding Y, Lu J, Dong K, et al. Quantitative Algorithm-Based Paired Imaging Measurement for Antibody-Triggered Endocytosis in Cultured Cells. *SLAS Discovery*. 2018 Sept 1;23(8):832–41.
9. Illien F, Rodriguez N, Amoura M, Joliot A, Pallerla M, Cribier S, et al. Quantitative fluorescence spectroscopy and flow cytometry analyses of cell-penetrating peptides internalization pathways: optimization, pitfalls, comparison with mass spectrometry quantification. *Sci Rep*. 2016 Nov 14;6(1):36938.
10. Shilova ON, Shilov ES, Deyev SM. The effect of trypan blue treatment on autofluorescence of fixed cells. *Cytometry A*. 2017 Sept;91(9):917–25.
11. Moreno-Echeverri AM, Susnik E, Vanhecke D, Taladriz-Blanco P, Balog S, Petri-Fink A, et al. Pitfalls in methods to study colocalization of nanoparticles in mouse macrophage lysosomes. *J Nanobiotechnology*. 2022 Oct 29;20:464.
12. Wymant JM, Sayers EJ, Muir D, Jones AT. Strategic Trastuzumab Mediated Crosslinking Driving Concomitant HER2 and HER3 Endocytosis and Degradation in Breast Cancer. *J Cancer*. 2020 Mar 5;11(11):3288–302.
13. Chiesa E, Bellotti M, Caimi A, Conti B, Dorati R, Conti M, et al. Development and optimization of microfluidic assisted manufacturing process to produce PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022 Dec 15;629:122368.

14. Gimondi S, Ferreira H, Reis RL, Neves NM. Intracellular Trafficking of Size-Tuned Nanoparticles for Drug Delivery. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 25;25(1):312.
15. Liu Y, Craig DQM, Parhizkar M. Controlled release of doxorubicin from Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by coaxial electrospraying. *International Journal of Pharmaceutics.* 2024 Dec 5;666:124724.
16. Eivazi N, Rahmani R, Paknejad M. Specific cellular internalization and pH-responsive behavior of doxorubicin loaded PLGA-PEG nanoparticles targeted with anti EGFRvIII antibody. *Life Sciences.* 2020 Nov 15;261:118361.
17. Maksimenko O, Malinovskaya J, Shipulo E, Osipova N, Razzhivina V, Arantseva D, et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *International Journal of Pharmaceutics.* 2019 Dec;572:118733.
18. Narayanasamy KK, Price JC, Merkhani M, Elttayef A, Dobson J, Telling ND. Cytotoxic effect of PEI-coated magnetic nanoparticles on the regulation of cellular focal adhesions and actin stress fibres. *Materialia.* 2020 Sept 1;13:100848.
19. Manshian BB, Himmelreich U, Soenen SJ. Standard Cellular Testing Conditions Generate an Exaggerated Nanoparticle Cytotoxicity Profile. *Chem Res Toxicol.* 2017 Feb 20;30(2):595–603.
20. R. Tracey S, Smyth P, M. Herron U, F. Burrows J, J. Porter A, J. Barelle C, et al. Development of a cationic polyethyleneimine-poly(lactic- co -glycolic acid) nanoparticle system for enhanced intracellular delivery of biologics. *RSC Advances.* 2023;13(48):33721–35.
21. Weisser NE, Sanches M, Escobar-Cabrera E, O'Toole J, Whalen E, Chan PWY, et al. An anti-HER2 biparatopic antibody that induces unique HER2 clustering and complement-dependent cytotoxicity. *Nat Commun.* 2023 Mar 13;14(1):1394.
22. Vanni S, Mariastella Caputo T, Maria Cusano A, Vita AD, Cusano A, Cocchi C, et al. Engineered anti-HER2 drug delivery nanosystems for the treatment of breast cancer. *Nanoscale.* 2025;17(15):9436–57.
23. Radford DC, Yang J, Doan MC, Li L, Dixon AS, Owen SC, et al. Multivalent HER2-binding polymer conjugates facilitate rapid endocytosis and enhance intracellular drug delivery. *J Control Release.* 2020 Mar 10;319:285–99.
24. Kang X, Guo X, An W, Niu X, Li S, Liu Z, et al. Photothermal therapeutic application of gold nanorods-porphyrin-trastuzumab complexes in HER2-positive breast cancer. *Sci Rep.* 2017 Feb 3;7:42069.
25. Zhang X, Liu J, Li X, Li F, Lee RJ, Sun F, et al. Trastuzumab-Coated Nanoparticles Loaded With Docetaxel for Breast Cancer Therapy. *Dose Response.* 2019 Sept 4;17(3):1559325819872583.
26. Komedchikova EN, Kolesnikova OA, Tereshina ED, Kotelnikova PA, Sogomonyan AS, Stepanov AV, et al. Two-Step Targeted Drug Delivery via Proteinaceous Barnase-Barstar Interface and Doxorubicin-Loaded Nano-PLGA Outperforms One-Step Strategy for Targeted Delivery to HER2-Overexpressing Cells. *Pharmaceutics.* 2022 Dec 24;15(1):52.

27. Shramova EI, Shilova MV, Ryabova AV, Dzhalilova DS, Zolotova NA, Telegin GB, et al. Barnase*Barstar-guided two-step targeting approach for drug delivery to tumor cells *in vivo*. *Journal of Controlled Release*. 2021 Dec 10;340:200–8.
28. Shipunova VO, Komedchikova EN, Kotelnikova PA, Nikitin MP, Deyev SM. Targeted Two-Step Delivery of Oncotheranostic Nano-PLGA for HER2-Positive Tumor Imaging and Therapy In Vivo: Improved Effectiveness Compared to One-Step Strategy. *Pharmaceutics*. 2023 Mar 3;15(3):833.
29. Yu K, Zhao J, Zhang Z, Gao Y, Zhou Y, Teng L, et al. Enhanced delivery of Paclitaxel using electrostatically-conjugated Herceptin-bearing PEI/PLGA nanoparticles against HER-positive breast cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016 Jan;497(1–2):78–87.
30. Naruphontjirakul P, Viravaidya-Pasuwat K. Development of anti-HER2-targeted doxorubicin–core-shell chitosan nanoparticles for the treatment of human breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2019 June 4;14:4105–21.
31. Zhang H, Cui B, Wang L, Wu H, Zhang T, Feng X, et al. Licochalcone A in Folic Acid-targeted Nanoparticles for Precise Anticancer Effects in Breast Cancer. *Chem Biodivers*. 2025 Aug 11;e03342.
32. Ngamcherdtrakul W, Bejan DS, Cruz-Muñoz W, Reda M, Zaidan HY, Siriwon N, et al. Targeted Nanoparticle for Co-delivery of HER2 siRNA and a Taxane to Mirror the Standard Treatment of HER2+ Breast Cancer: Efficacy in Breast Tumor and Brain Metastasis. *Small*. 2022 Mar;18(11):e2107550.
33. Lee NK, Wang CPJ, Lim J, Park W, Kwon HK, Kim SN, et al. Impact of the conjugation of antibodies to the surfaces of polymer nanoparticles on the immune cell targeting abilities. *Nano Convergence*. 2021 Aug 16;8(1):24.

5 Dadansoddi Effaith Valens Nanoronynnau ar Bilen

Blasma

5.1 Addasu falens Tz ar y NGau

Ar ôl archwilio effeithiau NGau a oedd wedi'u dirlawn yn llwyr â Tz, y cam nesaf oedd ymchwilio i sut y gallai newid y falens effeithio ar eu mewnlifiad i'r gell ar ddamcaniaeth eu bod yn cael effeithiau ar u bilen blasma. O hyd, gwelir fformwleiddiadau NGau yn ymgorffori ligandau ar draws eu arwyneb ond yn anaml iawn mae raddfa hwn yn gael ei reoli - gan arwain at lunio NGau sydd â'u harwyneb wedi'i ddirlawn â'r ligand o ddewis. Gallai hyn greu rhwystr steorig sy'n lleihau eu gallu i glymu i'r targed a lleihau ei effeithiolrwydd i groesgysylltu'r derbynnydd, a chael mynediad i'r gell.

O fewn y llenyddiaeth mae rhai wedi ceisio i rheoli'r falens o ligand targedu ar draws NGau (1,2). Mi wnaeth y ddau papur yma edrych ar addurno NGau gyda 1-10 o ligandau targedu er dylid nodi fod eu NGau yn is o lawer i gymharu a rhai PLGA-Tz gyda'u NGau nhw'n cael ei fesur i fod yn 6-30nm. Mae'r ddau astudiaeth hefyd yn gweld wahanïaeth arwyddocaol mewn pa mor effeithiol yw'r NGau wrth gymharu'r falensau wahanol. Mae hyn yn gofyn y cwestiwn o pa fath o effaith fasa addasu'r falens yn cael ar ein NGau PLGA-Tz ag os ydi'r effaith yma yn gallu arwain tuag at galluedd well i ddanfôn cyffuriau mewn i celloedd.

Felly I ymchwilio'r effaith hon, rydym wedi cynhyrchu NGau PLGA wedi'u haddurno â wahanol falensau o Tz ond fel sonnir uchod, gan fod ein NGau o maint uwch wnaethom benderfynu i hefyd targedu datblygu NGau gyda falensau uwch a cynhyrchu rhai sydd

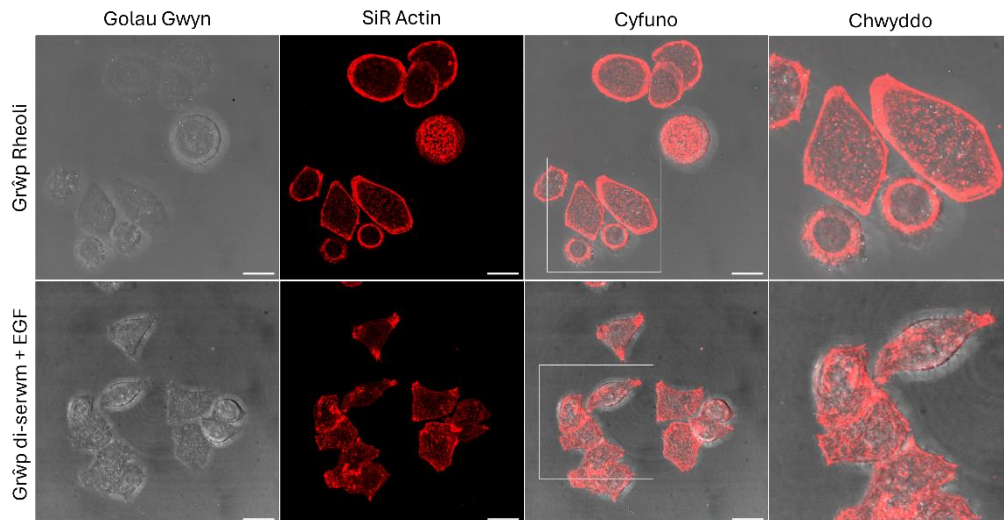
wedi addurno gyda naill ai 10, 30 neu 50 copi o Tz. Cyflawnwyd hyn trwy newid nifer y moleciwlau o Tz o'i gymharu â nifer y gronynnau mewn toddiant ac yn gyffredinol mae'n amcangyfrif gan na ellid mesur effeithlonrwydd rhwymo Tz. Er mwyn cynnal cysondeb a sicrhau mai'r unig wahaniaeth rhwng y grwpiau NP oedd y falens, cynhyrchwyd y NGau addurnedig i gyd o'r un swp o NGau.

Amcanion y bennod hon oedd:

- I ddatblygu NGau gyda wahanol falensau o Tz
- Mesur effaith y NGau hyn ar y gell bilen
- Edrych sut oedd newid falens ein NGau yn effeithio effeithiolrwydd y celloedd i ddanfod doxorubicin

5.2 Arbrofion gyda'r staen actin byw SiR-Actin i ceisio mesur effaith ein NGau ar y bilen blasma

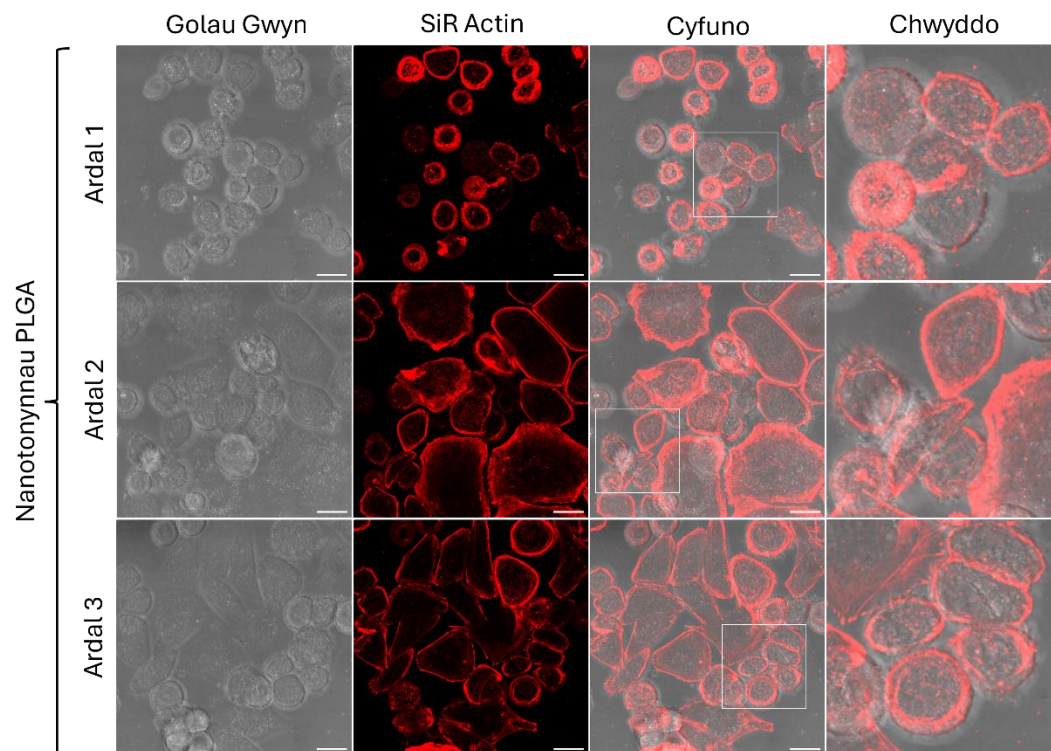
Yn dilyn astudiaethau ein grŵp ar y gallu o Tz-biotin a streptavidin i groesglymu HER2 a'i wthio i'r gell drwy amharu ar y bilen blasma (3,4), roedd diddordeb mewn defnyddio llifyn a fyddai'n caniatáu monitro'r bilen neu'r cytosgerbwd yn ystod delweddu celloedd - byw. Y llifyn cyntaf a ddefnyddiwyd oedd SiR-Actin, staen actin celloedd - byw yn seiliedig ar jasplakinolid (5). Gan fod y staen yma wedi nodi am sefydlogi f-actin, roedd y potensial y gallai guddio unrhyw ymatebion cyflym a fyddai'n digwydd yn dilyn y cam lliwio. Er mwyn cadarnhau hyn roedd angen delweddu dau ffenoteip o gell, un arferol ac un gyda lefel o weithgaredd uchel ar draws y bilen blasma. Ar gyfer y staenio cychwynnol, wnaethom benderfynu gwneud hyn drwy defnyddio celloedd SKBR3 heb eu trin a rhai wedi'u llwgu cyn cael eu hysgogi gan EGF, yn addawol gyda'r staen yn dangos fflwroleuedd clir cryf a oedd yn cyd-fynd â'r hyn a welwyd yn y delweddau maes llachar. Yn ogystal, roedd yn ymddangos fel pe bai'r SiR actin yn caniatáu ddelweddu'r allwthiadau a achosir gan ysgogiad EGF mewn celloedd sydd wedi'u newynu gan serwm (Ffigur 5-1). Yn seiliedig ar yr arsylwadau hyn, penderfynom fod perfformiad y staen yn ddigonol i symud ymlaen i ymchwiliadau i'r NGau.



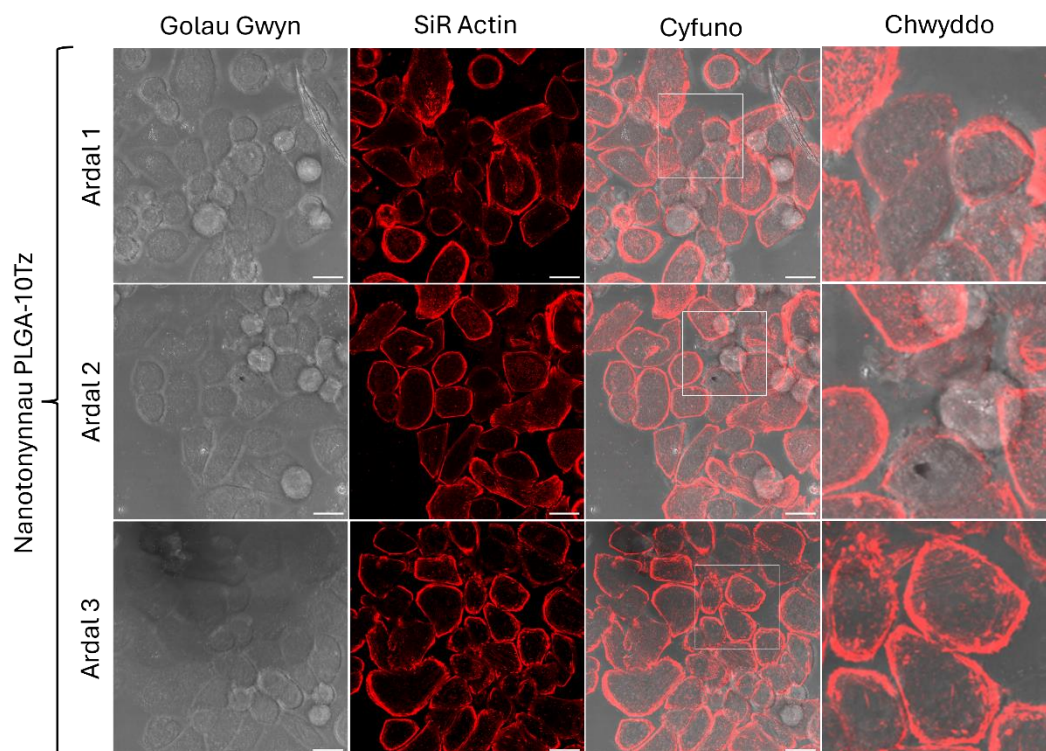
Ffigur 5-1: Celloedd SKBR3 di-serwm wedi cael eu staenio gyda 250 μ M SiR Actin ac wedyn ysgogi gyda 50nM EGF wrth ochr celloedd o grŵp rheolydd. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20 μ m

Wedi gwneud y delweddu rhagarweiniol penderfynwyd i symud ymlaen i edrych ar yr effaith fysa ein NGau yn cael ar y bilen blasma. Cynhaliwyd yr arbrofion cyntaf yn astudio effeithiau'r NGau ar ddeinameg pilen plasma ar ôl 24 awr o driniaeth. Ar y cyfan, dros y NGau heb eu haddurno, nid oedd unrhyw effeithiau gweladwy dros pob un o'r meysydd golygfa ar ôl y driniaeth (Ffigur 5-2). Gwelwyd tuedd debyg dros y PLGA-10Tz (Ffigur 5-3), fodd bynnag, dros y PLGA-30Tz roedd arwyddion o fewn y maes weladwy cyntaf bod gweithgaredd pilen a oedd yn cael ei ddal gan y sianel golau gwyn ond nid yr un SiR-Actin, yn ogystal, gwelwyd nad oedd yr holl gelloedd wedi'u staenio'n gyfartal ac i rai roedd y staen yn llawer gwannach nag mewn eraill (Ffigur 5-4). Dros y PLGA-50Tz, fodd bynnag, ychydig iawn oedd i'w weld eto yn digwydd dros y celloedd (Ffigur 5-5). Yn seiliedig ar yr arbrofion hyn, cododd y ddamcaniaeth: yn hytrach nag ymchwilio i bwynt amser hirdymor o 24 awr, fod digwyddiadau ar y bilen blasma yn ddigwydd, fel yn achos EGF, yn y tymor byr. Arweiniodd hyn at wneud arbrofion ymchwilio i'r effeithiau ar y bilen plasma 10 munud ar ôl triniaeth NGau. Gyda'r grŵp hyn o arbrofion, cynhwyswyd

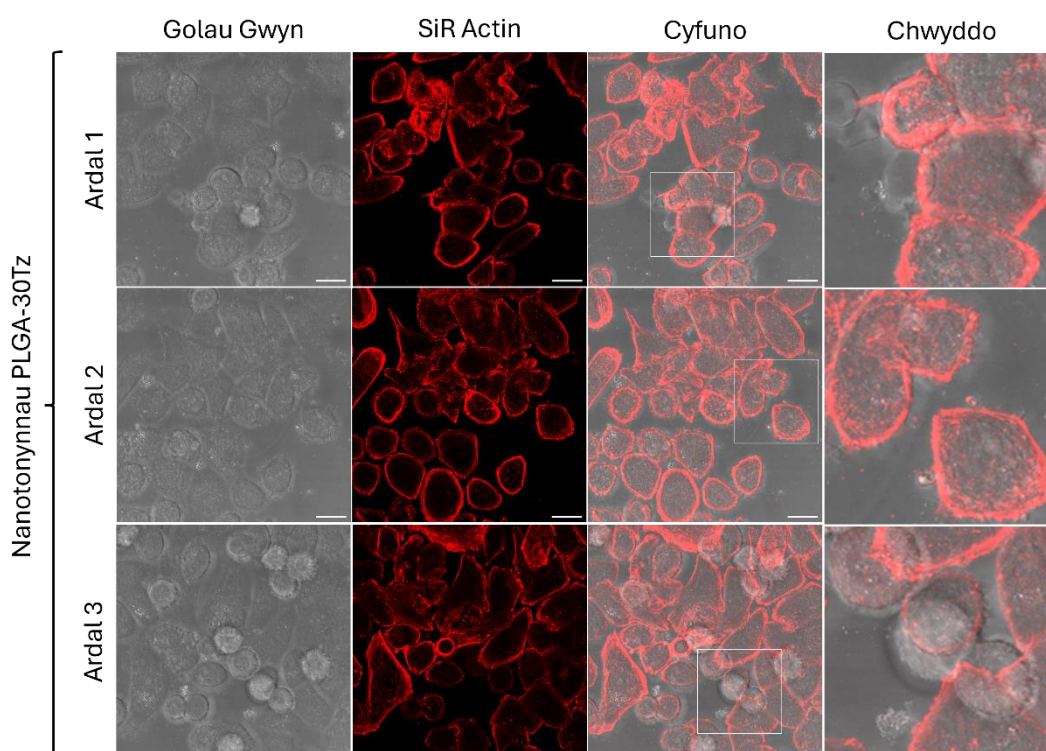
celloedd BT474 hefyd, fodd bynnag, oherwydd cyfyngiadau technegol o ran cyflymder delweddu, dim ond mewn dau ranbarth gwahanol y gallem eu gipio gan y microsgop.



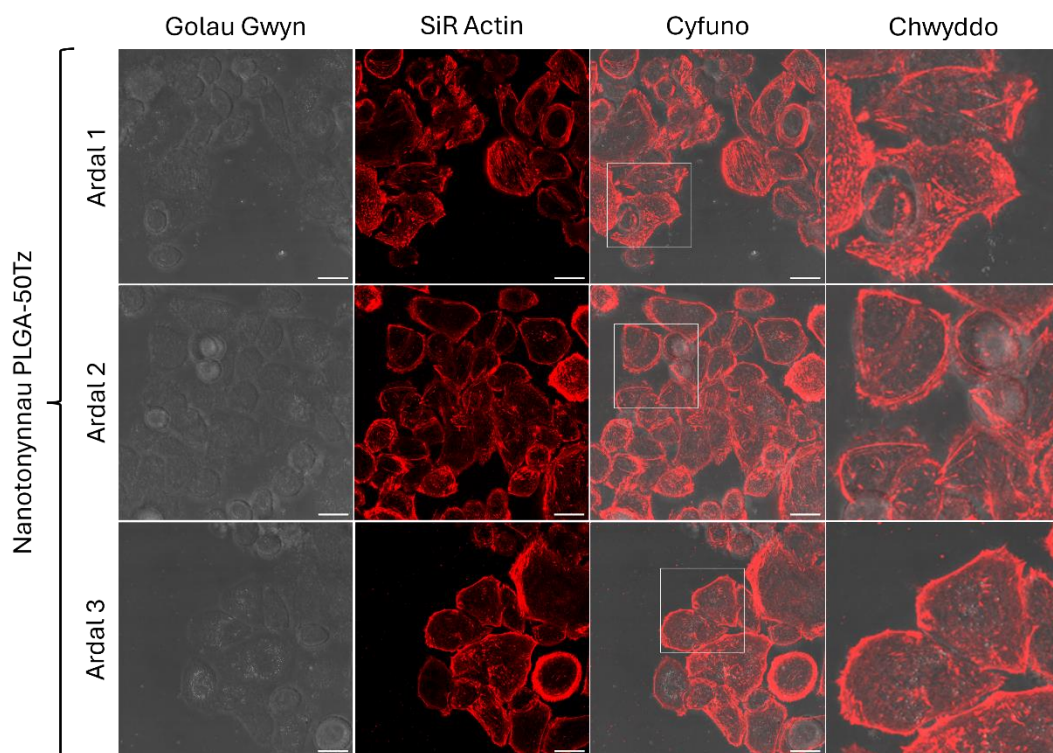
Ffigur 5-2: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NGau PLGA am 24 awr cyn staenio gyda 250 μM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20 μm



Ffigur 5-3: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500 µg/ml NGau PLGA-10Tz am 24 awr cyn staenio gyda 250µM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm

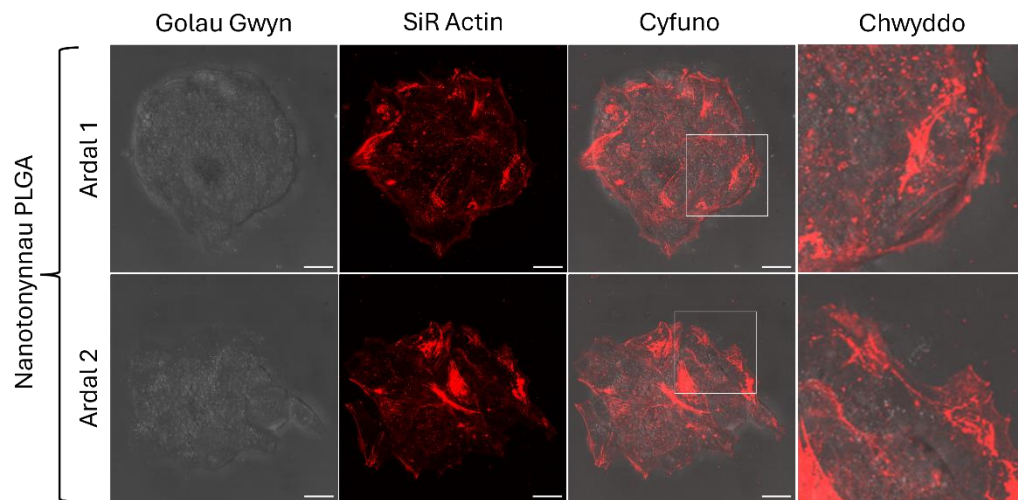


Ffigur 5-4: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500 µg/ml NGau PLGA-30Tz am 24 awr cyn staenio gyda 250µM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm

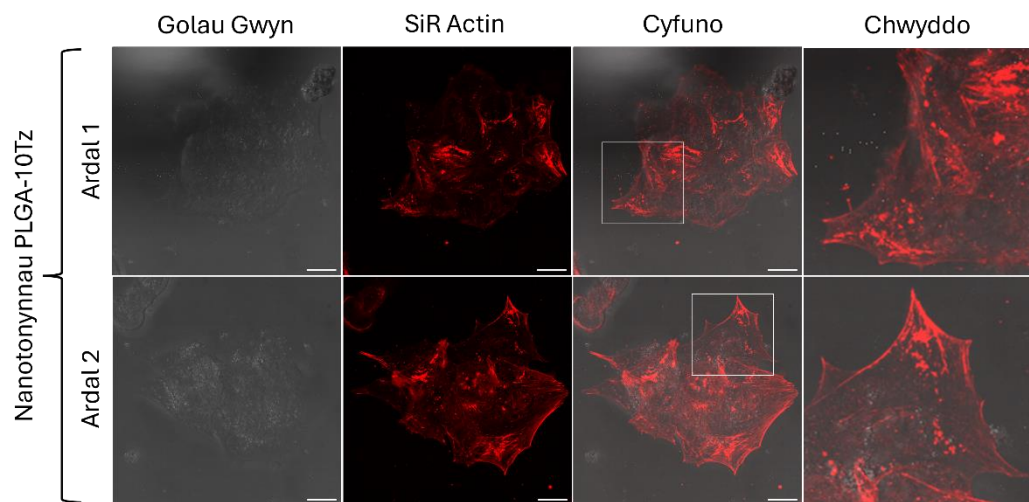


Ffigur 5-3: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-50Tz am 24 awr cyn staenio gyda 250µM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm

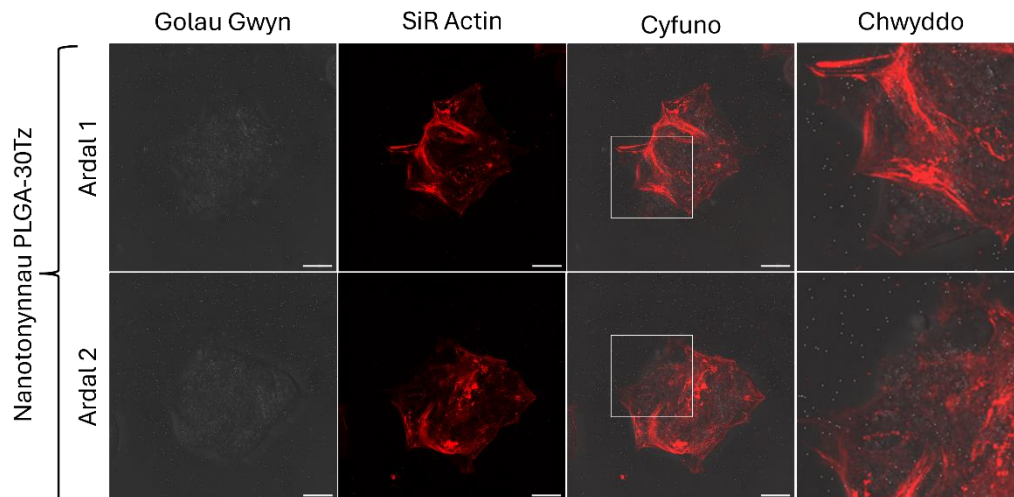
Ar ôl delweddu'r celloedd SKBR3 wnaethom symud ymlaen i wneud yr un arbrawf ar draws y celloedd ond ar ôl 10 munud yn hytrach nag 24 awr i weld os oedd yr rhyngweithiad cychwynnol rhwng y NGau a'r cell yn cael effaith. O fewn celloedd BT474 nid oedd unrhyw arwyddion o unrhyw crychio o ganlyniad i 10 munud o driniaeth PLGA yn unig (Ffigur 5-6). Gwelwyd yr un duedd hefyd dros y PLGA-10Tz (Ffigur 5-7) fodd bynnag unwaith eto gyda'r PLGA-30Tz (Ffigur 5-8) a'r tro hwn, gyda'r PLGA-50Tz hefyd (Ffigur 5-9), roedd arwyddion bod gweithgaredd yn digwydd ar y bilen nad oedd wedi'i amlygu gan y staen.



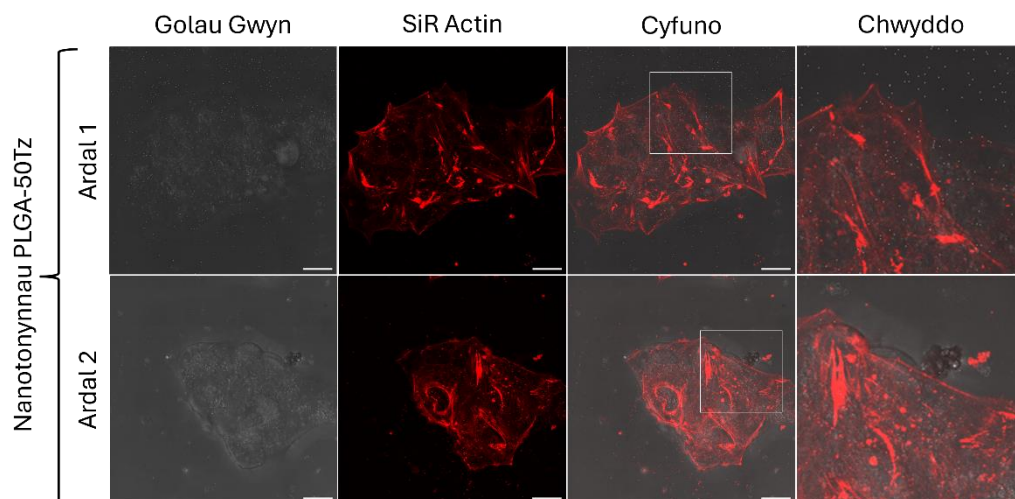
Ffigur 5-4: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500 μ g/ml NGau PLGA am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20 μ m



Ffigur 5-5: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500 μ g/ml NGau PLGA-10Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20 μ m



Ffigur 5-8: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-30Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm

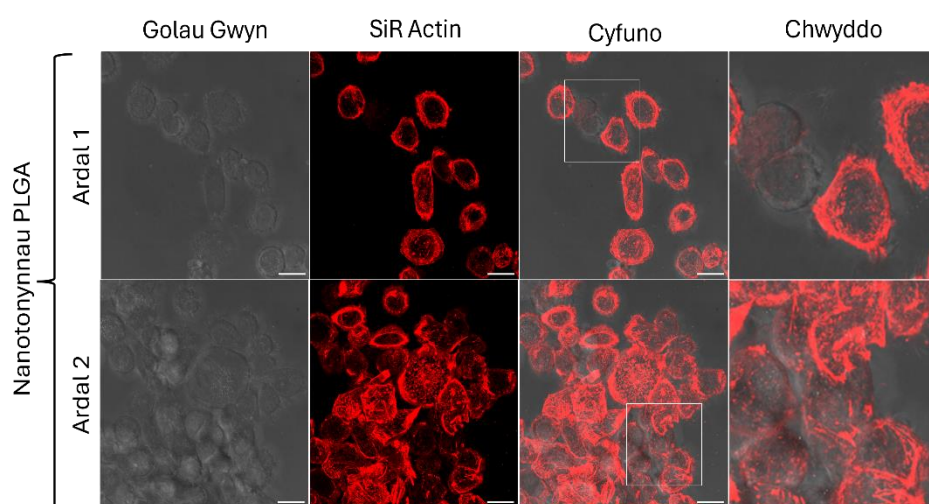


Ffigur 5-9: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-50Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm

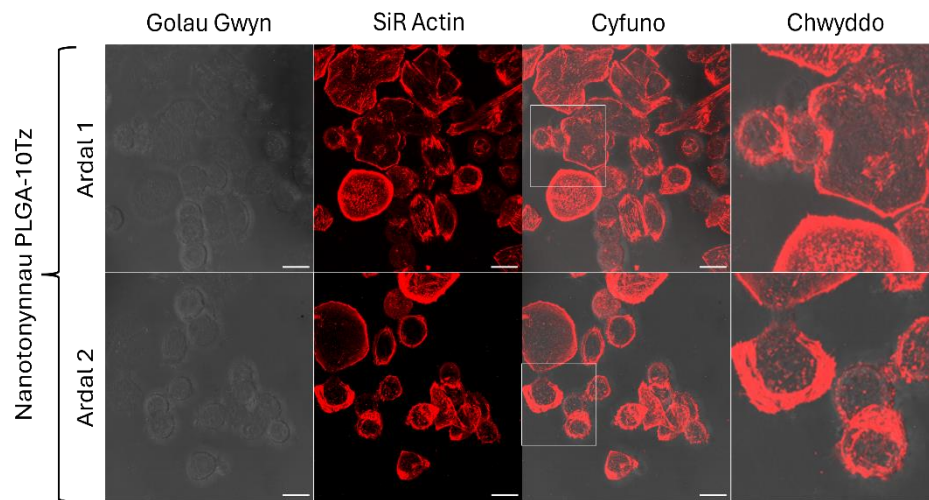
Gan fod y morffoleg mor wahanol rhwng ein modelau cell wnaethom ail-adrodd yr arbrawf mewn y celloedd SKBR3. Wrth archwilio'r canlyniadau o gelloedd SKBR3 daeth hyn yn fwy amlwg gydag ardaloedd o weithgaredd pilen yn cael eu gweld yn y sianel golau gwyn yn unig gyda'r y NGau PLGA heb eu haddurno (Ffigur 5-10). Gyda'r y PLGA-10Tz roedd y staenio eto'n eithaf anwastad ond roedd ardaloedd o rai celloedd gyda

signal actin mwy ffocysedig a lleol yn awgrymu bod rhywfaint o ailfodelu yn digwydd.

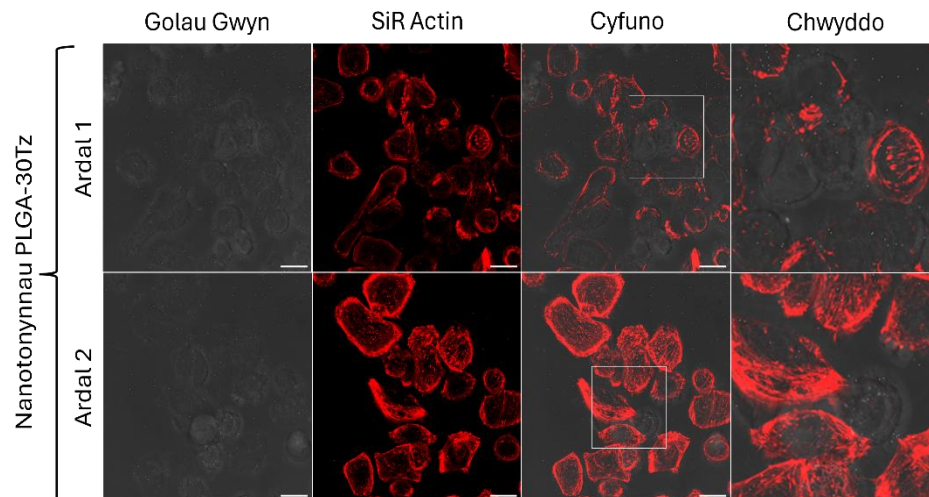
Fodd bynnag oherwydd y broses staenio hir nid yw'n glir a yw hyn, o reidrwydd, yn ymateb i'r NGau (Ffigur 5-11). Unwaith eto gyda PLGA-30Tz, mewn rhai celloedd mae'r signal actin wedi'i gyfoethogi'n fawr mewn mannau penodol, ; unwaith eto roedd arwyddion o chwyddo neu crychu a oedd yn digwydd yn y sianel maes llachar yn unig (Ffigur 5-12). Dros y PLGA-50Tz mae mannau gyfoethog actin a allai fod yn ymwthiadau, ond roedd yn amlwg bod rhai celloedd wedi'u staenio'n wan (Ffigur 5-13). Nid oeddem yn siŵr a oedd y gweithgaredd pilen heb ei staenio oherwydd natur y staen, hynny yw ei fecanwaith sy'n sefydlogi actin, neu a oedd oherwydd bod y gweithgaredd a welwyd yn annibynnol ohono. Beth bynnag roedd yn amlwg bod angen newid yn y dull i ddelweddu'r gweithgaredd hwn yn gywir. Yn dilyn hyn penderfynwyd anweithredu'r celloedd gyda PFA ar ôl 10 munud o driniaeth a defnyddio'r Tz488 fel staen pilen blasma i olrhain unrhyw weithgaredd.



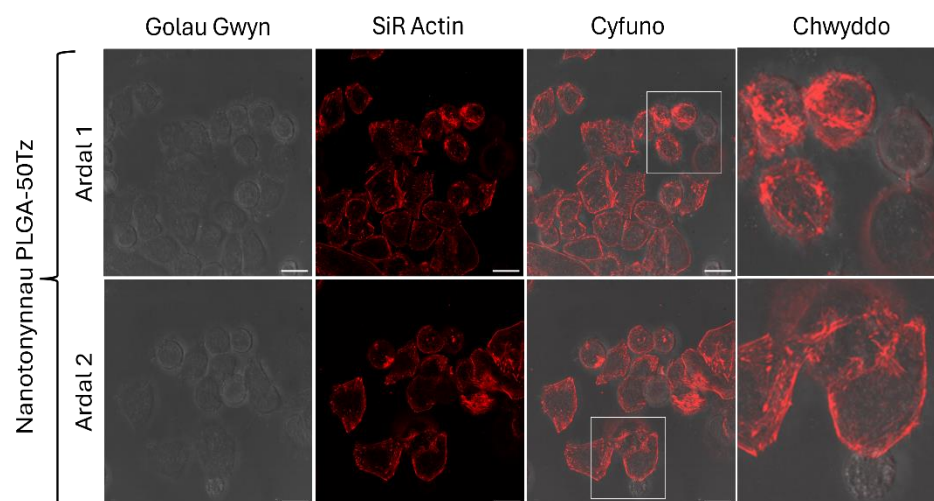
Ffigur 5-6: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm



Ffigur 5-81: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500 μ g/ml NGau PLGA-10Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20 μ m



Ffigur 5-72: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500 μ g/ml NGau PLGA-30Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20 μ m

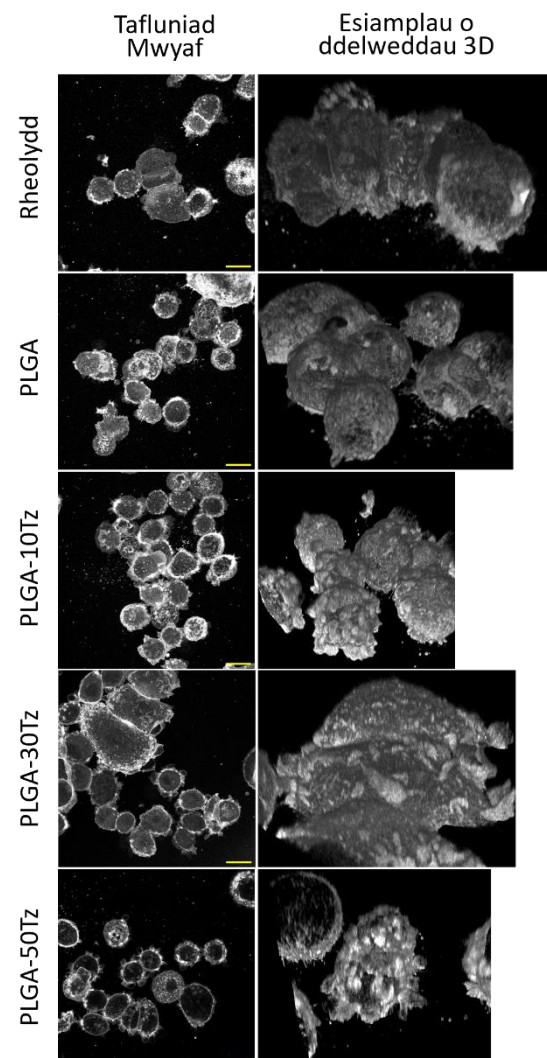


Ffigur 5-9: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-50Tz am 10 munud ar ôl staenio gyda 100nM SiR Actin. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 20µm

5.3 Delweddu'r bilen blasma gyda Tz488

Gan fod yr arbrofion gyda SiR-Actin heb wedi canfod unrhyw effaith pendant roedd yna arwyddion yn y sianel golau gwyn fod yna weithgaredd ar draws y bilen blasma oedd ddim yn cael ei ddal gan yr staen. Er mwyn recordio'r gweithgaredd yma roedd rhaid datblygu dull newydd a fysa'n caniatáu i ni dal yr weithgaredd yma. Oherwydd eu bod yn syml i'w ddelweddu a hefyd yn gyfoethog yn HER2 wnaethom dewis i anweithredu celloedd SKBR3 ar ôl 10 munud o driniaeth gyda NGau a wedyn trin y celloedd eto gyda Tz488. Y syniad oedd i ddefnyddio'r Tz488 i amlygu'r gell bilen ac yn wir, dros yr holl samplau roedd digwyddiadau ar y bilen blasma yn llawer mwy amlwg. Heb unrhyw driniaeth gellid gweld rhywfaint o chwyddiadau neu crychio lefel isel a oedd i ddisgwyl mewn celloedd. Gyda'r NGau heb eu haddurno, gwelwyd lefel ychydig yn uwch o weithgaredd dros y celloedd (Ffigur 5-14). Roedd graddfa'r ymateb yn uwch dros y grŵp PLGA-10Tz gyda crychio amlwg yn digwydd dros wyneb rhai celloedd. Roedd hyn eto'n eithaf amlwg gyda'r celloedd a gafodd eu trin â PLGA-30Tz, lle'r oedd strwythurau tebyg i crychio trwm dros wyneb y celloedd, gyda siapiau tebyg i betalau (Ffigur 5-14). Ar ôl brosesu'r data PLGA-50Tz ar imageJ, drwy gymharu'r lluniau yma i'r rhai o'r rheolydd daeth yn amlwg bod yr holl driniaethau NGau-Tz yn gallu ysgogi ymateb cyflym dros y bilen plasma hynny yw a oedd yn weladwy o fewn 10 munud i'r driniaeth. Fodd bynnag, er bod y dechneg hon yn ddefnyddiol i gadarnhau'r digwyddiadau cynnar a manwl mewn celloedd oedd wedi anweithredu, yn anffodus byddai'n gwbl anaddas i'r pwrpas yma mewn celloedd byw. Gan fod celloedd MCF7 a mynegiant HER2 sylweddol is na'r gweddill, amcangyfrifir na fyddem, yn y linell hon, yn gallu defnyddio'r HER2 sy'n targedu Tz488 i labelu'r bilen plasma i gael signal oedd modd ei ddehongli. Er gwaethaf

hyn, fodd bynnag, y brif broblem, ymhob llinell gell oedd y byddai'r Tz488 yn dirlawn y celloedd gan atal y NGau rhag rhwymo.



Figur 5-10 Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500 μ g/ml NGau am 10 munud cyn gosodi â PFA ag eu trin gyda 50nM Tz488 cyn delweddu. Bar Raddfa 20 μ m

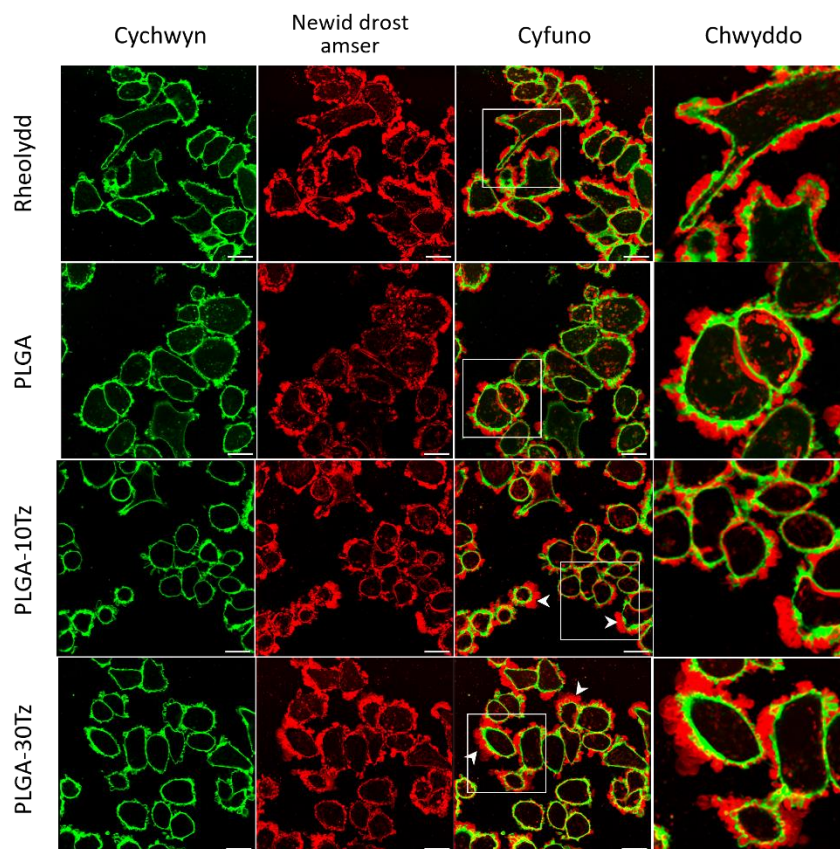
5.4 Delweddu cydffocal o effaith y NGau ar y Bilen Blasma

I ymateb i'r broblem fase'n debyg o godi wth ddefnyddio Tz-488 fel staen pilen plasma , ddefnyddiwyd llifyn pilen plasma CellMask i amlygu'r bilen er mwyn olrhain y crychio ac ymatebion eraill a all ddigwydd o ganlyniad i driniaethau â NGau. Mae'r llifyn yma'n cynnwys moleciwl amffiffilig gyda wefr negyddol sydd yn rhyngosodi gyda'r bilen plasma ac yn aml cael ei ddefnyddio i'w fonitro am newidiadau (6,7). Fel llifyn celloedd - byw, mae CellMask yn caniatáu cofnodi'r bilen plasma o'r cyfnod cyntaf ar ôl y driniaeth, ac yn caniatáu mesur y cyfnod crychio ac am ba mor hir yr oeddant yn weladwy.

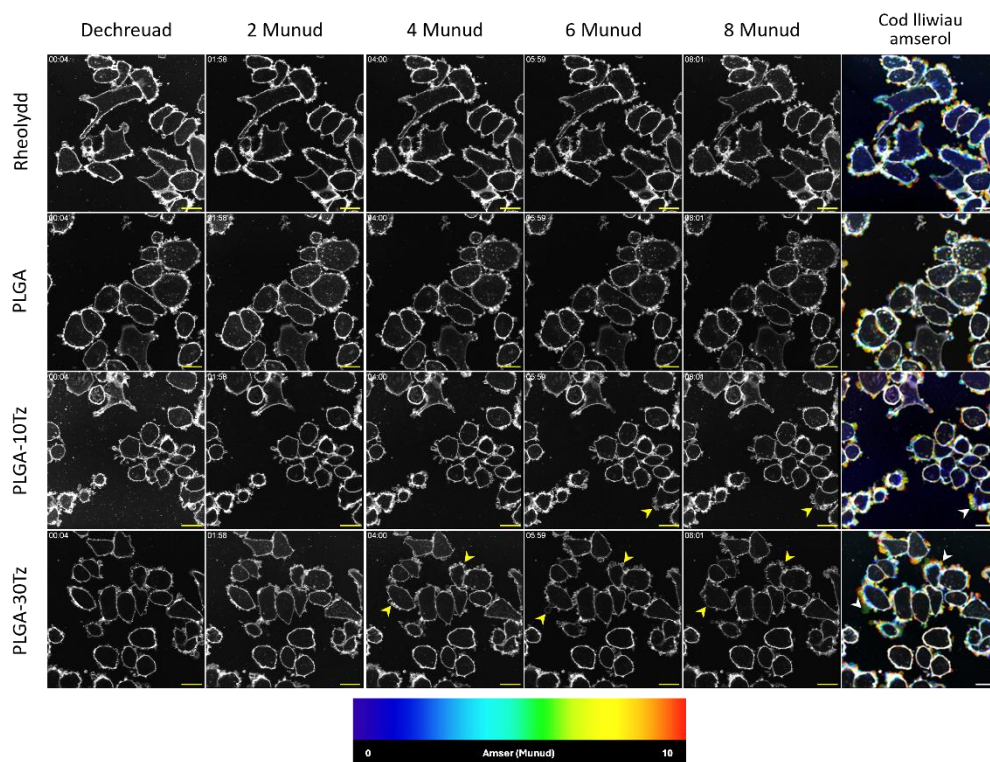
Dewiswyd cofnodi'r effeithiau hyn dros un sleisen yn unig er mwyn cynnal delweddu cyflym fel y byddai hyd yn oed unrhyw crychau bach byrhoedlog yn cael ei ddelweddu. Mewn ymgais i ddal maint y crychu dros y cyfnod delweddu cafodd y data ei brosesu fel a ganlyn: cynhyrchwyd tafluniad mwyaf dros y cyfnod amser yn dangos maint llawn symudiad y bilen - o hyn tynnwyd y ffrâm gychwynnol. Yna ail-unwyd y ffrâm gychwynnol i hyn o dan liw gwahanol i amlygu'n llawn y newid yng ngweithgaredd y bilen o'i gymharu a'r safle gwreiddiol mewn gwyrdd a'r holl symudiad wedyn wedi'i amlygu mewn coch. Yr amod sy'n gysylltiedig â'r dull hwn yw, er ei fod yn tynnu sylw at yr holl crychau a chwyddiadau yn y bilen, felly bydd yr un chwyddiad neu crychiad yn ymddangos yn fwy o ganlyniad i symudiad ochrol.

I mesur y effaith dros ein celloedd i gyd cafodd nhw eu trin gyda NGau am 10 munud gyda'r recordiad yn digwydd yn syth ar ôl cychwyn triniaeth. Fel rheolydd defnyddir celloedd heb eu trin er mwyn dal beth yw'r waelodlin o weithgaredd ar draws y gell bilen. Mae'n amlwg ar y celloedd HER2+ SKBR3 sydd heb eu trin, yn ystod y cyfnod

cynnar yma bod crychio yn amlwg ar draws y boblogaeth gyfan o gelloedd. (Ffigur 5-15). Gyda triniaeth NGau PLGA, mae'n olygfa debyg gyda crychau lefel isel i'w weld dros rhai celloedd nad yw'n annhebyg i'r rheolydd. Yn y grŵp PLGA-10Tz, fodd bynnag, mae rhai rhanbarthau o'r celloedd lle mae'r crychio hwn yn ymddangos yn fwy dwys. Mae hyn yn fwy amlwg yn y grŵp PLGA-30Tz lle mae rhanbarthau o weithgarwch dwys iawn i'w gweld gyda crychau a chwyddiadau ar raddfa fawr yn digwydd sy'n ymestyn allan yn llawer pellach nag a welwyd cynt. Mae'r rhanbarthau hyn o weithgarwch uwch wedi'u lleoli i rai celloedd gyda'r chwyddo bywiog iawn yn amlygu ar ôl 5 munud (Ffigur 5-16). Yn anffodus, gan fod y celloedd yn dod yn rhydd or wyneb yn ystod delweddu ni chynhyrchwyd unrhyw ddata o'r grŵp PLGA-50Tz. Mae hyn yn awgrymu nad oeddent yn iach, ac ni fyddai'r data a gynhyrchwyd o ganlyniad yn ddibynadwy.



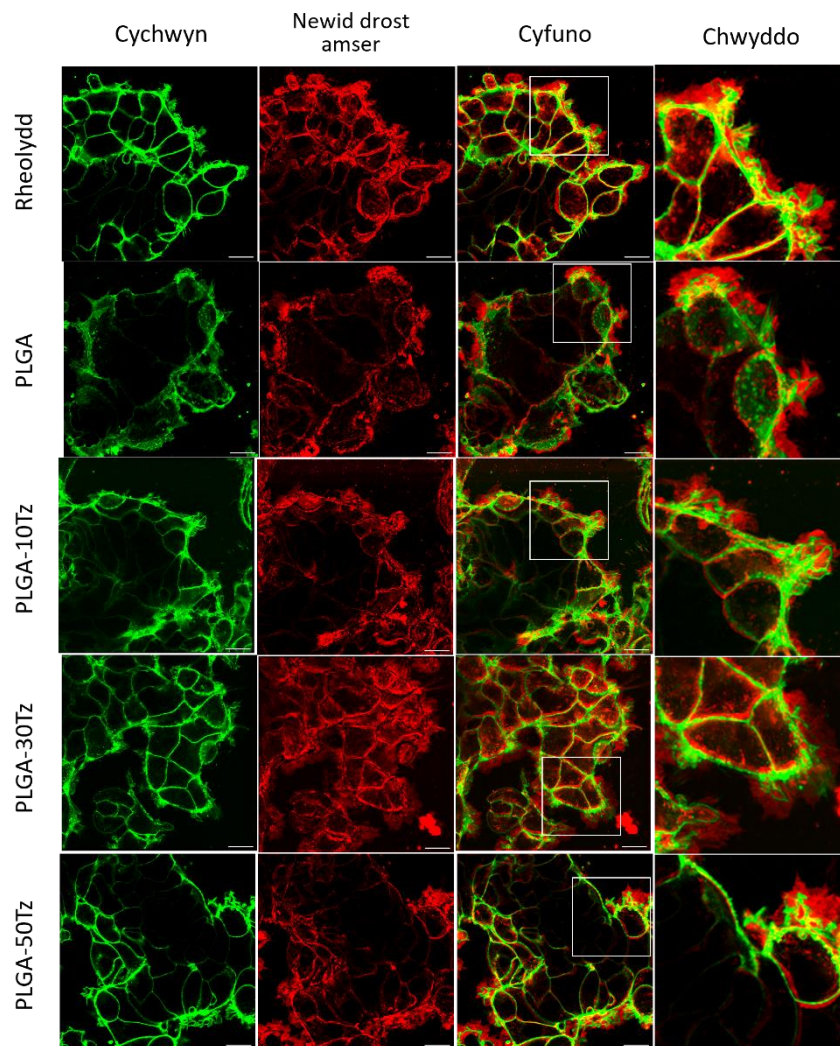
Ffigur 5-11: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros y 10 munud. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo yn gwyn, saethau yn dynodi crychau. Bar Raddfa 20µm



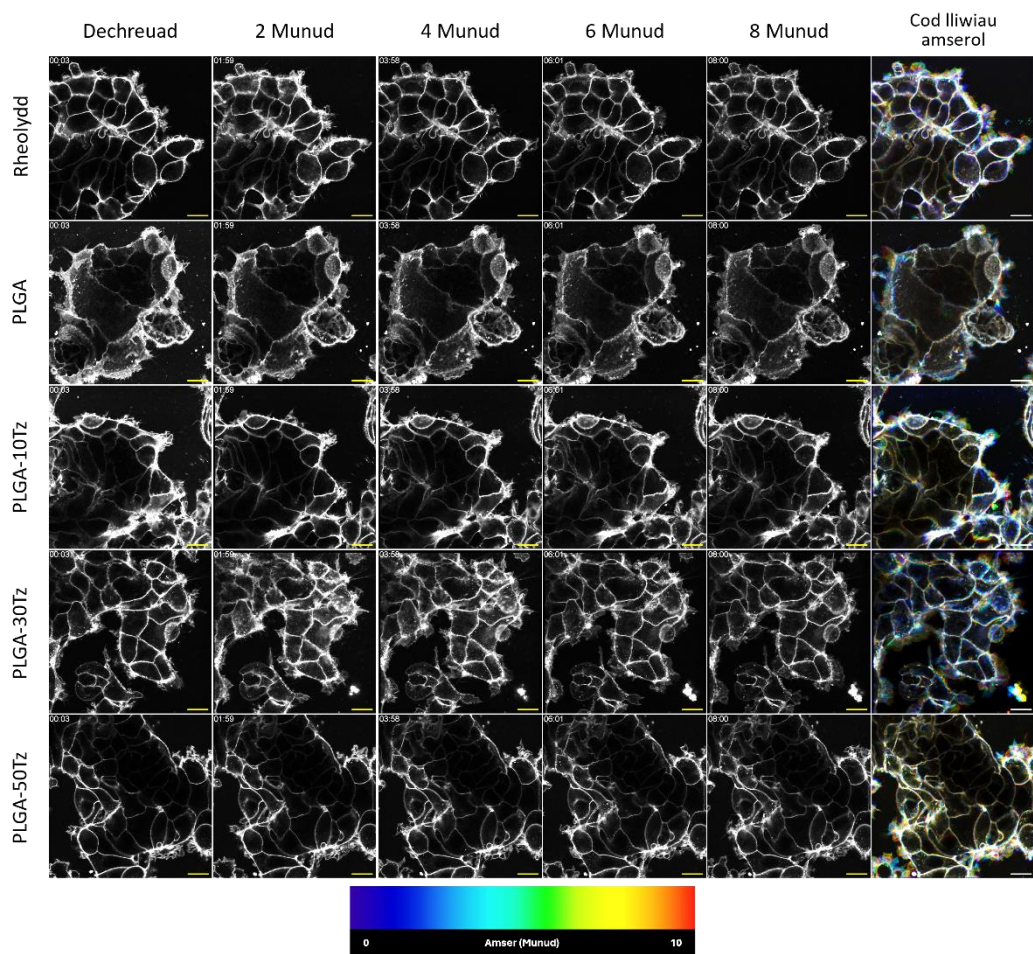
Ffigur 5-12: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/mlNGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen plasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Hefyd dangosir cod lliwiau amserol sy'n dangos yn pa bryd mae'r actifedd yn digwydd yn ystod y 10 munud gyda'r lliwiau yn cyfateb a faint hir i fewn i'r recordiad mae'r actifedd yn digwydd. Bar Raddfa 20µm, saethau yn dangos esiamplau o crychau.

Ymchwiliwyd hefyd effeithiau'r NGau ar y celloedd MCF7. O'r celloedd oedd heb eu trin, roedd yn amlwg eu bod yn llawer mwy egniol o ran gweithgaredd pilen na'r celloedd SKBR3 (Ffigyrau 5-17, 5-18). Mae'n ymddangos bod effaith fwy arwyddocaol ar y bilen plasma a achosir gan y NGau PLGA neu'r gronynnau PLGA-10Tz gyda newid bach iawn rhwng y grwpiau hyn a'r reolaeth y bilen. Gyda'r y PLGA-30Tz mae rhannau o weithgaredd pilen uwch i'w gweld yn amlwg. Ond gan fod yr ardaloedd hyn yn dangos rhywfaint o weithgaredd pilen plasma o'r cychwyn, mae'n annhebygol y gellir ei briodoli i'r driniaeth NGau. Yn debyg i'r grŵp PLGA-30Tz, mae gan y grŵp triniaeth PLGA-50Tz feysydd sy'n dangos gweithgaredd pilen plasma dwys drwy gydol y delweddu, sy'n dangos, unwaith eto, nad yw'n debygol o gael ei achosi gan y driniaeth NGau. Ar y cyfan,

mae hyn yn awgrymu y gallai'r ymateb crychu a welir fod o ganlyniad i'r Tz ar y NGau, ac fod yn unigryw i linellau celloedd HER2+.



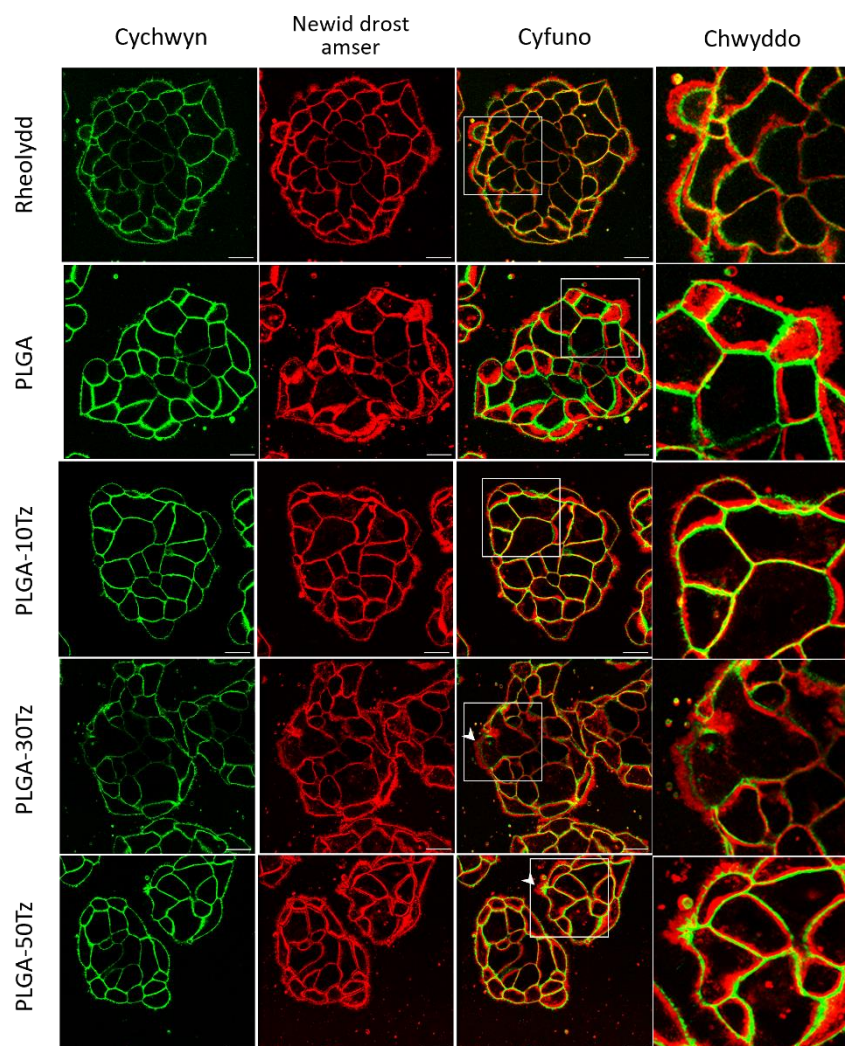
Ffigur 5-13: Celloedd MCF7 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros y 10 munud. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo yn gwyn, saethau yn dynodi crychau. Bar Raddfa 20µm



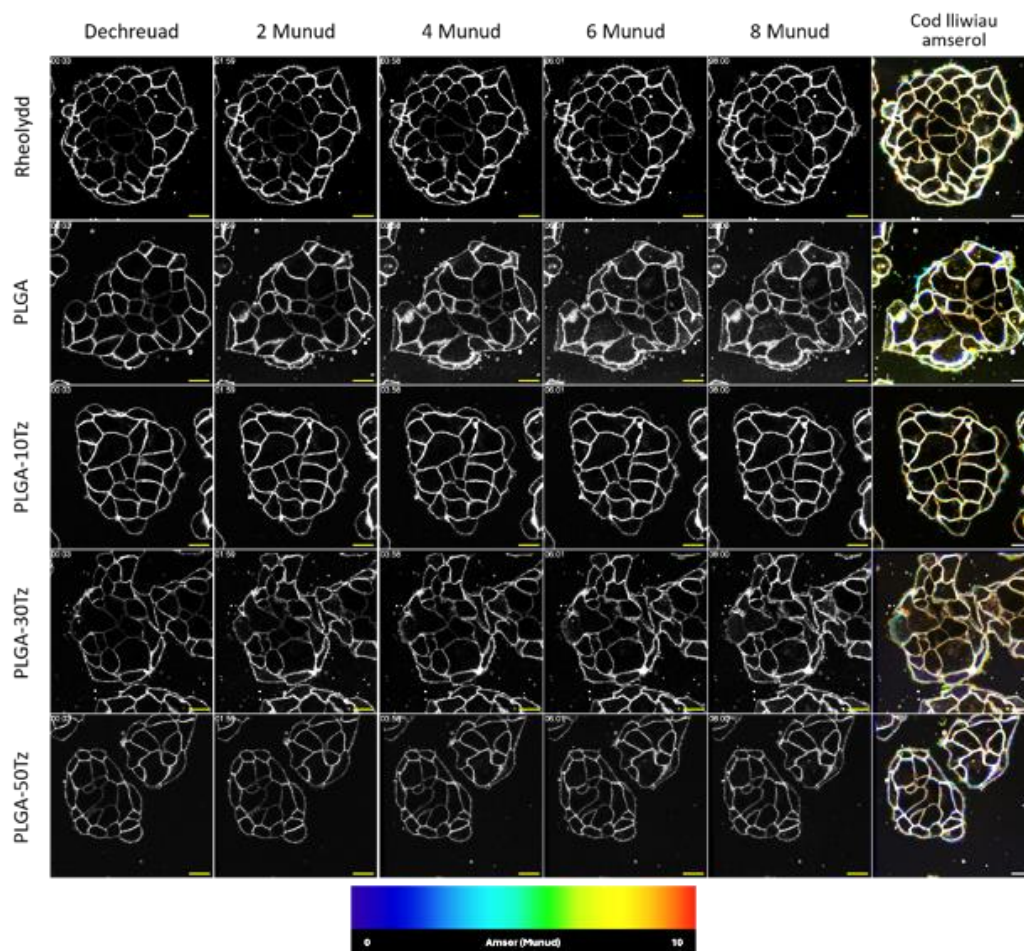
Figur 5-14: Celloedd MCF7 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Hefyd dangosir cod lliwiau amserol sy'n dangos yn pa bryd mae'r actifedd yn digwydd yn ystod y 10 munud gyda'r lliwiau yn cyfateb a faint hir i fewn i'r recordiad mae'r actifedd yn digwydd. Bar Raddfa 20µm

Gyda'r celloedd Clone5 heb driniaeth mae rhan o'r gofod yn amlygu rhywfaint o weithgaredd ond mae'n amrywio dros y clwstwr celloedd; mae rhai celloedd yn llawer mwy egniol nag eraill gan roi rhywfaint o amrywiad yn y canlyniadau a welir (Ffigur 5-19). Gyda'r NGau PLGA ceir darlun tebyg. Mae'n bwysig nodi fod celloedd BT474 a Clone5 ill dau yn fwy sensitif i ddrifft ffocal o ganlyniad i'r tueddiant iddynt glystyru'n drwm. Yn wir, wrth edrych yng nghanol y celloedd am y grŵp NGau PLGA mae'n awgrymu symudiad pilen er na fyddai hyn wedi bod yn bosibl. Gyda triniaeth PLGA-10Tz nid yw'n ymddangos bod unrhyw grychio amlwg tra gyda PLGA-30Tz mae'n anodd pennu dros y

boblogaeth gyfan (Ffigur 5-20). Mae rai rhanbarthau yn dangos lefelau uwch o weithgaredd ond mae'n anodd cymharu a yw hyn o'r un graddau â'r hyn a welir yng nghelloedd y grŵp rheoli sy'n crychdio. Ar y cyfan, gan gynnwys y grŵp PLGA-50Tz, mae'n debygol nad yw'r NGau'n achosi effaith crychdio neu chwyddo cryf o fewn y llinell gell hon.



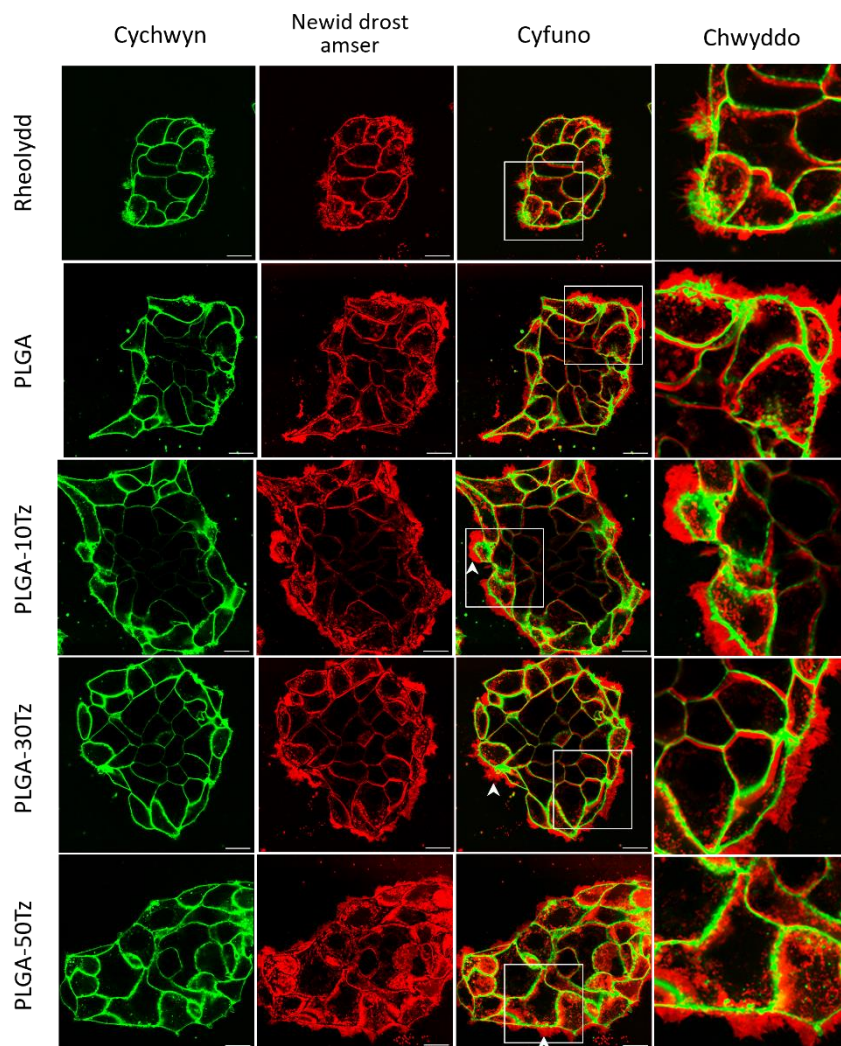
Ffigur 5-15: Celloedd Clone5 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros y 10 munud. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo yn gwyn, saethau yn dynodi crychau. Bar Raddfa 20µm



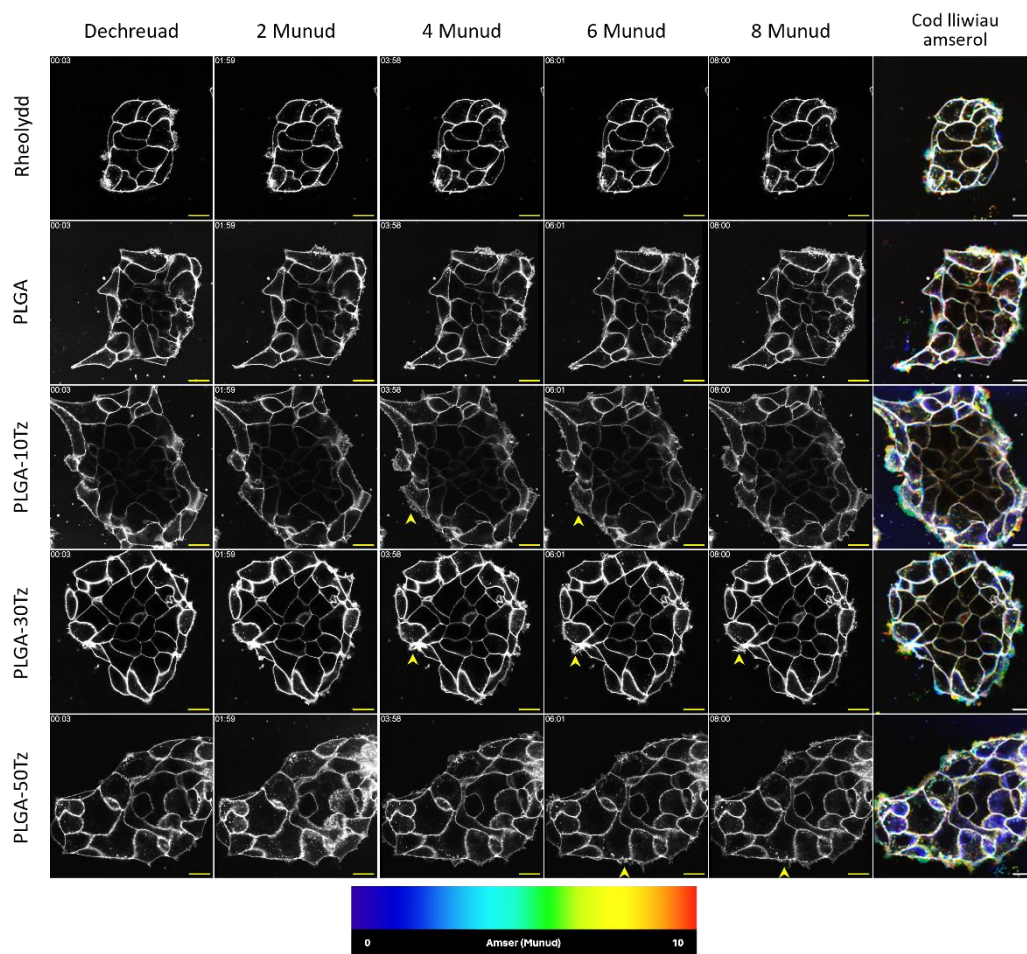
Ffigur 5-16: Celloedd Clone5 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Hefyd dangosir cod lliwiau amserol sy'n dangos yn pa bryd mae'r actifedd yn digwydd yn ystod y 10 munud gyda'r lliwiau yn cyfateb a faint hir i fewn i'r recordiad mae'r actifedd yn digwydd. Bar Raddfa 20µm

Yn symud ymlaen i fesur effaith yr NGau dros 10 munud yn y celloedd BT474, gwelir tuedd debyg yng nghelloedd rheoli gyda'r clwstwr yn cynnwys celloedd â gweithgaredd cymharol uchel ac isel (Ffigur 5-21). Y tro hwn, fodd bynnag, gyda'r NGau PLGA, ymddengys bod lefel uwch o weithgaredd â rhanbarthau o weithgaredd uchel yn cael eu gweld. Unwaith eto, dilynir y duedd hon gan y grŵp PLGA-10Tz sy'n dangos gweithgaredd lefel llawer uwch na'r hyn a welir yn y NGau rheoli a PLGA, tra hefyd yn dangos gradd llawer uwch o weithgaredd na'i gyfwerth yn y celloedd Clone5 (Ffigur 5-22). Mae' triniaeth gyda PLGA-30Tz hefyd yn dangos lefelau uchel o weithgaredd pilen gyda rhai

rhanbarthau o'r clwstwr celloedd yn arddangos crychio mwy sylweddol nag ardaloedd eraill. Gyda'r celloedd BT474, fodd bynnag, ymddengys mai'r crychio mwyaf amlwg a gynhyrchir gan y PLGA-50Tz. Mae'n ymddangos bod y crychau a gynhyrchir gan y NGau hyn i'r un maint â'r rhai a gynhyrchir gan y NGau addurnedig eraill, ond maent yn bresennol dros gyfran fwy o'r clwstwr celloedd.



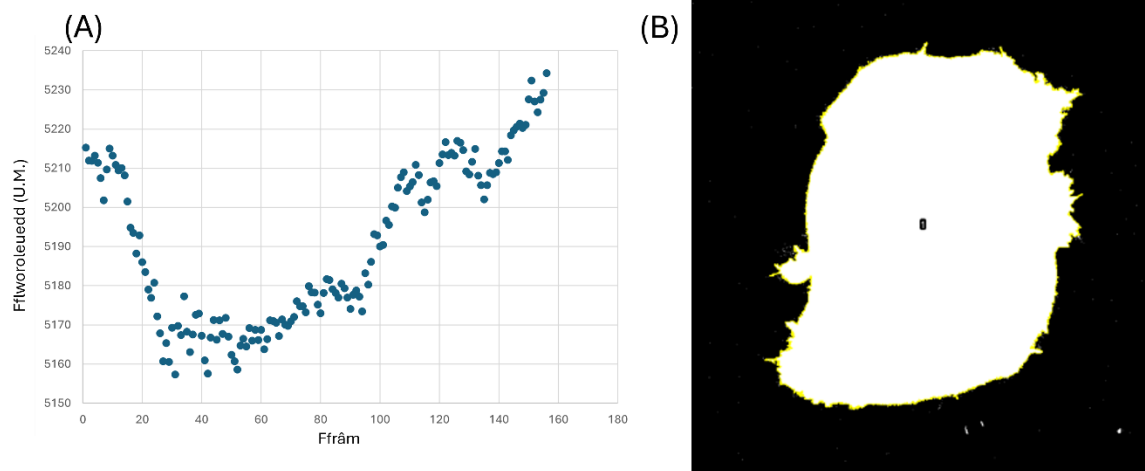
Ffigur 5-17: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros y 10 munud. Dynodir yr ardal sydd wedi chwyddo yn gwyn, saethau yn dynodi crychau. Bar Raddfa 20µm



Figur 5-18: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Hefyd dangosir cod lliwiau amserol sy'n dangos yn pa bryd mae'r actifedd yn digwydd yn ystod y 10 munud gyda'r lliwiau yn cyfateb a faint hir i fewn i'r recordiad mae'r actifedd yn digwydd. Bar Raddfa 20µm. saethau yn dangos esiamplau o crychau

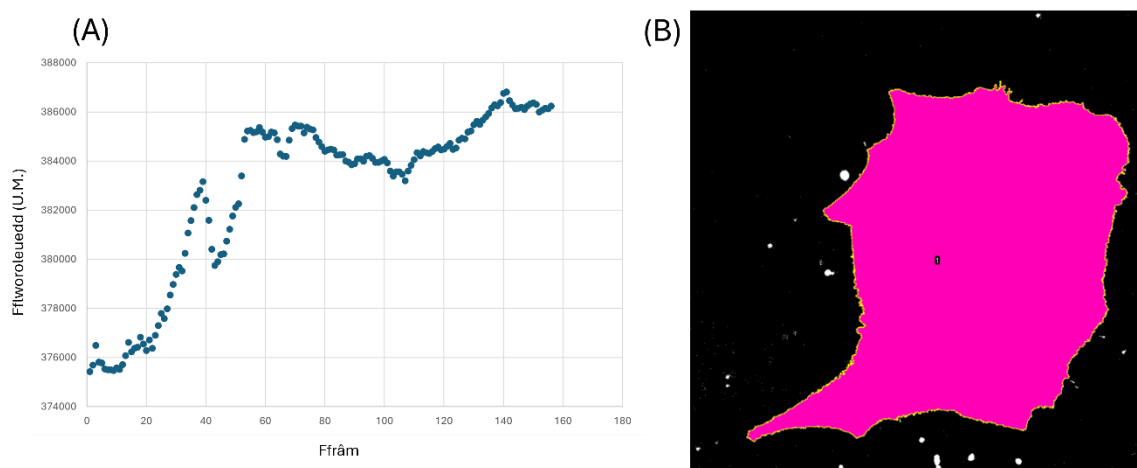
5.5 Mesur effaith y crychïo mewn 2D

Ar ôl cofnodi ffurfiant y crychau a'r chwyddiadau hyn, ceisiwyd mesur eu maint a sut yr oeddent yn effeithio ar faint/cyfaint y celloedd. Penderfynwyd geisio optimeiddio'r mesuriad hwn mewn celloedd BT474. Y rheswm am hyn oedd, gan fod celloedd BT474 unigol i'w gweld ymateb yn wahanol ac yn codi'r ddamcaniaeth y gellir osgoi'r amrywiad a welwyd rhwng celloedd unigol trwy fesur arwynebedd y clwstwr celloedd cyfan. Wrth wneud hyn roedd prosesu'r data hefyd yn fwy syml gan fod canolbwyntio ar y clwstwr cyfan yn dileu'r angen i olrhain y newidiadau arwynebedd dros celloedd unigol. Trwy wneud y mesuriad hwn, y nod oedd y byddai'n gwell mesur o effeithiau newid falens y Tz ar y NGau ar y bilen blasma. Er enghraifft, y nod oedd i cadarnhau'r canfyddiadau hyn drwy wneud ymchwiliadau i weld oes oedd yna perthynas gyda effeithlonrwydd fewnoli NGau. I wneud hyn, cafodd y clwstwr celloedd ei drothwyo a'i wneud yn ddelwedd ddeuaidd. Cysylltwyd y bilen â llaw mewn rhanbarthau lle nad oedd y signal yn ddigon unfurf i ffurfio llinell lân. Yn dilyn hyn, defnyddiwyd y gorchymyn 'llenwi tyllau' i ganiatáu ar imageJ i fesur y clwstwr celloedd cyfan. Yna mesurwyd arwynebedd y clwstwr cyfan ym mhob ffrâm, gan ganiatáu olrhain y gwahaniaethau y gellir eu priodoli i'r crychau neu'r chwyddiadau. Gyda celloedd rheoli BT474, mae'r arwynebedd a blotiwyd yn dangos gostyngiad o tua 55% yng nghyfanswm yr arwynebedd ar ôl i'r delweddu ddechrau (Ffigur 5-23). Yn gyffredinol, fodd bynnag, mae cyfanswm yr arwynebedd yn adfer i lefelau sylfaenol cyn gostyngiad bach. Ar ôl cynnydd bach wrth i'r delweddu ddod i ben, mae cyfanswm yr arwynebedd tua 20% yn uwch na'r sylfaenol.



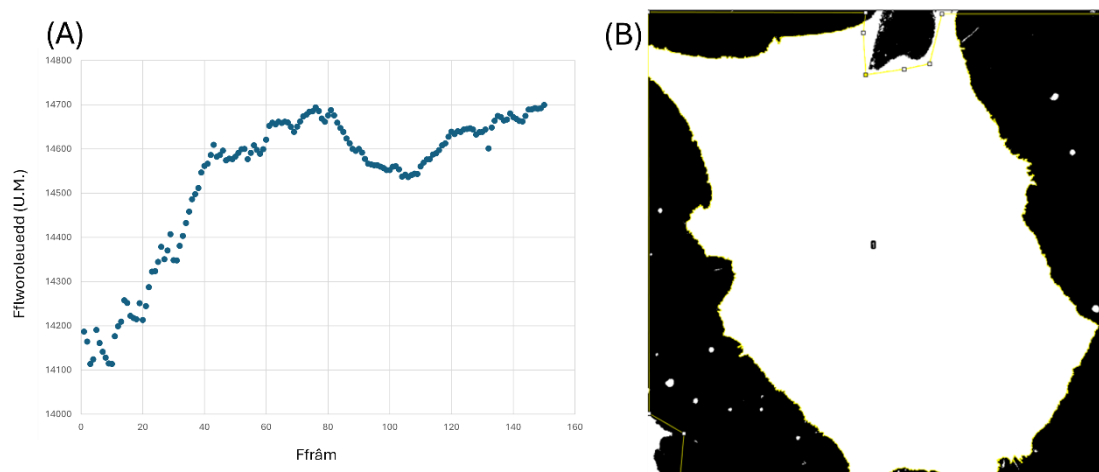
Ffigur 5-19: Newid mewn arwynebedd y rheolydd BT474 yn ystod yr 10 munud (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).

Gyda'r y NGau PLGA heb eu haddurno, mae cynnydd cyflym yng nghyfanswm arwynebedd y clystyrau yn syth ar ôl y driniaeth o linell sylfaen o tua 375500 U.M i tua 383000 U.M. Ar ôl cyrraedd y brig cyntaf hwn, mae gostyngiad yn yr arwynebedd i lawr i 380000 U.M cyn cynnydd cyflym arall i 385000 U.M. Yna mae hyn yn amrywio ychydig dros amser cyn gorffen ychydig dros 386000 U.M ar ddiwedd y delweddu (Ffigur 5-24).



Ffigur 5-20: Newid mewn arwynebedd y celloedd BT474 wedi trin â 500µg/ml NGau PLGA yn ystod yr 10 munud cyntaf ar ôl triniaeth (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).

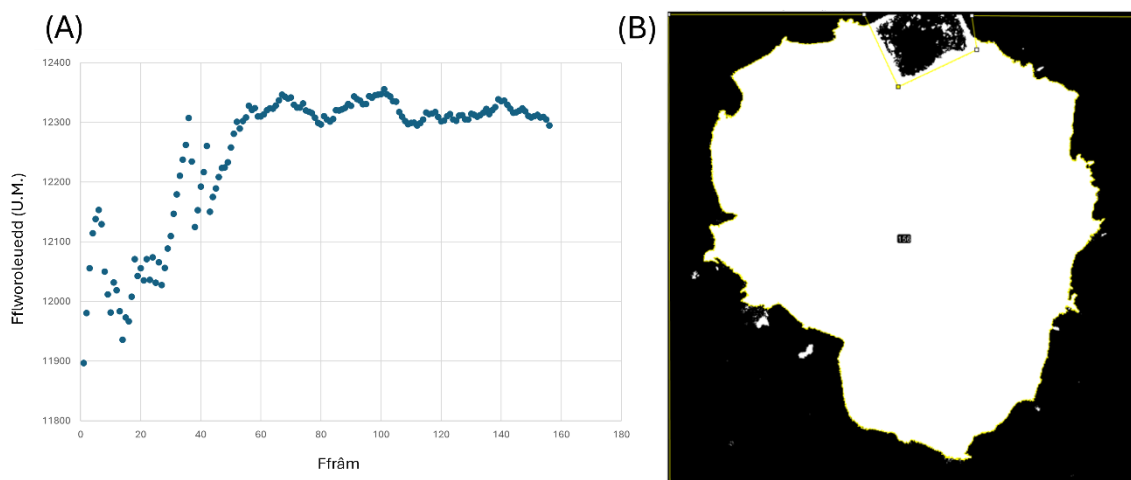
Gwelir tuedd debyg gyda'r y NGau PLGA-10Tz. Yn dilyn y driniaeth mae cynnydd cyflym yn yr arwynebedd o linell sylfaen o 14150 U.M hyd at 14600 U.M cyn cynnydd graddol estynedig i 14700 U.M. Dros y fframiau sy'n weddill mae'r cyfanswm arwynebedd yn gostwng i 14550 U.M cyn adfer yn ôl i 14700 U.M ar ddiwedd y delweddu (Ffigur 5-25). Gyda'r maes-weladwy hwn, roedd yn rhaid cau'r rhanbarth oedd yn cwmpasu gell ar ben y clwstwr celloedd allan o'r ardal a fesurwyd. Roedd hyn oherwydd bod y gell yn ymestyn y tu hwnt i'r maes weladwy, yn ogystal, eithriwyd yr ychydig fframiau cyntaf yn syth ar ôl y driniaeth o'r dadansoddiad oherwydd cefndir gormodol o blastig y ddysgl.



Ffigur 5-21: Newid mewn arwynebedd y celloedd BT474 wedi trin â 500µg/ml NGau PLGA-10Tz yn ystod yr 10 munud cyntaf ar ôl triniaeth (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).

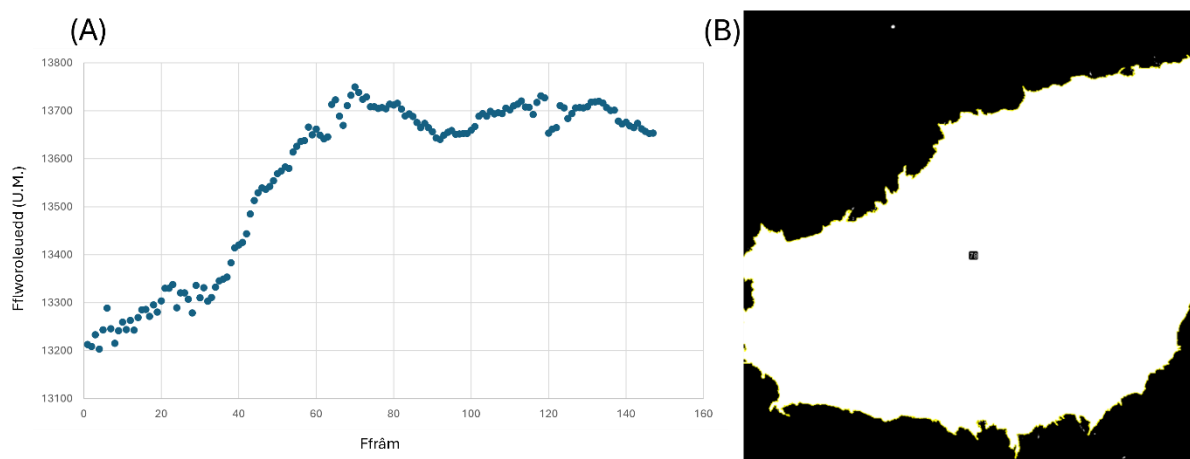
I gymharu gyda'r grŵp rheoli mae llawer iawn o weithgaredd a newid mewn arwynebedd yn cael ei amlygu'n gynnar iawn ar ôl dechrau'r delweddu'r ymateb i'r NGau PLGA-30Tz. O fewn y 10 ffrâm gyntaf mae'r arwynebedd a gwmpesir yn cynyddu'n gyflym o 11900 U.M i tua 12150 U.M cyn gostwng yn gyflym i tua 11950 U.M (Ffigur 5-26). Yn dilyn hyn mae cyfnod o amrywiadau cyn cynnydd cyflym hyd at ychydig dros 12300 U.M, yna mae gostyngiad byr yn yr arwynebedd cyn iddo adfer eto hyd at uchafbwynt o 12350 U.M. Yna mae cyfanswm yr arwynebedd yn amrywio ychydig tan ddiwedd y broses ddelweddu,

gan orffen tua 12300 U.M. Unwaith eto, bu'n rhaid eithrio rhanbarth o'r gell o'r dadansoddiad oherwydd nad oedd y bilen o fewn y maes weladwy.



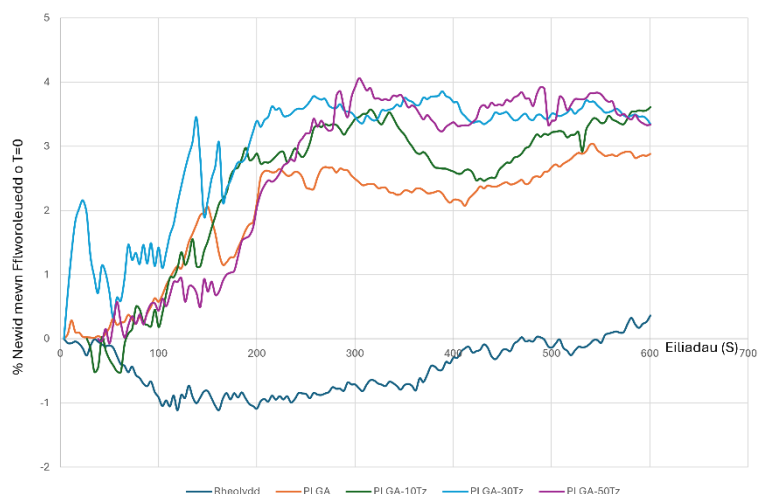
Ffigur 5-22: Newid mewn arwynebedd y celloedd BT474 wedi trin â 500µg/ml NGau PLGA-30Tz yn ystod yr 10 munud cyntaf ar ôl triniaeth (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).

Gyda'r y NGau PLGA-50Tz mae cynnydd cymharol raddol sydd wedyn yn cynyddu'n gyflym gan ddod â chyfanswm yr arwynebedd o'r llinell sylfaen o 13200 U.M hyd at 13750 U.M. Mae hyn, yn dilyn y duedd a welwyd gyda'r NGau addurnedig blaenorol, yn amrywio dros amser cyn cyrraedd 13650 U.M erbyn diwedd y delweddu (Ffigur 5-27). Unwaith eto, fodd bynnag, gyda'r grŵp PLGA-50Tz, roedd yn rhaid i ni eithrio fframiau o ddechrau'r amser-gam o'r dadansoddiad oherwydd fflwroleuedd cefndirol.



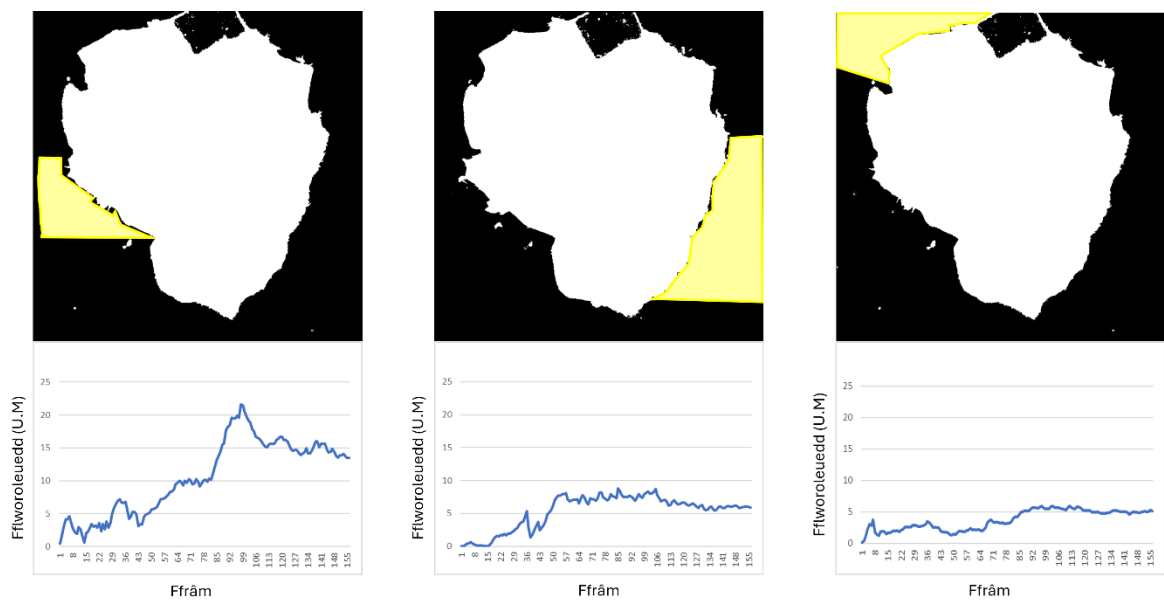
Ffigur 5-23: Newid mewn arwynebedd y celloedd BT474 wedi trin â 500µg/ml NGau PLGA-50Tz yn ystod yr 10 munud cyntaf ar ôl triniaeth (A). Dangosir hefyd esiampl o un ffrâm sengl wedi trothwyo (B).

Yna ceisiwyd normaleiddio'r data i ganiatáu cymhariaeth o ran mesur y crychio rhwng y gwahanol triniaethau. Yna bu ymchwilio i'r arwynebedd fel canran o'i gymharu â'r hyn yr oedd ar y llinell sylfaen. Drwy ddefnyddio'r dull hwn i gymharu'r effaith a gyfryngir gan y crychu o ran arwynebedd celloedd, mae'n datgelu gwahaniaeth clir rhwng yr holl driniaethau NGau a'r grŵp rheoli (Ffigur 5-28). Erbyn diwedd y cyfnod delweddu, dangosodd ar draws y triniaethau, gynnydd clir yng nghyfanswm arwynebedd y celloedd gyda chynnydd mwy i'w weld yn y NGau wedi'u haddurno â Tz. Cynhyrchodd yr holl NGau-Tz newid ychwanegol o 0.5% mewn arwynebedd o'i gymharu â'r rhai heb eu haddurno. Yn ddiddorol, mae'r tueddiadau cynnar gyda pob math o NGau yn fras debyg. Mae pob triniaeth yn dangos cynnydd cymharol raddol mewn arwynebedd yn ystod y 100 eiliad cyntaf, ac yna mae cyfnod o dwf cyflym yng nghyfanswm arwynebedd y clystyrau celloedd sy'n cyrraedd uchafbwynt gyda pob un o'r grwpiau triniaeth yn rhanbarth y 200-300 eiliad. Wedi hynny, mae cyfnod o amrywiadau cymharol lai mewn arwynebedd gyda'r cyfanswm arwynebedd o'i gymharu â'r llinell sylfaen yn uwch ar ddiwedd y delweddu. Yn ddiddorol, er bod y PLGA-30Tz a'r PLGA-50Tz yn dangos amrywiadau o fewn cyfanswm yr arwynebedd, maent ill dau yn parhau i fod ymhell uwchlaw'r newid arwynebedd a gynhyrchir gan y NGau PLGA heb eu haddurno. Mae'r gronynnau PLGA-10Tz, ar y llaw arall, yn ymddwyn fel y gronynnau addurnedig eraill i ddechrau ond ar ôl y marc 300 eiliad mae gostyngiad yn y newid arwynebedd a gynhyrchir ac maent yn dangos effaith debyg i'r hyn a welir yn y NGau PLGA heb eu haddurno.



Ffigur 5-24: Effaith yr wahanol driniaethau ar arwynebedd y celloedd BT474 a sut mae o'n newid yn ystod yr 10 munud.

Yn ogystal â dadansoddi dros y clwstwr celloedd cyfan, ymchwiliwyd hefyd i'r gwahanol ardaloedd o fewn yr un clwstwr celloedd. I wneud hyn, dewiswyd rhanbarthau allgellog fel bod unrhyw grychio sy'n croesi i'r rhanbarthau hyn yn cael ei ganfod a'i fesur fel ardal ymwithio. Dewiswyd tri rhanbarth a ddangosodd wahanol raddau o grychio: un tebyg i'r hyn a welwyd yn y celloedd rheoli, un ardal o radd gymedrol o grychio ac ardal o radd uwch o grychio (Ffigur 5-29). Gwnaed hyn mewn ymgais i broffilio'r gwahanol fathau o crychau a welwyd fel ffordd o geisio cael syniad mwy manwl-gywir am effaith y NGau. Fel y gwelir dros y graffiau, mae difrifoldeb y crychio o fewn y gwahanol ardaloedd yn sylweddol wahanol i'w gilydd. O'r graffiau hyn, mae'n amlwg bod y crychau yn yr ardal gyntaf, yr ydym yn ei disgrifio fel un sy'n fwy ymosodol ac eithafol, yn ganlyniad i radd fwy o ailfodelu pilen plasma o'i gymharu â'r ddau ranbarth arall. O ran y ddau ranbarth arall, nid yw'r gwahaniaeth rhyngddynt mor sylweddol ag y disgwyliwyd o'r delweddau gyda'r crychio cymedrol ond ychydig yn uwch o'i gymharu â'r crychio lefel isel. I gymharu, mae'r crychu difrifol yn sylweddol uwch na'r ddau ranbarth hyn.



Ffigur 5-25: Dangosir yr wahanol cryfder o crychio a mesurwyd mewn 3 ardal penodol o celloedd oedd wedi trin â PLGA-30Tz. Dynodir yr ardael lle cafodd y crychu ei fesur ynddo drwy defnyddio bocs melyn.

5.6 Delweddu Celloedd mewn 3D

Yr anfantais fwyaf o geisio cofnodi graddfa lawn y crychio yn y modd 2D, yn enwedig dros celloedd BT474 a Clone5, yw mai dim ond un plân ffocal oedd yn cael ei gofnodi. Gan fod celloedd yn strwythurau 3D, mae'n rhesymegol dod i'r casgliad, tra'n cofnodi crychio ar un plân ffocal, ei fod hefyd yn digwydd dros wyneb y celloedd i gyd.

Penderfynwyd fod ymdrechion pellach i fireinio'r optimeiddio hwn yn ofer os na allem ddal graddfa lawn yr ailfodelu pilen plasma oedd yn cael ei achosi gan y NGau. Er ein bod wedi cyflawni delweddu 3D o samplau o'r blaen gan ddefnyddio Tz488, roeddent mewn celloedd oedd wedi ei anweithredu. Ein nod oedd dal pentyrrau-z llawn gan ganiatáu ddelweddu ffurfiant y crychau yn llawn a dros y gell gyfan. Ni fyddai gwneud hyn heb ei heriau, fodd bynnag. Er mwyn dal ffurfiant a chyfanswm hyd y crychau, byddai angen dal y pentyrrau-z llawn yn gyflym. Er ein bod wedi gwneud ymdrech i gadw newidiadau tymheredd i'r lleiafswm, byddai rhywfaint o ddrifft-ffocal wrth osod y sampl yn y siambr ddelweddu wedi'i gwresogi. Roedd hyn yn golygu bod angen dal rhanbarth mwy nag arfer o fewn y pentyrrau-z i ddarparu gyda'r drifft ffocal, gan gynyddu'r amser sydd ei angen i gofnodi pentwr llawn yn gyffredinol gan waethygu'r angen am ddelweddu cyflym ac er y byddai defnyddio sganio deuffordd yn helpu'n rhannol, ni fyddai'n ddigon. Dewiswyd defnyddio sganiwr atseiniol y microsgop cydffocal sy'n caniatáu delweddu o gyflymder llawer uwch o'i gymharu â'r data blaenorol a ddangoswyd (4000Hz i'w gymharu â 400Hz) ar gost cymhareb signal i sŵn llawer gwannach. Cyflwynodd hyn ei heriau ei hun o ran optimeiddio amodau delweddu yn enwedig gan ein bod yn anelu at gofnodi cymaint o bentyrrau-z â phosibl o fewn yr amser delweddu cyfan o 10 munud. I geisio delio gyda hyn wnaethom gynyddu pŵer y laser a gosodiadau cyfartaleddu llinell

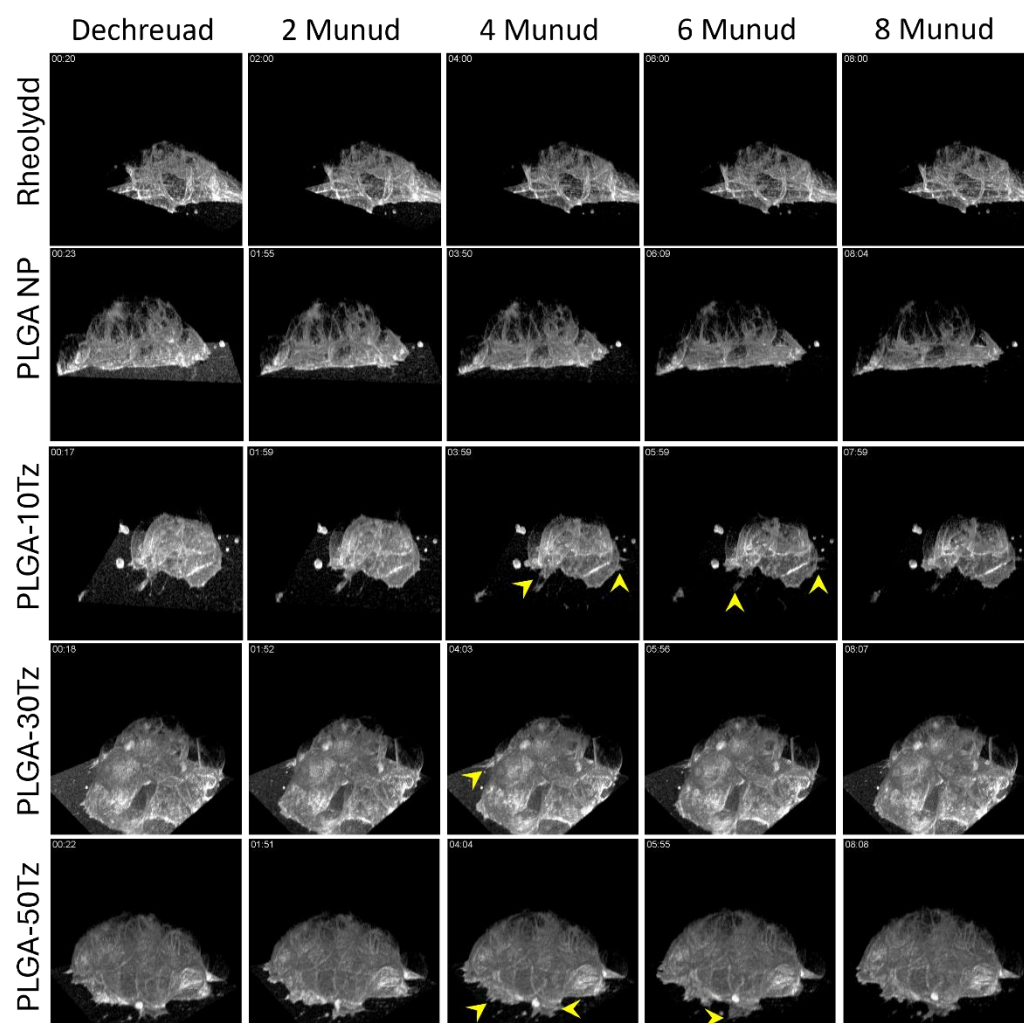
yn fawr o'i gymharu â'r recordiad 10 munud 2D i wneud y mwyaf o'r gymhareb signal i sŵn. Er i ni geisio optimeiddio'r gosodiadau roedd yna ddim modd i fesur yr effaith y byddai hyn yn ei chael ar gannu ffotograffig dros y cyfnod 10 munud o ddelweddu. Felly, cafodd y gosodiadau eu optimeiddio i ryw raddau fesul achos rhwng pob delwedd. I werthuso'r dechneg hon ymlaen llaw, cymharwyd celloedd heb eu trin ochr yn ochr â chelloedd wedi ei trin â dextran 10KDa 647. Wrth i dextran fynd i mewn i'r gell trwy endocytosis gwedd hylifol, y nod oedd gweld oedd modd cofnodi'r symudiadau dros y bilen yn ddigon manwl, o ystyried y gymhareb signal sŵn y cefndir. Gyda'r sganiwr atseiniol cymerodd 0.21 eiliad i recordio pob ffrâm, i gymharu, cymerodd pob un 3.85 eiliad ar gyfer yr recordiadau 2D uchod. Ar y cyfan, fodd bynnag, dangosodd yr arbrofion cychwynnol hyn dopograffeg arwyneb llawn y celloedd. Roedd modd gweld natur hylifol pilen blasma'r celloedd a chipio ffurfiant a chwymp y crychau neu chwyddiadau'r bilen blasma, a hefyd ei symudiad. Gan ein bod wedi cofnodi pentyrrau-z llawn, roeddem yn gallu delweddu'r celloedd mewn 3D gan roi mwy o wybodaeth ofodol i ni am sut mae'r celloedd yn ymateb. Nid oedd modd canfod hyn gyda dadansoddiad mwy confensiynol sy'n canolbwyntio ar un plân ffocws.

Yn dilyn llwyddiant yr arbrofion cynnar hyn, symudwyd ymlaen i ddefnyddio'r dechneg hon o i fesur effaith y NGau ar y llinellau cell eraill. Unwaith eto, archwiliwyd effaith NGau PLGA heb eu haddurno ochr yn ochr â'r PLGA-10Tz, PLGA-30Tz a PLGA-50Tz. Gan fod maint y pentwr-z yn amrywio gyda pob delwedd, roedd yn golygu na allem gymharu'r (dros y llinellau cell) crychu'n uniongyrchol ar yr un adegau. Oherwydd hyn, cyflwynir y data ar yr adegau a oedd agosaf at y pwyntiau amser 0, 2, 4, 6 neu 8 munud. Oherwydd y cannu ffotograffig a grybwyllwyd uchod, bu'n rhaid eithrio'r marc 10 munud gan fod y

signal wedi diraddio gormod byddai'r dadansoddiad yn annibynadwy. Roedd cyflwyno'r data felly yn heriol ac yn gyntaf dewiswyd y rhagamcanion mwyaf.

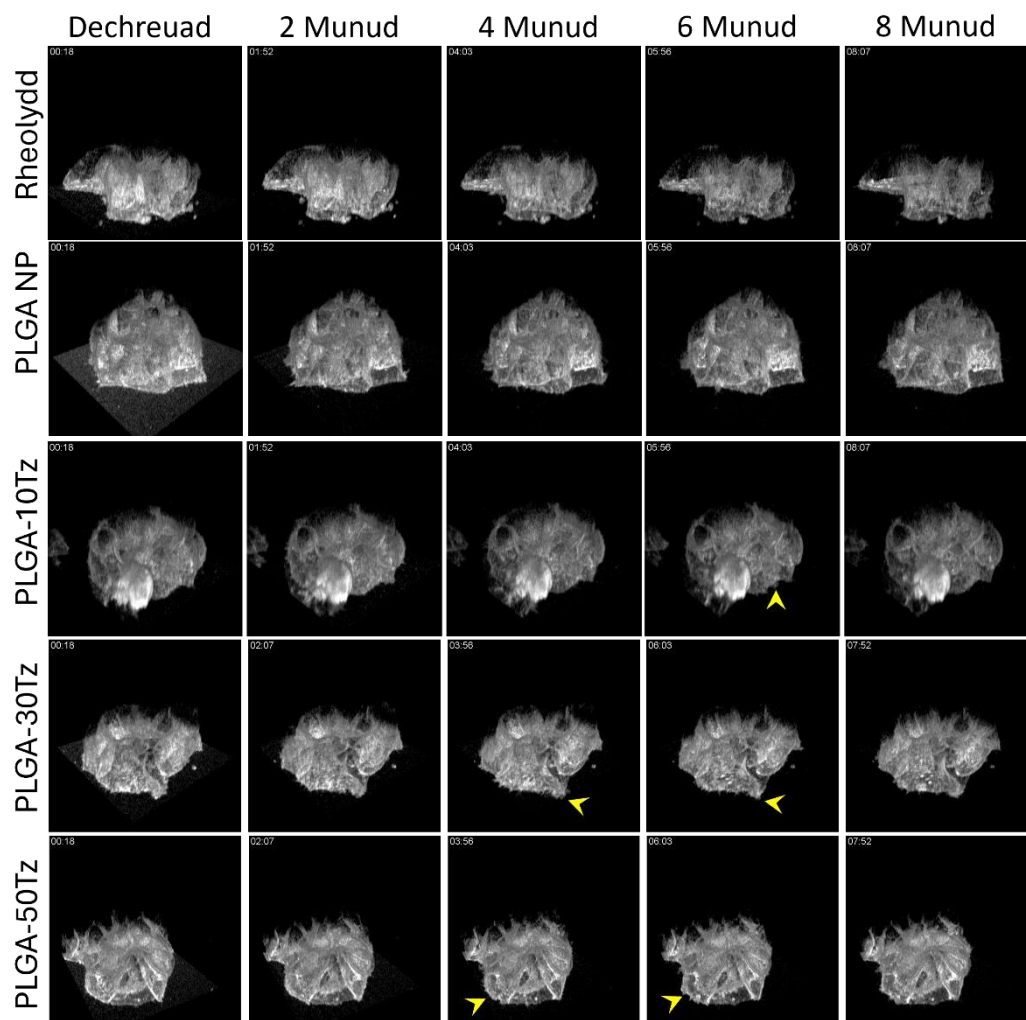
Gyda'r y grŵp rheoli BT474, cymerodd tua 20 eiliad i ddelweddu pentwr-z cyfan.

Roeddem yn gallu delweddu y gweithgaredd cefndir lefel isel dros wyneb y gell a gweld yn union ble yn y clwstwr y digwyddodd hyn (Ffigur 5-30). Roedd y NGau PLGA heb eu haddurno yn achosi ymateb tebyg i'r hyn a welwyd yn y celloedd rheoli. Er bod y posibilrwydd bod ychydig mwy o crychu, nid oeddent yn wahanol o ran maint na natur i'r rhai a welwyd yn y grŵp rheoli. Fodd bynnag, gyda PLGA-10Tz mae chwyddiadau a ffenoteip o natur gwahanol. Wedi tua 4 munud, mae 'r crychu a'i maint yn fwy amlwg ac yn fwy deinamig na'r hyn a welwyd yn y grŵp rheoli, erbyn tua 6 munud i fewn mae hyn yn dod yn amlwg iawn. Yn ogystal â'r crychio, mae'r chwyddiadau i gyd yn parhau hyd at y marc 8 munud. Ymddengys mai'r NGau hyn sy'n achosi'r adwaith cryfaf o'n holl NGau. Gyda'r y PLGA-30Tz a'r PLGA-50Tz ill dau, er eu bod yn achosi'r crychu mwy eithafol, mae hyn yn digwydd yn llai aml ac yn ogystal, ychydig iawn o chwyddiadau a welir, os o gwbl. At ei gilydd, y grŵp PLGA-10Tz a ysgogodd yr ymateb er y gwelwyd mwy o grychio hefyd ym mhob grŵp triniaeth NGau-Tz



Figur 5-26: Celloedd BT474 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml nanoronynnau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Saethau yn dangos crychu.

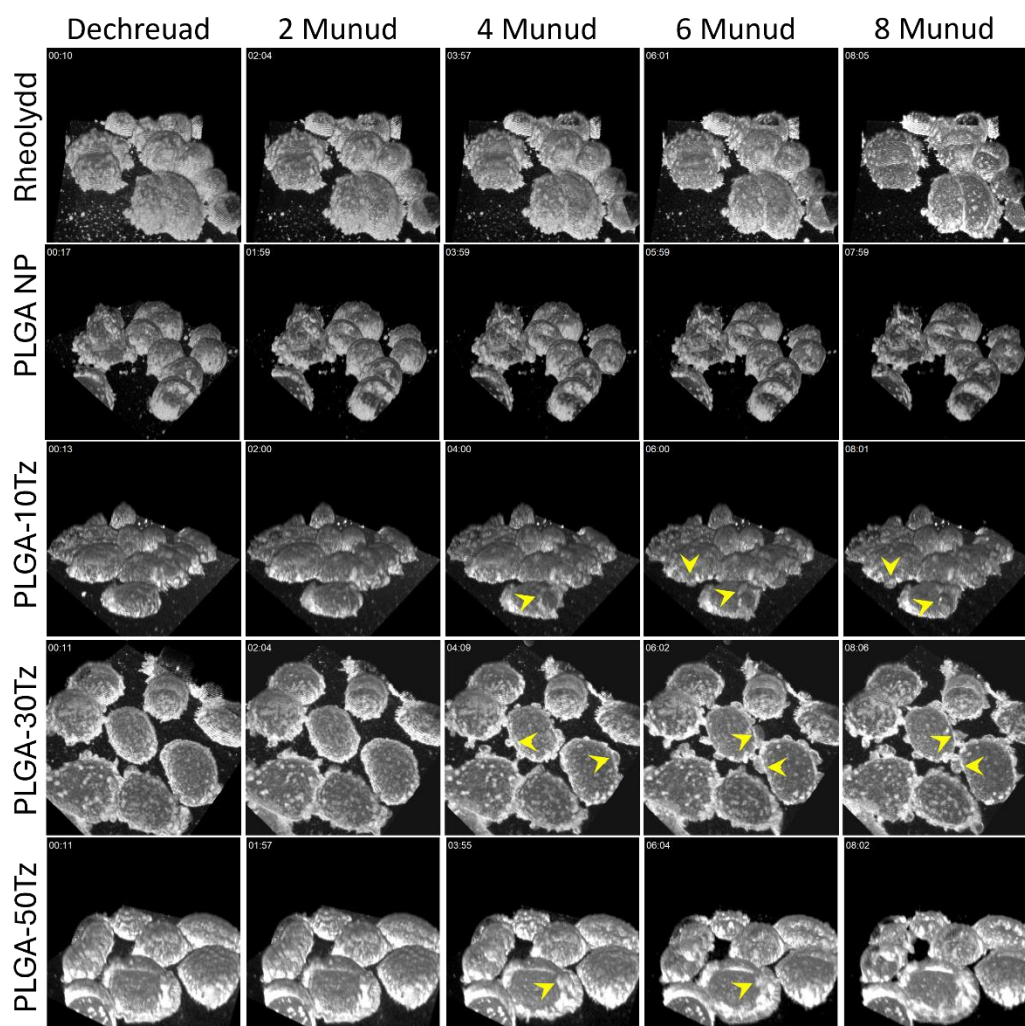
Yn debyg i'r grŵp rheoli yn y celloedd BT474, mae'r celloedd Clone5 heb eu trin yn dangos rhywfaint o grychio a gweithgaredd arwyneb naturiol lefel isel ochr yn ochr â symudiad gan ffurfio rhai ymwthiadau mân ar y bilen (Ffigur 5-31). Y tro hwn, fodd bynnag, gyda'r NGau PLGA heb eu haddurno, maent yn ymddangos yn arwain at fwy o grychio dros y celloedd, ac mae'r crychio hwn yn ymddangos yn debyg i'r ffenoteip naturiol, fodd bynnag, mae rhanbarthau lle mae'r crychio mwy ymosodol yn digwydd. Unwaith eto, mae'r crychio mwy ymosodol yn weladwy dros wyneb y celloedd a gafodd eu trin â PLGA-10Tz, gan ddisodli'r ffenoteip lefel isel a welir yn y celloedd rheoli. O ran y grŵp PLGA-30Tz, mae wyneb cyfan y clwstwr celloedd yn ymddangos yn ddeinamig iawn gyda llawer iawn o weithgaredd pilen plasma. Yn ogystal â'r crychio mwy ymosodol, gellir gweld ffurfio mwy o grychio-petalau. Yn yr un modd, mae'r PLGA-50Tz hefyd yn achosi crychio ymosodol dros wyneb y celloedd. Ar y cyfan, fodd bynnag, nid yw eu hymateb mor eang â'r PLGA-10z na'r PLGA-30Tz, gyda'r ail yn achosi'r ailfodelu pilen plasma mwyaf deinamig.



Ffigur 5-27: Celloedd Clone5 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Saethau yn dangos crychu.

Heb driniaeth roedd pilenni plasma yn ddeinamig gyda gweithgaredd weladwy dros wyneb y celloedd yn y grŵp rheolydd (Ffigur 5-32). Ar ôl triniaeth gyda'r NGau PLGA heb eu haddurno, roedd rhywfaint o chwyddo a crychio ymosodol yn amlwg. Gwelwyd rhywbeth tebyg mewn ymateb i'r PLGA-10Tz, fodd bynnag, y tro hwn roedd ymwthiadau pilen mawr, tebyg i betalau, yn weladwy. Roedd yr rhain yn amlwg hefyd yn y celloedd PLGA-30Tz. Gellir gweld ymddangosiad nifer o'r ymwthiadau hyn dros sawl celloedd ar ôl tua 4 munud o ddelweddu. Mae'r rhain yn parhau drwy gydol yr amser arbrawf ac yn

arbennig o amlwg o amgylch cyrion y celloedd. Gyda'r y celloedd PLGA-50Tz mae un gell yn benodol yn dangos crychio ar raddfa fawr dros ei chylchedd cyfan. Mae'n bwysig nodi nad ydynt mor amlwg nac mor eang â'r rhai a welir yn y PLGA-30Tz.



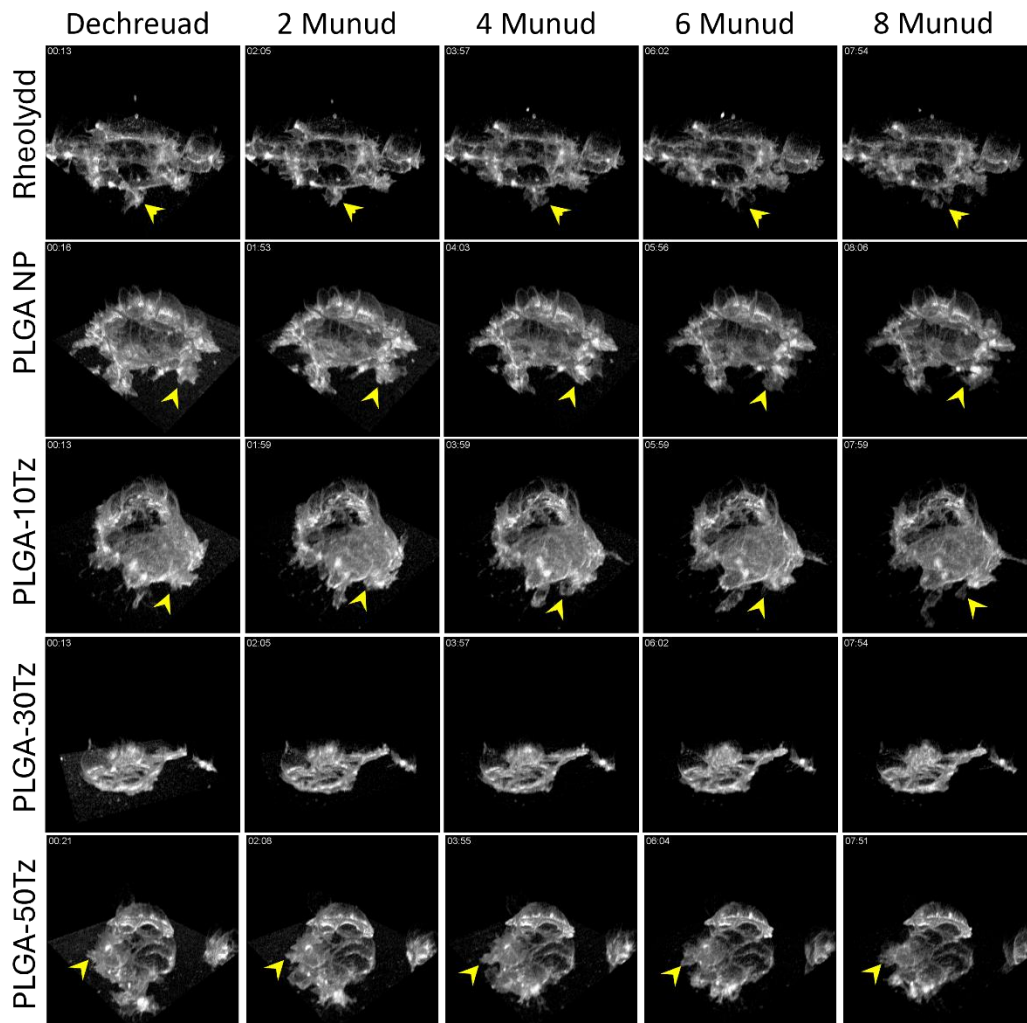
Ffigur 5-28: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Saethau yn dangos crychu.

At ei gilydd, o blith y llinellau celloedd HER2+, y celloedd SKBR3 sydd, yn fwyaf amlwg, yn adweithio i'r NGau-Tz, yn enwedig y PLGA-30Tz. Er bod y llinellau celloedd eraill yn dangos chwyddiadau a/neu crychio mae'r celloedd SKBR3 yn dangos ymwithiadau pilen mawr dros eu harwyneb sy'n parhau tan ddiwedd y delweddu, ac efallai dros gyfnod

hirach. Mae'r ymwthiadau hyn yn sylweddol na'r rhai a welwyd yn y grŵp rheoli. Er bod y crychio yn y grŵp rheoli yn gymharol fyrhoedlog, mae'r ymwthiadau hyn yn parhau am gryn dipyn o amser ar wyneb y gell.. Yn ddiddorol, mae'r amser a gymerir i'r crychio ddigwydd yn gyson dros y gwahanol linellau celloedd hyd yn oed os nad yw natur a difrifoldeb yr ymateb yn gyson.

Ar ôl dangos eu heffaith dros y llinellau celloedd HER2+, y cam nesaf oedd archwilio a oedd yr effaith hon a gyfryngir gan NGau yn unigryw i'r celloedd hyn a gwerthuso a oeddent yn gallu cynhyrchu effeithiau tebyg o fewn y celloedd MCF7 HER2-isel. Felly gwnaed yr un arbrofion â'r linell hon. Yr hyn a oedd yn amlwg ar unwaith oedd eu bod heb her NGau yn llawer mwy egnïol dros y bilen plasma o'i gymharu â'r llinellau celloedd blaenorol (Ffigur 5-33). Gwelwyd crychio eang dros wyneb y grŵp rheoli gyda'r rhain yn llawer mwy amlwg, o ran gweithgaredd a maint, o'i gymharu â'r rhai a welwyd yn y grwpiau rheoli blaenorol. Mae hyn i'w weld yn y grŵp NGau PLGA heb ei addurno gan ei gwneud hi'n anodd pennu a yw'r gronynnau'n cael effaith, fodd bynnag, gan fod amllder a graddfa'r crychio yn ymddangos yn debyg i'r rheolydd, mae'n annhebygol. Mae'r un peth yn berthnasol i'r grwpiau PLGA-10Tz a PLGA-30Tz. Er bod crychio trwm yn bresennol, mae'n ymddangos ei fod yn debyg i'r hyn a welir yn y rheolydd ac nid oes unrhyw wahaniaeth amlwg yn y math a welir. Yn ogystal, mae'r crychio sy'n bresennol yn y celloedd hyn yn amlwg ar unwaith o ddechrau'r delweddu ac mae'n parhau yn yr ardaloedd hyn yn unig, heb i unrhyw safleoedd crychu a chwyddo newydd ddod i'r amlwg dros gyfnod y driniaeth. Gyda'r PLGA-50Tz mae yna ymateb posibl i'r NGau ond mae'n anodd ei bennu. Ar yr amser o tua 4 munud gellir gweld crychio eithafol yn y cell

isaf. Fodd bynnag, wrth i'r hon symud yn weithredol dros gyfnod y driniaeth, mae'n anodd pennu a yw'r crychu eithafol hwn o ganlyniad i ddwy ardal ddeinamig arbennig o bilen plasma'r gell hon yn cael eu dwyn ynghyd, a thrwy hynny greu rhanbarth mwy gyda gweithgaredd cynyddol.



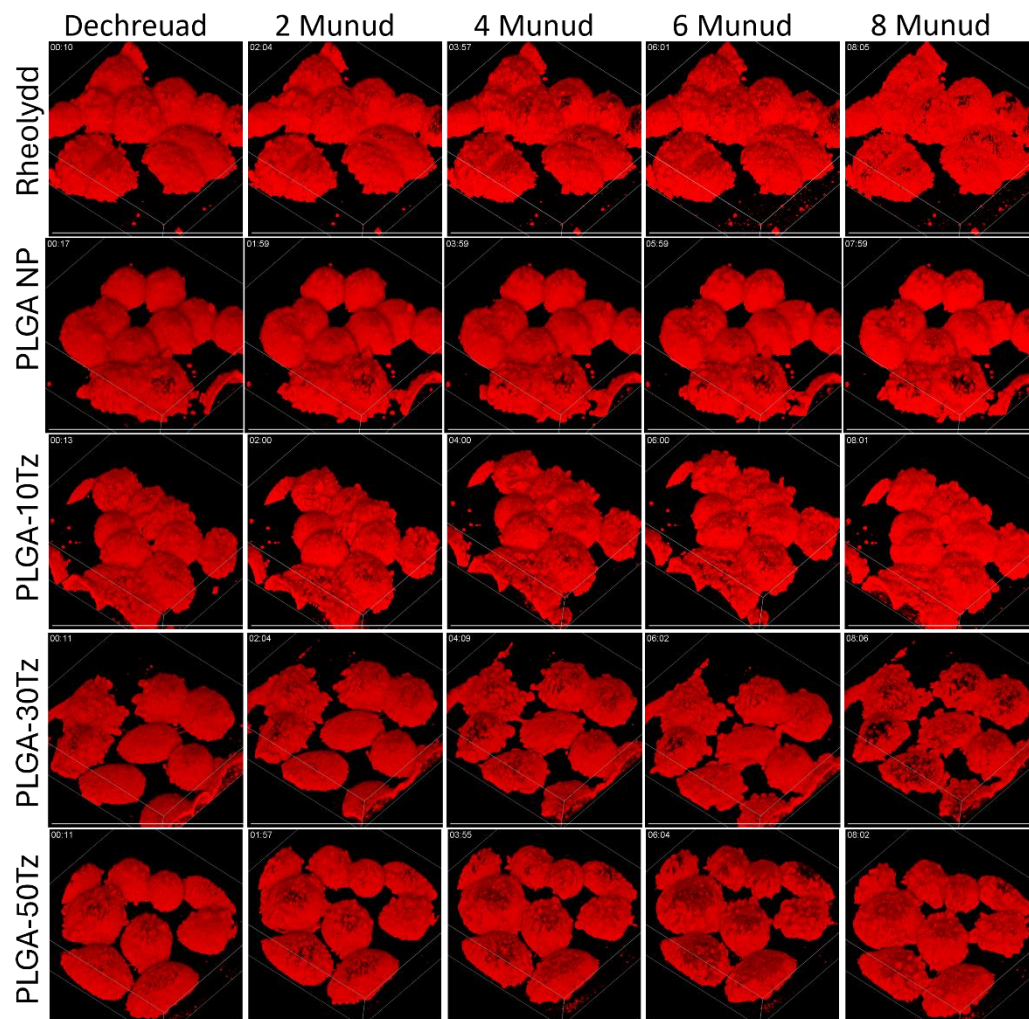
Ffigur 5-29: Celloedd MCF7 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen plasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Saethau yn dangos crychu.

Yn anffodus, fodd bynnag, byddai'r dull blaenorol a ddefnyddiwyd i fesur y crychio dros un plân ffocal yn anaddas gyda'r mesur dros y set ddata hon. Oherwydd natur 3D y crychio, ni fydd unrhyw ailfodelu pilen plasma ar ben y gell gyda crychau sy'n ymestyn i fyny yn cyfrannu at gyfanswm arwynebedd y celloedd o fewn tafluniad mwyaf y

pentyrrau-z. Yn ogystal, oherwydd y gwahaniad rhwng y sleisys gyda'r pentwr-z, byddai angen rhywfaint o ryngosod gyda'r dadansoddi. Mae hefyd yn bwysig nodi, oherwydd y drifft ffocal, er bod cyfanrwydd y gell yn cael ei dal, y bydd y rhan o'r pentwr-z sy'n ei chynnwys yn symud wrth i'r plân ffocal symud. Gyda'i gilydd, roedd yr heriau hyn yn ei gwneud hi'n anodd mesur effaith y crychio dros y celloedd yn ddibynadwy.

5.7 Prosesu Pellach

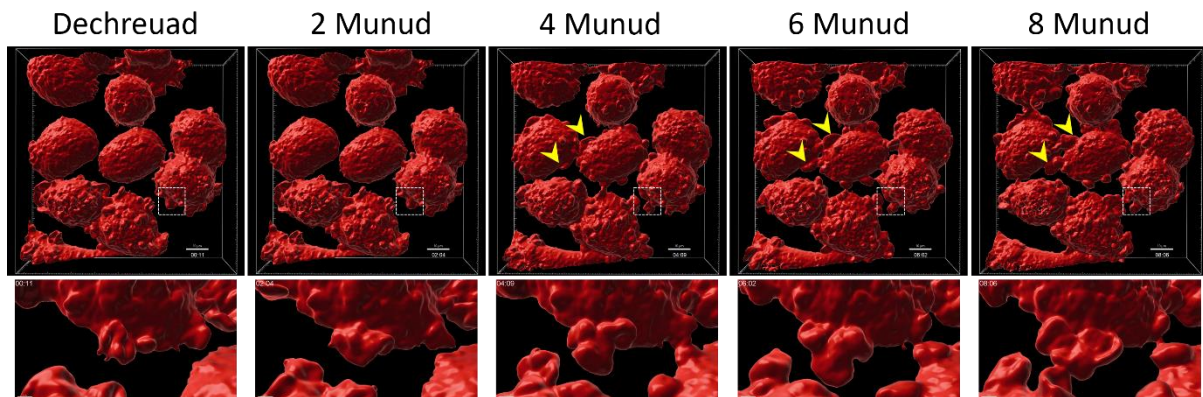
Ar ôl casglu'r crychio mewn 3D, penderfynwyd geisio optimeiddio'r data ymhellach i geisio arddangos y bilen plasma yn fanylach. O optimeiddio'r data PLGA-30Tz gyda'r celloedd SKBR3, mae topograffeg y celloedd yn fwy amlwg ar unwaith ac mae'r crychio'n fwy amlwg (Ffigur 5-34). Fodd bynnag, i wneud hyn, roedd angen cynyddu'r disgleirdeb i lefelau llawer uwch, nad oedd yn bosibl ei gyflawni gyda'r celloedd MCF7, BT474 a Clone5 gan ei fod hefyd yn rhoi gormod o gynnydd i'r cefndir ac yn lleihau'r cymhareb signal i sŵn. Gyda'r setiau data hyn, er bod y bilen yn amlwg yn 2D, nid oedd y signal a recordiwyd yn ddigonol i brosesu'r data yn y modd hwn. Gyda'r dechneg hon, gan mai dim ond yn unigol y gellir dal fframiau, nid oedd yn caniatáu gwyllo'r recordiad, sy'n rhoi gwell arwydd o ymddygiad celloedd.



Ffigur 5-30: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau a'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud.

Gan gydweithio â'r Athro Pete Watson a Dr Anthony Hayes yn yr Ysgol Fiwyyddorau roedd modd defnyddio'r feddalwedd Bitplane Imaris i lwytho'r data or arbrofion cynt a rendro'r celloedd oedd yn ei dro yn caniatáu i ni edrych ar y celloedd ar lefel llawer uwch o fanylder a hefyd cadw'r gallu i weld newidiadau dros amser (Ffigur 5-35). Unwaith eto, ddadansoddwyd y set ddata PLGA-30Tz o fewn celloedd SKBR3 oherwydd lefel y gweithgaredd a welwyd yn y celloedd hyn. Mae'n amlwg iawn gweld bod defnyddio'r feddalwedd Imaris yn caniatáu arddangos y crychio ar lefel o fanylder nad oeddem yn gallu ei gwneud o'r blaen ac yn ogystal, roedd yn bosibl canolbwyntio ar rai

ardaloedd o'r gell a delweddu sut mae'r crychau'n ffurfio'n ddeinamig. Yn anffodus oherwydd cyfyngiadau amser ac arian roedd ddim modd i brosesu'r data ar gyfer y gweddill o'r celloedd.

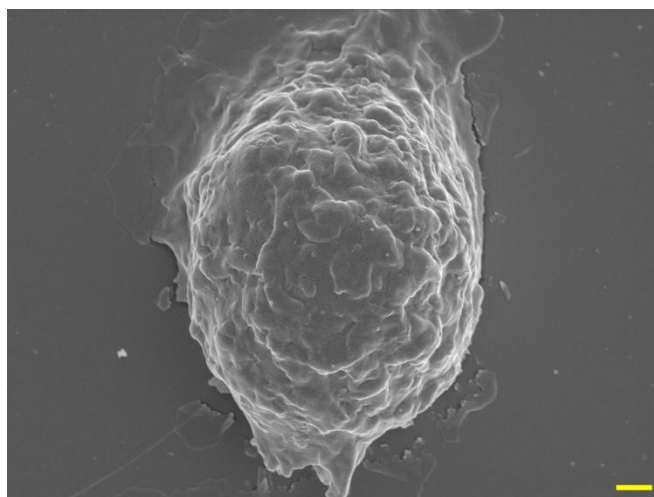


Ffigur 5-31: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau PLGA-30Tza'u delweddu am 10 munud. Dangosir yn 3D actifedd y bilen blasma dros cyfnodau pob 2 funud hyd at 8 munud. Dynodir yr ardal wedi chwyddo gan bocs gwyn. Bar Raddfa 10µm

5.8 Defnyddio Microsgopeg Electron Sganio (MES) i archwilio

strwythur yr crychau dros y bilen blasma

Ar ôl delweddu ffurfiant yr amrywiol allwthiadau yr oedd y NGau'n gyfrifol amdanynt dros y llinellau celloedd, penderfynwyd cynnal dadansoddiad pellach ar lefel uwchstrwythurol trwy ddefnyddio MES. Roedd ymchwil gorffennol gan Wymant *et al* wedi dangos fod groescysylltu'r HER2 drwy defnyddio streptavidin a Tz wedi biotinyleiddio yn achosi i crychau mawr yn digwydd (3). Gwnaed yr ymchwiliadau cyntaf i effaith rhwymo NGau gyda NGau dirlawn llawn ar ôl 5 awr o driniaeth dros pob llinell gell. O'r astudiaethau fflwroleuol gellir gweld strwythurau tebyg i chwyddiadau dros wyneb pob llinell gell HER2+ gyda'r effaith hon yn absennol yn MCF7. Fodd bynnag, roedd yn amlwg ein bod ni'n brin o fanylion wrth archwilio'r bilen ac na ellid gwahaniaethu unrhyw ficrofili unigol ac ati. Oherwydd hyn, addaswyd y protocol i gynnwys golchiadau ethanol fel bod y celloedd yn cael eu dadhyradu'n fwy graddol.

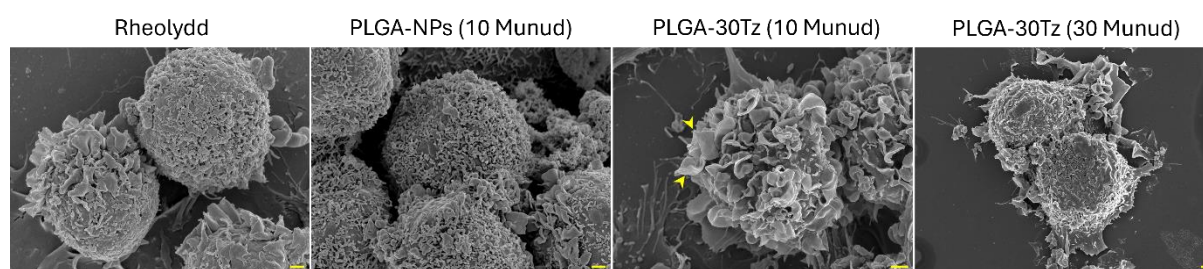


Ffigur 5-32: Cell SKBR3 ar ôl y broses dadhyradu gwreiddiol. Gwelir diffyg manylder ar draws wyneb y gell. Bar Raddfa 1µm

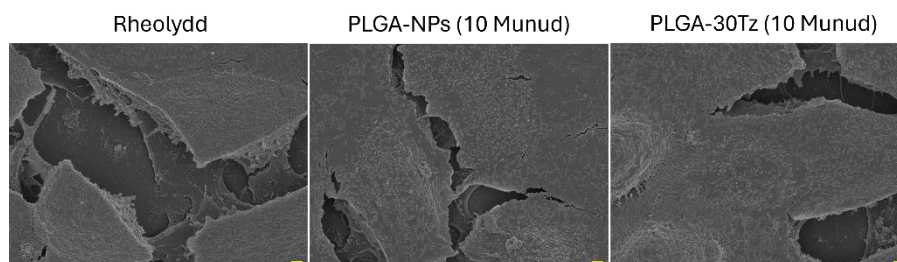
O ddefnyddio'r protocol newydd roedd manylion uwchstrwythurol dros wyneb y gell yn llawer mwy amlwg. Fodd bynnag, ar ôl dadansoddi'r delweddau newydd hyn, nid oedd unrhyw crychau'n weladwy dros wyneb y gell. Fodd bynnag, yn dilyn y mewnwelediadau o'r arbrofion CellMask, fe penderfynwyd lleihau'r amser triniaeth gyda NGau yn fawr o 5 awr i lawr i 10 munud. Yn ogystal, rhoddwyd orau i ddefnyddio'r NGau wedi'u dirlawn â Tz ac yn lle hynny astudio PLGA-30Tz gan fod y rhain wedi ysgogi'r ymateb cryfaf gan y celloedd allan o'r arbrofion wedi cynnal i'r pwynt yma. Am resymau tebyg canolbwyntwyd yn gyntaf ar gelloedd SKBR3 gan mai'r rhain ddangosodd yr ymateb mwyaf i'r NGau. Gan ein bod ni yn ffigyrau 5-30 i 5-35 wedi rhoi'r gorau i'r delweddu fflwroleuol ar ôl 10 munud, penderfynwyd cynnwys amser 30 munud i fesur oedd crychau a welwyd yn parhau am fwy na 10 munud.

Dros wyneb y celloedd rheoli roedd nifer o strwythurau gwahanol i'w gweld yn amlwg ac yn arddangos fel crychau a microfili (Figwr 5-37). Ar ôl delweddu'r celloedd a gafodd eu trin am 10 munud, daeth y crychau yn llawer mwy amlwg, gan gynyddu i fod o faint micron a mwy mewn rhai achosion. Yn aml, roedd y rhain yn ymddangos dros wyneb y gell fel crychau tebyg i betalau gydag wynebâu llydan neu fel troeon allan oddi wrthynt eu hunain. Er eu bod yn bresennol dros nifer sylweddol o gelloedd, nid oedd y strwythurau hyn i'w gweld ymhob un. Yn ddiddorol, pan archwiliwyd y celloedd a oedd wedi'u gosodi ar ôl 30 munud, datgelwyd bod yr ailfodelu helaeth o'r bilen plasma yn ymddangos fel pe bai'n dros dro gyda'r ymwithiadau maint micron hyn yn diflannu i raddau helaeth rhwng 10 a 30 munud. Fodd bynnag, roedd y crychau yn y celloedd hyn yn ymddangos ychydig yn fwy na'r grŵp rheoli, ac yn ogystal, er bod y gweithgaredd a

welwyd wedi tawelu, roedd y celloedd eu hunain yn ymddangos mewn cyflwr o adferiad ac yn edrych yn fwy annaturiol o'i gymharu ar grŵp rheoli. Yn dilyn hyn, cynhaliwyd dadansoddiad pellach i gymharu ag effaith NGau heb eu haddurno ar ôl 10 munud, fodd bynnag, am gymysgedd o resymau technegol ac ymarferol, gwnaed y dadansoddiad hwn ar y celloedd SKBR3 a'r celloedd MCF7 yn unig (Ffigur 5-38).



Ffigur 5-33: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau am 10 neu 30 munud cyn eu gosodi a delweddu gyda SEM. Bar Raddfa 1µm

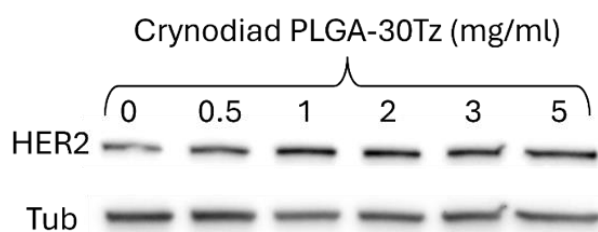


Ffigur 5-34: Celloedd MCF7 wedi cael eu trin gyda 500µg/ml NGau am 10 munud cyn eu gosodi a delweddu gyda SEM. Bar Raddfa 1µm

O fewn celloedd SKBR3, o'u cymharu â'r rheolydd, ymddangosai fod cynnydd mewn crychio a chwyddo fel ymateb i'r NGau PLGA. Wrth gymharu celloedd a gafodd eu trin â'r PLGA-30Tz hefo'r rheolydd, roedd llawer fwy o crychau i'w weld ac o faint mwy. Unwaith eto, gellid gweld ardaloedd o gelloedd heb eu heffeithio. Dros y celloedd MCF7, ymddengys nad oes unrhyw effaith nodedig gan y NGau o gwbl.

5.9 Effaith y NGau ar mynegiant HER2 mewn celloedd SKBR3

Gwnaethpwyd ddadansoddiad blotio Western i asesu a oedd newid y falens yn effeithio mynegiant HER2 wedi i'r celloedd gael ei trin â'r NGau. Yn dilyn y canlyniadau blaenorol yn y pennod diwethaf, cynyddwyd yr amser triniaeth NGau o 7 awr i 24 awr. Er gwaethaf hyn, fodd bynnag, roedd y canlyniadau'n debyg heb unrhyw effaith ar fynegiant HER2 yn amlwg yn y llinellau cell (Ffigur 5-39). Er mwyn sefydlu a oedd y rheswm dros y diffyg effaith ar fynegiant oherwydd bod crynodiad y NGau a weinyddir yn annigonol, cafodd celloedd SKBR3 eu trin ag ystod crynodiad cynyddol o NGau PLGA-30Tz yn amrywio o 0-5mg/ml am 24 awr. Er gwaethaf y newid hwn, ni welwyd unrhyw ostyngiad mewn HER2 yn unrhyw un o'r grwpiau triniaeth. Eto gan nad oedd unrhyw dystiolaeth fod y NGau-Tz yn cael effaith amlwg ar fynegiant HER2 penderfynwyd symud ymlaen yn y cyfnod hwn i astudio ei heffaith fel NGau yn cynnwys Dox, ar hyfywdra'r celloedd gwahanol.

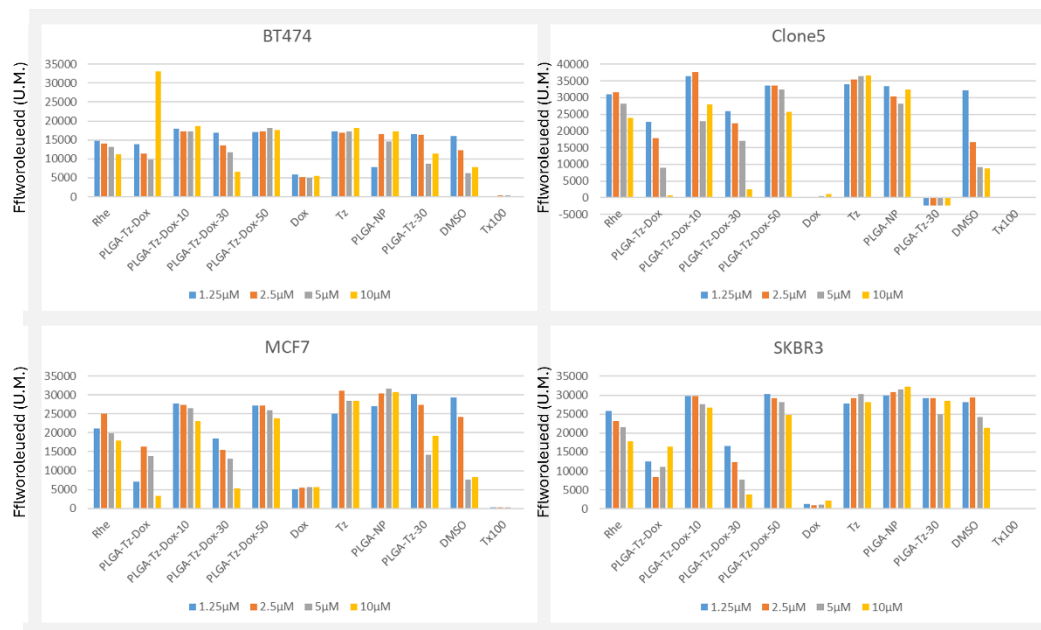


Ffigur 5-35: Mynegiant HER2 mewn celloedd SKBR3 ar ôl cael eu trin gyda crynodiadau gwahanol o NGau am 24 awr. Defnyddir Tiwbwlîn (Tub) fel yr rheolydd llwytho i ganiatau i ni allu normaleiddio'r mynegiant HER2 er mwyn i'w gymharu ar draws y crynodiadau wahanol

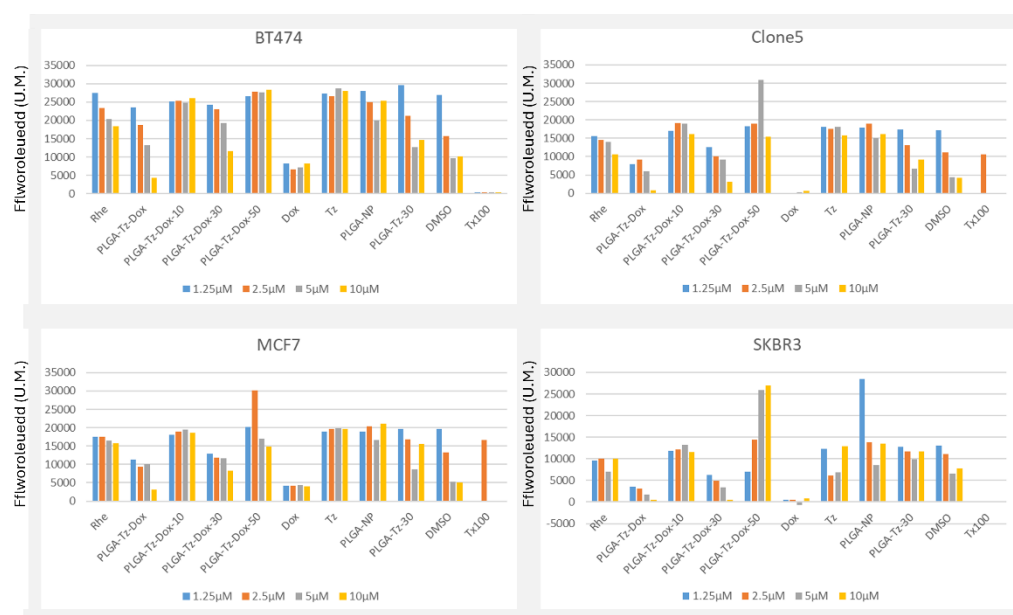
5.10 Effaith falens PLGA-Dox-Tz ar hyfywdra celloedd

Yma roedd hi'n bwysig dadansoddi pa mor effeithio oedd y NGAu PLGA a PLGA-Tx ar gludo Dox i'r gell ac achosi disgyn mewn hyfywdra. Wrth sefydlu'r paramedrau arbrol, fodd bynnag, roedd hi'n anodd penderfynu ar yr amseroedd gyda'r arbrawf. Roedd hyn oherwydd yr angen : [1] i'r NGau ddiraddio o fewn y celloedd, [2] i'r dox gyrraedd crynodiad therapiwtig a [3] gyfryngu eu effeithiau cytotocsig. Yn gyntaf, tyfwyd celloedd mewn plâtiau clir 96 ffynnon o wahanol ddwyseddau i sefydlu pa rai o'r boblogaeth rheoli fyddai a cydlifiant o tua 70% erbyn diwedd yr arbrawf. Canfuom fod dechrau'r arbrawf gyda 5000 o gelloedd/ffynnon yn rhoi y canlyniadau oedd ei angen i symud ymlaen [data heb ei ddangos].

Yn gyntaf caniatwyd i'r celloedd dyfu am 72 awr cyn cyfnod triniaeth o 24 awr. Wedi hynny, ychwanegwyd yr adweithydd *CellTiter Blue* (CTB) at y ffynhonnau a mesurwyd y fflwroleuedd ar ôl 4 awr. Yn annisgwyl braidd, adroddodd y grŵp rheoli am yr hyfywedd isaf dros y samplau a arweiniodd i ni gymryd cam yn ôl . Unwaith eto, fe wnaethon ni tyfu sawl dwyseddau celloedd am 72 awr cyn ychwanegu cyfrwng ffres ac yna ar ôl 24 awr arall, ychwanegwyd yr adweithydd CTB ar wahanol gyfrolau i'r ffynhonnau. Er bod y gwneuthurwr yn argymhell ychwanegu cyfaint o 20µl fesul 100µl yn ffynhonnau , gwelsom mai 10µl oedd orau i osgoi gostyngiad signal o fewn y celloedd rheoli. Yn dilyn hyn, ailadroddwyd yr prawf 24 awr ar ôl y driniaeth er fod y canlyniadau'n amrywiol iawn ar draws y NGau, doedd fawr o ostyngiad yn hyfywedd y celloedd (Ffigyrau 5-40, 5-41). Yn ogystal, er bod y rheolaeth Tx100 yn dangos fod yr prawf yn gweithio roedd y darlleniadau o'r Dox rhydd (hynny yw heb NGau) yn llawer uwch na'r disgwyl. Penderfynwyd ddiwygio'r pwyntiau amser cyffredinol gyda'r twf a thriniaeth.

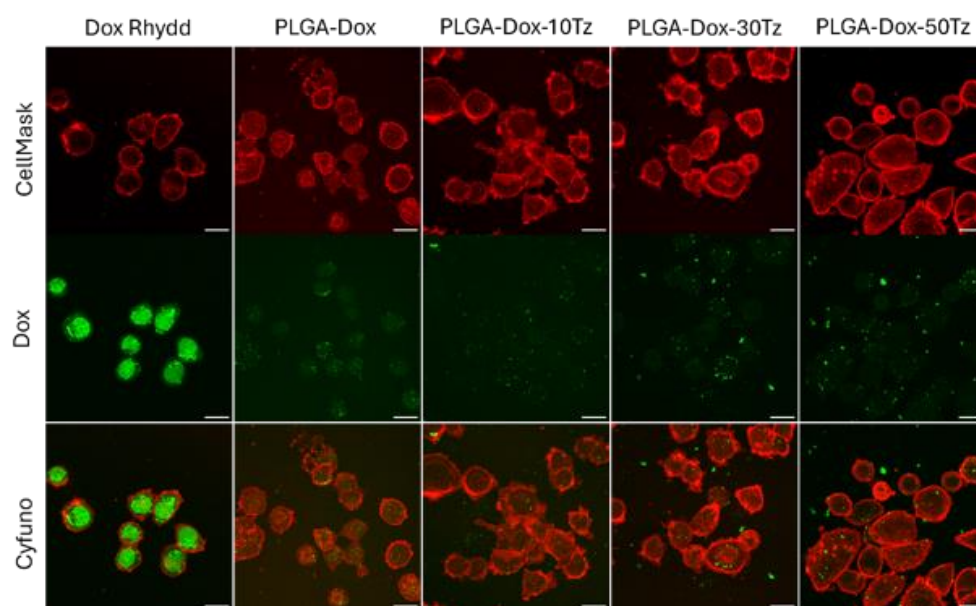


Ffigur 5-36: Hyfywdra modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol driniaethau am 24 awr. Dangosir yr ailadroddiad cyntaf. Dox = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Tz-Dox-50), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100



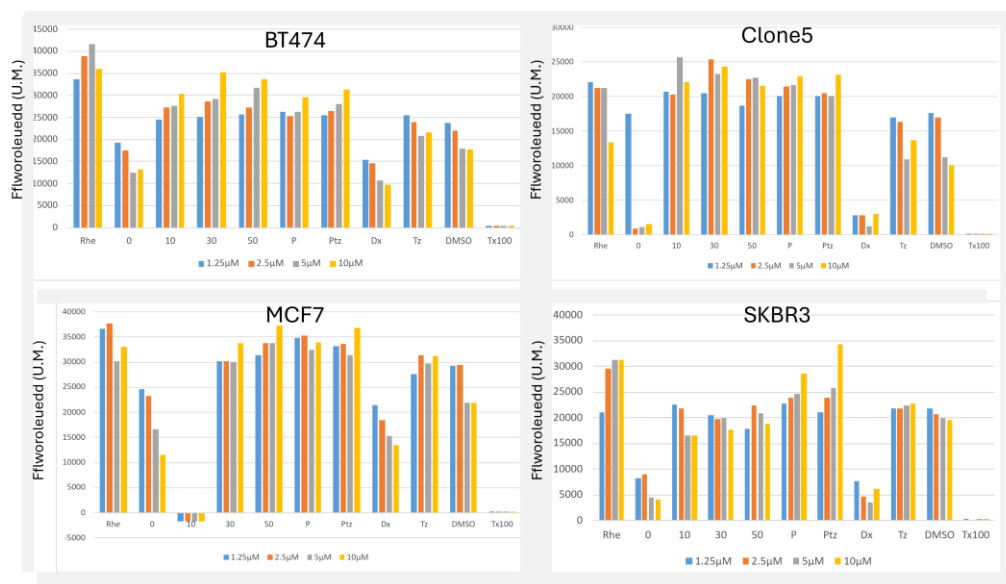
Ffigur 5-37: Hyfywdra modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol driniaethau am 24 awr. Dangosir yr ailadroddiad. Dox = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Tz-Dox-50), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100

Canfu delweddu a gynhaliwyd ar ôl 24 awr o fewn celloedd SKBR3 fod signal cryf yn dod o'r niwclews gyda'r Dox rhydd nad oedd yn bresennol yn y grwpiau triniaeth eraill. Er bod y triniaethau NGau i'w gweld fel pe baent wedi'u mewnnoli, naill ai nid oeddent wedi'u diraddio neu roedd crynodiad annigonol o Dox wedi'i ddanfôn (Ffigur 5-42).



Ffigur 5-38: Celloedd SKBR3 wedi cael eu trin gyda 10 μ M Dox rhydd neu'r gywerth o NGau PLGA-Dox am 24 awr. Bar raddfa 20 μ m

Arweiniodd hyn at newid dulliau yn methodoleg yr arbrofion hyfywdra i ymgorffori cyfnod twf 48 awr ac yna cyfnod triniaeth 48 awr, hynny yw i ganiatáu i Dox gronni o fewn y gell ac i ganiatáu mwy o amser i'r Dox rhydd cyfryngu ei effaith therapiwtig lawn. Roedd y canlyniadau gyda'r paramedrau hyn unwaith eto'n amrywiol iawn gydag ymatebion gwahanol iawn i'r Dox rhydd i'w gweld rhwng llinellau celloedd (Ffigyrau 5-43, 5-44). Ymddengys bod celloedd SKBR3 a Clone5 yn fwy sensitif i Dox na'r BT474 a'r MCF7. Yn ogystal, mae'n ymddangos bod effeithiolrwydd y triniaethau NGau i leihau'r hyfywdredd hefyd yn amrywio, gan ddangos effeithiau negatif yn y celloedd BT474 ac SKBR3 a dim yng nghelloedd MCF7 a Clone5, er oherwydd gwall trin ni ychwanegwyd unrhyw adweithydd CTB at golofn PLGA-10Tz y plât MCF7 yn ffigur 5-43.



Ffigur 5-39: Hyfywdra ein modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol triniaethau am 48 awr. Dangosir yr ailadroddiad cyntaf. Rhe = Rheolydd, 0 = NGau PLGA-Dox, 10 = PLGA-Dox-10Tz, 30 = PLGA-Dox-30Tz, 50 = PLGA-Dox-50Tz, P = NGau PLGA, Ptz = NGau PLGA-Tz, Dx = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Dox-50Tz), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100

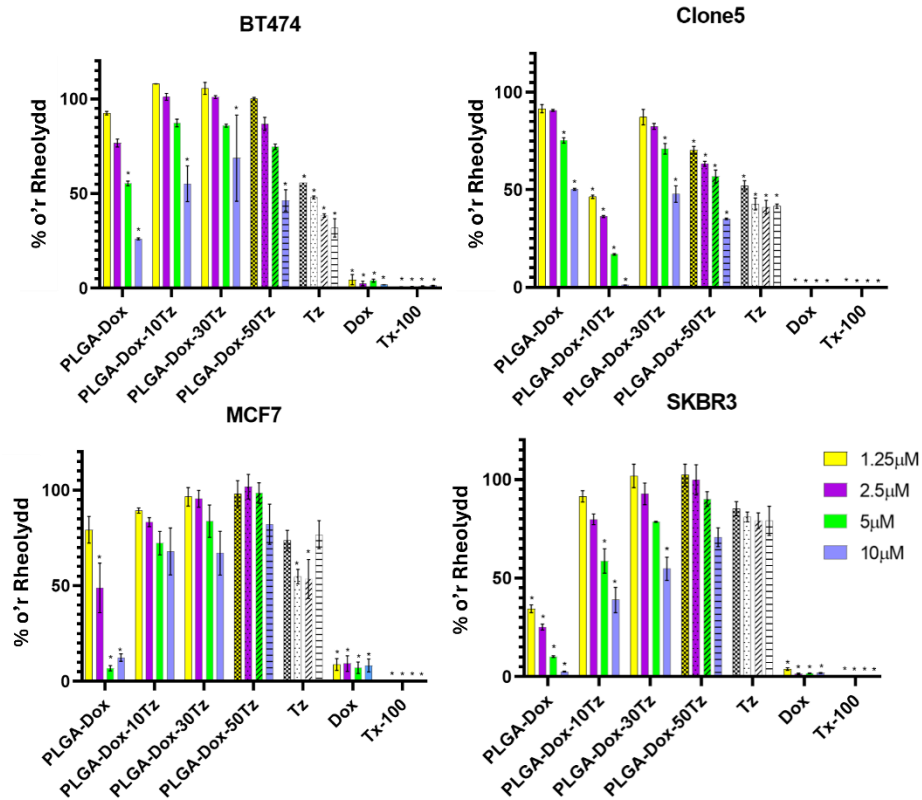


Ffigur 5-40: Hyfywdra ein modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol triniaethau am 48 awr. Dangosir yr ail ailadroddiad. Rhe = Rheolydd, 0 = NGau PLGA-Dox, 10 = PLGA-Dox-10Tz, 30 = PLGA-Dox-30Tz, 50 = PLGA-Dox-50Tz, P = NGau PLGA, Ptz = NGau PLGA-Tz, Dx = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Dox-50Tz), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100

Oherwydd yr anghysondebau yn y canlyniadau, yn enwedig o ran cytotocsinedd y Dox rhydd, penderfynwyd unwaith eto ymestyn y cyfnod triniaeth am 24 awr ychwanegol. Er mwyn caniatáu digon o amser i'r celloedd setlo ac ymaddasu ar ôl hau, cadwyd y cyfnod twf yn 48 awr ac yn lle hynny ymestyn cyfanswm hyd yr arbrawf i 5 diwrnod. Ar ôl gwirio na fyddai'r celloedd yn mynd yn rhy niferus, cadwyd y dwysedd hau fel 5000 cell / ffynnon. Yn ogystal â atal ymyrraeth gan unrhyw un o'r triniaethau ac i gadw amodau'n gyson dros y cyfnod CTB, cafodd y ffynhonnau eu gwagio cyn ychwanegu 110µl o doddiant CTB (100µl o gyfryngau, 10µl o CTB) fel arall cadwyd yr holl bamedrau. Cafodd y rheolaeth DMSO ei hepgor am resymau a fydd yn cael eu hehangu yn y drafodaeth isod.

Ar ôl gwirio bod y Dox rhydd yn gallu cyfryngu effaith therapiwtig cryf, penderfynwyd gynhyrchu dyblygiadau fel y gellid cynnal dadansoddiad ystadegol (Ffigur 5-45). Gyda'r celloedd BT474, dangosodd y PLGA-Dox 5µM a 10µM wenwyndra arwyddocaol a'r rhain

ddangosodd yr effaith gryfaf ar hyfywedd celloedd. Yna dilynwyd hyn gan y PLGA-Dox-50Tz > PLGA-Dox-10Tz > PLGA-Dox-30Tz, a ddangosodd effaith ystadegol arwyddocaol yr holl bwyntiau 10µM. Yn ddiddorol, dangosodd y Tz effaith ystadegol arwyddocaol is ym mhob crynodiad a brofwyd. O ran celloedd Clone5, roeddent yn dilyn tuedd gwahanol gyda'r PLGA-Dox-10Tz yn ymddangos fel y triniaeth fwyaf grymus, gan ddangos effaith arwyddocaol is ym mhob crynodiad a brofwyd (Ffigur 5-45). Dim ond ar grynodiad 5µM a 10µM y cynhyrchodd y PLGA-Dox effaith ystadegol y tro hwn. Roedd yr effaith hon yn gyfartal â'r hyn a gynhyrchwyd gan y PLGA-Dox-30Tz a ddangosodd arwyddocâd yn yr un crynodiad. Yn eithaf annisgwyl, dangosodd y Tz effaith arwyddocaol unwaith eto ym mhob crynodiad a brofwyd, gan gael effaith debyg ar hyfywedd celloedd i'r hyn a welwyd yn y celloedd BT474. Gyda'r celloedd SKBR3, y grŵp NGau mwyaf grymus oedd y PLGA-Dox, gan ddangos effaith arwyddocaol ym mhob crynodiad a brofwyd (Ffigur 5-45). Yn dilyn hyn, y duedd gyffredinol yw bod cynyddu'r falens yn lleihau effeithiolrwydd y cyflenwad dox, gyda'r PLGA-Dox-10Tz yn cael effaith arwyddocaol ar grynodiad o 5µM a 10µM o'i gymharu ag effaith arwyddocaol ar 10µM yn unig gyda'r PLGA-30Tz, a dim effaith arwyddocaol gyda PLGA-Dox-50Tz. Y tro hwn, ni chynhyrchodd y Tz effaith arwyddocaol dros y llinellau celloedd. Yng nghelloedd MCF7, mae'r PLGA-Dox yn cynhyrchu effaith arwyddocaol ar grynodiad 2.5µM, 5µM a 10µM gan ei wneud y grŵp NGau mwyaf grymus; doedd gan y NGau-Tz ddim effaith arwyddocaol ar unrhyw ddos (Ffigur 5-45). Yn annisgwyl roedd effaith y Tz yn ystadegol arwyddocaol is ar grynodiad 2.5µM a 5µM. Ar y cyfan, mae'r canfyddiadau'n awgrymu, er bod y PLGA-Dox wedi cynhyrchu effaith arwyddocaol dros pob llinell gell a bod y weithred o addurniad Tz yn rhoi effaith wenwyndra dethol heb unrhyw effaith arwyddocaol gan y NGau PLGA-Tz yn y celloedd MCF7.



Ffigur 5-41: Hyfywdra ein modelau cell ar ôl cael derbyn gwahanol triniaethau am 72 awr. Dangosir y canlyniadau am 3 ailadroddiad wedi normaleiddio. Dynodir y bariau cyfeiliornad safonol o'r cymedr. Mae'r sêr yn arwyddocâd o wahaniaeth arwyddocaol i'r rheolydd. Dox = Doxorubicin, Tz = Trastuzumab (gywerth i'r nifer yn PLGA-Dox-50Tz), DMSO = Dimethyl Sulfoxide (gywerth i cyfaint o'r Dox) a Tx100 = Triton-X 100

5.11 Trafodaeth

Mae'r llenyddiaeth yn adrodd fod grwpiau eraill wedi ymchwilio i effeithiau croesgysylltu Her2 ac fel y soniwyd yn flaenorol, defnyddiodd Weisser et al. wrthgorff deubaratopig i dargedu dau barth gwahanol o'r derbynnydd HER2 ar yr un pryd i hwyluso'r effaith croesgysylltu (8). Fodd bynnag, yn ogystal â'r arbrofion a drafodwyd yn flaenorol ynghylch yr effaith ar fynegiant HER2, gwnaethant hefyd gynnal ymchwiliadau i effaith y gwrthgyrff ar bilen y gell. Mae'r ymchwiliadau hyn ar adegau cynnar iawn, sef 5, 15 a 30 munud ar ôl y driniaeth, yn dal ffurfiant 'capiau' neu 'ficroglystyrau' dros wyneb y gell. Gan ddangos delweddau microsgopeg gydffocal, mae'r awduron yn cofnodi bod y strwythurau hyn yn weladwy ar ôl 5 munud ac yn parhau hyd at y pwynt amser 15 munud. Wedi hynny, ar y pwynt amser 30 munud, mae'n ymddangos eu bod wedi ad drefnu yn ôl i'r normal. Mae tebygrwydd yma i'r data yn y traethawd hwn gyda'r dechneg MES ac yn cadarnhau ein canfyddiadau bod y strwythurau a ffurfiwyd yn rhai dros dro eu natur. Yn ddiddorol, roedd y dull croesgysylltu hwn yn fwy effeithiol na defnyddio Tz a pertuzumab (Pz) ochr yn ochr, er bod rhaid nodi bod yr awduron wedi defnyddio crynodiad gwrthgyrff uchel iawn (200nM) i gyflawni'r effeithiau hyn. Er mai dim ond ar un plân ffocal y gwnaed eu delweddu, gwnaethant gynnal microsgopeg uwch-gydraniad dSTORM i ddal dosbarthiad HER2 dros wyneb y gell. Gan ddefnyddio'r dechneg hon, gellir dangos bod y croesgysylltu wedi arwain at glystyru HER2 llawer mwy effeithiol nag a welir gyda monotherapiau ac yn wir gyda'r driniaeth Tz Pz ddeuol.

Mae astudiaethau eraill wedi archwilio effeithiau falens ar alluoedd NGau i gludo cyffuriau i gelloedd cancer . Er enghraifft, astudiodd Radford et al mewn celloedd HER2+ cancer yr ofari sut y byddai newid falens cyfuniadau cyd-bolymerau N-(2-

hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA)-affigorff (peptid) yn effeithio ar rwymo a chyflenwi paclitaxel (2). Gan eu bod yn defnyddio peptid yn hytrach na gwrthgorff lawn i dargedu, mae'n llawer llai tebygol y bydd wedi'i gyfeirio'n anghywir o'i gymharu â'r gwrthgyrff gan fod yna llai o safleoedd cyfuno, sy'n roi syniad mwy cywir o effaith newid falens. Darganfuwyd fod falens peptid isel ddim yn perfformio cystal o safbwynt danfon cyffuriau, a'r falens uchel yn dangos llawer mwy o effeithiolrwydd hyd at ryw raddau. Wedi pasio pwynt penodol Peptid:NGau, darganfuwyd fod cynyddu'r falens yn arwain at rwymo mwy aneffeithlon a oedd hefyd yn cyd-fynd â chynnydd mewn rhwymo amhenodol. Effaith hyn oedd, yn ogystal â lleihau effeithiolrwydd rwymo i'r celloedd a dargedwyd, bod y gronynnau mwy addurnedig hefyd wedi colli rhywfaint o'u penodolrwydd, gan arwain at fwy o rwymo o fewn targedau celloedd nad oedd yn gorfynegi HER2. Cadarnhaodd gwaith pellach fod y falens a ddangosodd y rhwymo orau hefyd yn dangos y lefel uchaf o gyflenwi cyffuriau dros gyfnod o 24 awr, yn llawer mwy grymus na'r NGau heb eu haddurno (2). Er bod y NGau hyn yn llawer llai na'n rhai ni (diamedr o 6-13nm), ac o ganlyniad maent yn defnyddio falensau llai (0-10), mae'n dangos y rhesymeg dros ymchwilio i'r fanteision a risgiau newid y falens all effeithio a'r ei effeithiolrwydd i gludo cyffuriau. Credai'r awduron fod cynyddu'r falens yn rhoi fwy o allu i gyfyngu croesgysylltu HER2 hyd at bwynt, lle mae'n debygol bod y rhwystr steurig yn cyfyngu ar ei effeithiolrwydd. O ran NGau PLGA-Tz yn y traethwd hwn, gallai hyn esbonio pam y gwelir mwy o crychu yn y celloedd SKBR3 gyda'r PLGA-30Tz o'i gymharu â'r PLGA-50Tz. Yn ogystal, er bod yr effaith a welwyd yn benodol i gelloedd SKBR3, ymddengys, o fewn y llinellau gell o leiaf, o'r data hyfywedd mai'r NGau sydd wedi'u haddurno â llai o rwymo sy'n perfformio orau o ran cyflenwi cyffuriau'n llwyddiannus a cyfyngu marwolaeth y celloedd.

O ran effaith cynyddu falensau dros NGau, adroddwyd bod yr effaith a'r budd yn y pen draw yn amrywio ac yn dibynnu ar y ligand addurno sy'n cael ei ddefnyddio. Sefydlood astudiaethau Cyseiniant Plasma Arwyneb (SPR) i gineteg rhwymo NGau wedi'u haddurno â gwahanol FK506 o wahanol falensau nad yw'r cynnydd mewn rhwymo NGau mor syml ag y byddai rhywun yn ei ddisgwyl (9). Bydd NGau sydd wedi'u haddurno â analog FK506 sydd ag affinedd gwannach yn gweld cynnydd sylweddol mewn rhwymo, ond nid yw'r effaith hon mor amlwg gyda'r NGau sydd wedi'u haddurno â ligand o affinedd uchel. Canfu Tassa et al hefyd, trwy newid falens y FK506, ei fod yn effeithio'n uniongyrchol ar gyfradd cysylltu'r NGau â'u targed, a gallai hyn, yn dibynnu ar y falens, arwain at lefel rhwymo ddigyfnewid, uwch neu hyd yn oed is o'i gymharu â'r ligand rhydd yn unig. Gan fod gan Tz affinedd uchel i'r HER2, mae hyn yn egluro'n rhannol pam y gallai pob llinell gell ymateb mor wahanol i'r NGau.

Mae'n bosibl, o ystyried y gwahaniaeth mewn lleoliad fflwroleuol rhwng y staenio SiR Actin a'r CellMask, y gallai'r gweithgaredd pilen a welir fod yn rhydd o actin, er na allwn fod yn sicr ar hyn. Gan fod y staenio SiR-Actin yn seiliedig ar jasplakinolid, asiant sefydlogi f-actin, mae'n bosibl bod y crychau newydd wedi'i ffurfio o g-actin na fyddai wedi'i staenio.

Ystyriwyd defnyddio NGau wedi'u haddurno â Tz fflwroleuol yn ystod yr arbrofion CellMask, ond oherwydd rhesymau technegol, cafodd hyn ei adael. Er yn ymarferol byddai'n syml i'w gynnwys a'u recordio yn ystod y cyfnod arbrofi, heb unrhyw effaith sylweddol ar baramedrau delweddu oherwydd y pellter rhwng copaon yr allyriadau. O safbwynt technegol, fodd bynnag, byddai hyn yn anodd iawn o ran dadansoddi'r delweddau. I alluogi delweddu'r gweithgaredd dros y celloedd yn llawn mewn 3D,

roedd angen recordio'r pentyrrau-z mor gyflym â phosibl am gyfnod o 10 munud.

Buasai'n anodd optimeiddio'r amodau delweddu gyda'r NGau fflwroleuol gan y byddai'r gwahanol falensau yn gofyn am eu paramedrau eu hunain, y prif gyfyngiad fyddai'r pŵer cyfrifiadurol fuasai ei angen i brosesu'r data a gafwyd. Roedd prosesu'r delweddau gydag un fflworoffor eisoes yn broses oedd yn defnyddio llawer o RAM, yn enwedig gyda rendro mewn 3D, felly penderfynwyd cadw ein ffocws ar y bilen blasma yn unig.

Gyda ein cais i drio mesur effaith y NGau yn meintiol rhaid nodi nad oes unrhyw atgynhyrchiadau gyda'r arbrawf felly ni ellir cynnal dadansoddiad ystadegol dyfnach. Yn ogystal, er ein bod wedi normaleiddio yn ôl arwynebedd, gallai greu rhagfarn yn y data lle bydd yr un graddau o grychio yn ymddangos i gael mwy o effaith mewn clystyrau llai oherwydd bod cyfanswm yr arwynebedd yn llawer llai gan arwain at y crychau yn cael mwy o ddylanwad ar y newid canrannol. Fe wnaethom ystyried defnyddio'r perimedr cyfan i normaleiddio yn lle hynny, fodd bynnag, byddai hyn wedyn yn rhoi mwy o bwyslais ar ruglo anwastad yn hytrach na chwyddiadau llyfnach a allai ymddangos.

I ddangos yn llawn yn union ble a phryd mae'r gwahanol crychio yn digwydd ar hyd y gell, mae gennym hefyd yr opsiwn o lliwio'r delweddau yn seiliedig ar amser. Mae hyn yn gweithredu'n debyg i dafluniad mwyaf, fodd bynnag, mae lliw'r crychau yn dangos pryd maen nhw'n ffurfio, sy'n ein galluogi i werthuso a yw'r amser a gymerir i ymateb ymddangos yn amrywio o gwbl rhwng llinellau celloedd. Trwy ddefnyddio technegau prosesu delweddau, gallwn ddelweddu'r crychu a'r chwyddiadau dros yr holl gelloedd hyn i roi gwell dealltwriaeth o'r digwyddiadau hyn o wybodaeth ofodol well.

Trafodwyd yn y bennod flaenorol sut y cynhaliodd Vanni et al (10) eu harbrofion yn archwilio effaith eu NGau ar ôl 72 awr ac 1 wythnos, ond doedd ei hastudiaeth ddim wedi ei gyhoeddi pan wnaed arbrofion y traethawd yma yn ymchwilio i fynegiant HER2 ar ôl i'r celloedd gael eu trin â'r NGau. Ar ôl adolygu'r pwyntiau amser a ddewiswyd yn yr astudiaeth hon a hefyd ystyried y data hyfywedd, gallai fod wedi bod yn fuddiol ystyried trin y celloedd am hirach i gael mesur o fynegiant HER2 a gwybodaeth oedd y NGau yn gwrthio'r derbynnydd i'r lysosomau. Canfodwyd bod y pwynt amser cynyddol wedi arwain at ostyngiad mwy mewn hyfywedd. Mae'n bwysig nodi unwaith eto fodd bynnag fod y pwynt amser 1 wythnos hwn ar yr ochr eithafol gyda'r rhan fwyaf o astudiaethau eraill yn dewis 72 awr fel uchafswm. Yn ogystal, mae hepgor llinell gelloedd rheoli yn ei gwneud hi'n anodd asesu penodolrwydd y driniaeth.

O ran y data yn defnyddio MES, mae'n ymddangos bod y strwythurau a gipiwyd gennym yn debyg iawn i'r ailfodelu pilen plasma a yrrir gan groesgysylltu HER2 a cyfryngir gan Tz oedd wedi ei biotinyleiddio a streptavidin yn ein gwaith blaenorol. (3). Yr effaith hon oeddem yn anelu at ei hail-greu trwy ddefnyddio platfform NGau a oedd yn caniatáu danfon Dox ar yr un pryd. Yn wir, roedd yn ymddangos bod y strwythurau a gipiwyd gennym dros celloedd SKBR3 yn dilyn yr un ffenoteipiau a nodwyd gan Wymant et al, sef y crychau pilen plasma dwys 'tebyg i betalau' a microfili oedd wedi'u lledu a gwastadu. Er na welsom unrhyw un o'r strwythurau hyn yn y celloedd MCF7, mae'r data hwn yn dal i godi rhai cwestiynau ynghylch beth yw'r ffordd orau o roi cyd-destun i'r canlyniadau ymhlith llinellau celloedd eraill. Mae'n amlwg ar unwaith bod celloedd SKBR3 a chelloedd MCF7 yn wahanol iawn i'w gilydd yn forffolegol, ac oherwydd y ffordd

oddrychol i raddau helaeth y mae delweddau'n cael eu dadansoddi, mae'n anodd cymharu'r effeithiau rhwng llinellau celloedd yn ddibynadwy. Er enghraifft, wrth gymharu'r grŵp rheoli dros y ddwy linell gell, maent yn wahanol iawn i'w gilydd yn forffolegol, gyda'r celloedd SKBR3 yn weladwy fel sfferau ac yn hawdd eu gwahaniaethu'n unigol, tra bod celloedd MCF7 yn tyfu fel llenni a'i gwneud yn anodd i'w gwahaniaethu'n unigol. Ar ben hynny, gan nad yw delweddu MES mor draddodiadol gysylltiedig â delweddu celloedd â thechnegau fflwroleuol, nid yw'r amrediad y data sydd wedi'i gynnwys yn y llenyddiaeth mor ddatblygedig. Mae'r ddau beth hyn yn ei gwneud hi'n anodd iawn cymharu effeithiau triniaethau penodol dros llinellau celloedd.

Y wir i'r ddamcaniaeth roedd y NGau-Tz wedi ysgogi ymateb cryf mewn y celloedd HER2+ o'i gymharu â MCF7. Fel y soniwyd yn flaenorol, oherwydd y gwahaniaeth yn mynegiant HER2, mae'n bosibl, hyd yn oed os bydd NGau'n rhwymo, nad oes adwaith croesgysylltu yn cael ei gynhyrchu i ysgogi'r cyrchio. Amcangyfrifir bod gan gelloedd SKBR3 tua $1-1.6 \times 10^6$ o dderbynyddion HER2 fesul cell, cynnydd o tua 33 gwaith ar y MCF7 HER2 isel (11,12).

Wedi dweud hynny byddem wedi hoffi cynnal dadansoddiad tebyg dros celloedd BT474 a Clone 5 wrth ehangu'r ystod o driniaethau i gynnwys PLGA-10Tz a PLGA-50Tz, yn enwedig o ystyried yr amrywiad a welwyd dros y llinellau celloedd o ran y gronynnau a ysgogodd yr ymateb cryfaf. Yn anffodus, fodd bynnag, fe wnaeth y gost a fyddai'n gysylltiedig â gwneud y gwaith hwn ein hatal rhag gwneud hyn.

Gyda'r data hyfywedd, penderfynwyd gwahardd canlyniadau'r rheolydd cerbyd DMSO o'r dadansoddiad terfynol. Y rheswm am hyn oedd, gan ddod yn fwyfwy amlwg ar ôl pob

dyblygiad, bod y canlyniadau'n anrhagweladwy ac y byddent yn amrywio'n fawr rhwng llinellau celloedd ac dyblygiadau heb unrhyw reswm amlwg. Roedd hyn yn annisgwyl o ystyried pa mor gyffredin yw DMSO o fel sylwedd hydoddi cyffuriau sydd yn aml yn hydroffobig. Yn wir, mae llenyddiaeth yn adrodd y gall DMSO fod yn wenwynig ar grynodiadau isel fel y defnyddiwyd yn y gwaith yma ($< 0.1\%$ v/v) Gwelodd Rodríguez-Burford et al amrywiadau yn eu hastudiaethau hyfywedd mewn celloedd canser yr ofari a arweiniodd at ymchwiliad pellach i natur yr amrywioldeb hwn dros linellau cell eraill (13). Canfodwyd bod effaith DMSO i bob golwg yn benodol i linellau cell gydag un o'u llinellau cell, Caov-3, yn cael ei effeithio'n drwm iawn gan DMSO gyda hyfywedd wedi'i gofnodi fel dros 160% i gymharu ag SKOV3 yn dangos ychydig iawn o effaith neu ddim effaith o gwbl OVCAR-3 yn dangos gostyngiad mewn hyfywedd. Yn ddigon rhyfedd, nid yw'r effeithiau hyn i'w gweld yn ddibynnol ar grynodiad y DMSO heb unrhyw duedd arsylwadwy yn y data hyfywedd rhwng 10mM ac 1 μ M. Yn fwy diweddar, ymchwiliodd Verheijen et al i'r effeithiau epigenetig sydd gan DMSO dros ystod eang o bwyntiau amser 2-336 awr (14). Er eu bod yn canolbwyntio'n bennaf ar feinwe'r galon a'r afu, fe darganfuwyd bod presenoldeb 0.1% v/v DMSO yn y cyfryngau twf yn ddigonol i ysgogi newidiadau dros mynegiant mRNA a miRNA o fewn dim ond 2 awr o'r driniaeth. Nodwyd fod genynnau sy'n rheoleiddio metaboledd, cludiant a gyfryngir gan fesiglau, ac ymateb cellog i straen wedi'u gostwng yn sylweddol, gyda llwybrau sy'n llywodraethu'r cylchred Krebs, cadwyn cludo electronau, cylchred celloedd ac atgyweirio DNA yn benodol wedi'u heffeithio fwyaf. O ystyried sut mae'r prawf CTB yn gweithredu trwy fesur y rhydwythiad o resazurin i resorufin, sydd, yn rhannol, yn cael ei cyfryngu gan y gadwyn cludo electronau, mae'r effeithiau hyn yn egluro rhywfaint o'r canlyniadau

ymddangosiadol ar hap gyda'r rheolaeth DMSO sydd yn cyfiawnhau hepgor y grŵp hwn o'r dadansoddiad terfynol.

O ystyried y triniaethau wedi'u cynnwys yng nghynllun yr arbrofion hyfywedd, fe wnaethom ystyried cynnwys NGau PLGA a PLGA-Tz i ddechrau, hynny yw, oedd yn rhydd o Dox. Yn ymarferol fodd bynnag, roedd cynnwys y ddau grŵp hyn yn anodd, ac yn y pen draw penderfynwyd yn erbyn hynny, am nifer o resymau. Roedd y gofod ar gael ar y plât yn ei gwneud hi'n anodd ymgorffori'r grwpiau hyn yn y dosau cyfatebol oedd eu hangen. Yn ogystal, gan fod y NGau sy'n cynnwys Dox i gyd wedi'u cynhyrchu o'r un paratoad, roedd yn caniatáu osgoi canlyniadau a allai fod yn rhagfarnllyd oherwydd nodweddion y NGau eu hunain. Gan y byddai angen cynhyrchu'r NGau PLGA a PLGA-Tz yn annibynnol o rhain, mae'n rhoi cyfle i naill ai PVA gweddilliol, gwahaniaethau ym maint y NGau neu botensial zeta ddylanwadu ar y canlyniadau.

Mae astudiaethau eraill yn adrodd delweddu'r bilen blasma mewn 3D e.e. i astudio newidiadau strwythurol yn ystod macropinocytosis, ond yn ddefnyddio microsgopeg dalen golau dellt (*lattice light sheet microscopy*) (15). Mae hon yn dechneg ddelweddu diweddar gyda'r papur cyntaf yn ddangos yn 2014 (16). O'i gymharu â microsgopeg gydffocal fwy traddodiadol, mae microsgopeg dalen golau dellt yn arwain at ostyngiad sylweddol mewn signal dros amser a ffotowenwyndra, gan ganiatáu i recordiadau amser-dros-amser gael eu cynnal am gyfnodau estynedig cyn i ansawdd y data a gafwyd ddirywio. Yn ogystal, mae defnyddio'r math hwn o ficrosgopeg yn arwain at ddelweddau'n cael eu cipio ar gyflymder llawer uwch, gan ganiatáu i ddelweddau sy'n cynrychioli ardal llawer mwy gael eu archwilio mewn amseroedd tebyg, os nad llai o amser na'r hyn oedd yn bosibl gyda'r sganiwr atseiniol ar y microsgop cydffocal. Yn wir,

roedd defnyddio'r dechnoleg hon yn caniatáu dal crychau dorsal dros wyneb macroffagau yn dilyn ysgogiad gyda ffactorau twf amrywiol (15). Mae'n ymddangos bod rhywfaint o'r crychu macropinosytig a ddaliwyd fel rhan o'r astudiaeth hon yn debyg i'r rhai a gofnodwyd gennym yn ystod ein hymchwiliadau gan ddefnyddio'r NGau. Yn wir drwy edrych ar ymchwil mewn i strwythurau macropinocytosis gan Ahn *et al* gwelir strwythurau macropinosytig ar draws y wyneb o celloedd sy'n debyg iawn i'r rhai welsom ni (17). Mae'r crychau sydd "wedi siapio fel C" maent yn dangos yn debyg iawn i'r rhai wnaethom ni disgrifio fel petalau. Gyda'r strwythurau yma hefyd mae yna awgrymiadau mae rhai yr oeddwn yn gweld gyda'r arbrofion CellMask (18). Yn yr achos yma beth bynnag mae'r crychau i'w weld y ffurfio mewn 60-120 eiliad, llawer cynt na'r rhai wnaethom gweld o ganlyniad i triniaeth gyda NGau.

5.12 Ffynonellau

1. Sayers EJ, Magnusson JP, Moody PR, Mastrotto F, Conte C, Brazzale C, et al. Switching of Macromolecular Ligand Display by Thermoresponsive Polymers Mediates Endocytosis of Multiconjugate Nanoparticles. *Bioconjug Chem.* 2018 Apr 18;29(4):1030–46.
2. Radford DC, Yang J, Doan MC, Li L, Dixon AS, Owen SC, et al. Multivalent HER2-binding polymer conjugates facilitate rapid endocytosis and enhance intracellular drug delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2020 Mar 10;319:285–99.
3. Wymant JM, Sayers EJ, Muir D, Jones AT. Strategic Trastuzumab Mediated Crosslinking Driving Concomitant HER2 and HER3 Endocytosis and Degradation in Breast Cancer. *J Cancer.* 2020 Mar 5;11(11):3288–302.
4. Moody PR, Sayers EJ, Magnusson JP, Alexander C, Borri P, Watson P, et al. Receptor Crosslinking: A General Method to Trigger Internalization and Lysosomal Targeting of Therapeutic Receptor:Ligand Complexes. *Mol Ther.* 2015 Oct 27;23(12):1888.
5. Lukinavičius G, Reymond L, D’Este E, Masharina A, Göttfert F, Ta H, et al. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nat Methods.* 2014 July;11(7):731–3.
6. Keyel PA, Loutcheva L, Roth R, Salter RD, Watkins SC, Yokoyama WM, et al. Streptolysin O clearance through sequestration into blebs that bud passively from the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2011 July 15;124(14):2414–23.
7. Mlcochova P, Pelchen-Matthews A, Marsh M. Organization and regulation of intracellular plasma membrane-connected HIV-1 assembly compartments in macrophages. *BMC Biol.* 2013 Aug 2;11:89.
8. Weisser NE, Sanches M, Escobar-Cabrera E, O’Toole J, Whalen E, Chan PWY, et al. An anti-HER2 biparatopic antibody that induces unique HER2 clustering and complement-dependent cytotoxicity. *Nat Commun.* 2023 Mar 13;14(1):1394.
9. Tassa C, Duffner JL, Lewis TA, Weissleder R, Schreiber SL, Koehler AN, et al. Binding Affinity and Kinetic Analysis of Targeted Small Molecule-Modified Nanoparticles. *Bioconjug Chem.* 2010 Jan 20;21(1):14–9.
10. Vanni S, Mariastella Caputo T, Maria Cusano A, Vita AD, Cusano A, Cocchi C, et al. Engineered anti-HER2 drug delivery nanosystems for the treatment of breast cancer. *Nanoscale.* 2025;17(15):9436–57.
11. Nielsen UB, Kirpotin DB, Pickering EM, Drummond DC, Marks JD. A novel assay for monitoring internalization of nanocarrier coupled antibodies. *BMC Immunol.* 2006 Oct 2;7:24.

12. Roberts SK, Hirsch M, McStea A, Zanetti-Domingues LC, Clarke DT, Claus J, et al. Cluster Analysis of Endogenous HER2 and HER3 Receptors in SKBR3 Cells. *Bio-Protoc.* 2018 Dec 5;8(23):e3096.
13. Rodríguez-Burford C, Oelschlager DK, Talley LI, Barnes MN, Partridge EE, Grizzle WE. The use of dimethylsulfoxide as a vehicle in cell culture experiments using ovarian carcinoma cell lines. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm.* 2003 Feb;78(1):17–21.
14. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep.* 2019 Mar 15;9(1):4641.
15. Quinn SE, Huang L, Kerkvliet JG, Swanson JA, Smith S, Hoppe AD, et al. The structural dynamics of macropinosome formation and PI3-kinase-mediated sealing revealed by lattice light sheet microscopy. *Nat Commun.* 2021 Aug 10;12(1):4838.
16. Chen BC, Legant WR, Wang K, Shao L, Milkie DE, Davidson MW, et al. Lattice Light Sheet Microscopy: Imaging Molecules to Embryos at High Spatiotemporal Resolution. *Science.* 2014 Oct 24;346(6208):1257998.
17. Ahn W, Singla B, Marshall B, Csányi G. Visualizing Membrane Ruffle Formation using Scanning Electron Microscopy. *J Vis Exp JoVE.* 2021 May 27;(171):10.3791/62658.
18. Yan G, Zhou J, Yin J, Gao D, Zhong X, Deng X, et al. Membrane Ruffles: Composition, Function, Formation and Visualization. *Int J Mol Sci.* 2024 Oct 12;25(20):10971.

6 Trafodaeth Gyffredinol

Yma rydym wedi llwyddo i ddatblygu NGau PLGA sy'n amgáu doxorubicin a hefyd gall targedu gelloedd cancer y fron sy'n gorfynegi HER2. Gan ddefnyddio'r rhain rydym wedi dangos yn llwyddiannus y gall y croesgysylltu a achosir gan y NGAu addurnedig hyn achosi'r bilen plasma i grychu a bellach o'r farn y bydd y dealltwriaeth hyn yn arwain at greu NGau a nanofeddyginiaethau mwy effeithiol. Er gwaethaf ein cred y bydd gwella nanofeddyginiaethau sy'n targedu yn arwain, yn y pen draw, at therapïau mwy diogel a dibynadwy, mae hefyd y safbwynt nad yw budd swyddogaetholi nanofeddyginiaethau gyda ligandau targedu yn ddigonol i gyfiawnhau'r gost ychwanegol a'r heriau optimeiddio (1). Yn wir, mae ein harbrofion hyfywedd yn dangos mai'r NGAu PLGA-Dox di-Tz oedd hefo'r gallu mwyaf i wrth hwyluso marwolaeth celloedd.

Yn ogystal, credir, o un dos sengl o NGau, fod llai nag 1% yn cyrraedd safle'r tiwmor, gyda dim effaith bositif yn ymddangos i dargedu (2). Oherwydd hyn, dadleuwyd, er mwyn gwella'r cyfieithiad clinigol o NGAu a gwella eu heffeithiolrwydd therapiwtig, y dylid yn hytrach ganolbwyntio ymdrechion ar wella crynodiad y NGAu sy'n cyrraedd y safle triniaeth. Yn wir, o hyn bu ymdrechion i ddatblygu dulliau newydd yn lle hynny i wella darlifiad y tiwmor (3,4). Er bod hyn yn ymddangos yn wrthgynhyrchol i ddechrau; trwy wella darlifiad y tiwmor mae'n gwella crynodiad y NGAu i gronni yn y safle priodol gan wella'r effaith therapiwtig a all yn ei dro leihau costau triniaeth gan y gellir lleihau'r dos cychwynnol. Un dull a ddefnyddir i gyflawni hyn yw trwy ddefnyddio dyfais uwchsain i ailagor pibellau gwaed caeedig ac adfer cylchrediad i diwmor a thrwy ddefnyddio cemotherapi mwy traddodiadol dangoswyd bod defnyddio'r dechneg hon wedi gwella mynediad y cyffuriau i'r tiwmor a'r canlyniad therapewtig terfynol (5).

Her arall gyda NGAu wedi swyddogaetholi gyda ligand yw dadansoddi sut y byddant yn adweithio mewn y corff, sy'n cynrychioli amgylchedd llawer iawn fwy cymhleth i gymharu ag un *in vitro*. Ar gyfer NGau wedi'u haddurno a gwrthgyrff, yn benodol os yw'r gwrthgyrff wedi'u cyfeirio mewn ffordd lle mae'r gydran FC yn hygyrch, yna mae'n debygol iawn y bydd y gronynnau eu hunain yn ennyn ymateb gan y system imiwnedd ac yn y pen draw yn cael eu amlyncu gan macroffagau a chelloedd dendritig (6,7). Er mwyn osgoi hyn, mae sawl grŵp gwahanol wedi ceisio naill ai defnyddio technegau cemeg newydd i reoli'r rhwymo gwrthgyrff i corff y NGau, a felly hefyd eu cyfeiriadedd, neu maent wedi newid i ddefnyddio peptidau targedu mwy diweddar fel scFV ac elfenau dynwaredol (e.e affigorff) sydd, oherwydd eu maint, yn llawer mwy cyfyngedig o ran y cyfeiriadedd posibl y gellir eu rhwymo i'r NGAu (8,9). Yr hyn sy'n aneglur, fodd bynnag, yw'r effaith y gallai defnyddio'r peptidau llai hyn ei gael ar groesgysylltu a hwylusir gan NGau. Gan eu bod yn sylweddol llai na gwrthgyrff, mae'n bosibl eu bod yn llawer mwy sensitif i rwystr stearig. Yn ogystal, oherwydd eu bod yn fyrrach efallai na fyddant yn gallu ysgogi'r bilen plasma i grychu i'r un raddau â'n gronynnau wedi'u haddurno ag gwrthgyrff llawn. Bydd cyrhaeddiad ehangach gan y PLGA-Tz sy'n caniatáu i dderbynyddion HER2 sydd ymhellach oddi wrth ei gilydd gael eu croesgysylltu. Unwaith eto, fel yr ydym wedi sôn, mae rhwymo cychwynnol NGAu i'r bilen plasma yn faes sydd wedi'i dan-astudio ac yn ogystal â hyn mae angen ymchwil pellach i sefydlu pa ganlyniadau pellter croesgysylltu yw'r gorau posibl o ran mewnosod NGau. Buasai'n ddiddorol astudio effaith PLGA ynglwm wrth peptid sy'n targedu HER2. Mae astudiathau diweddar gyda polymer HPMA yn rhoi tystiolaeth eu bod yn effeithiol i gludo paclitaxel i gelloedd canser yr ofari ond doedd ddim data ar ei effeithiau cynnar ar y bilen blasma na chwaith unrhyw effaith ar fynegiant HER2 (10).

Un maes sydd o ddiddordeb mawr mewn ymchwili NGau yw ffurfiant ac effaith y corona sef y proteinau sy'n amgylchynu NGau ar ôl eu rhoi i'r corff neu hefyd mewn serwm llawn fel yn y gwaith yn y traethawd yma (11–14). Mae'r corona wedi'i ffurfio o broteinau fel albwmen a phroteinau plasma cyffredin eraill ac mae tystiolaeth yn awgrymu ei fod yn ffurfio o fewn eiliadau i'r NGau gael eu cyflwyno i'r proteinau (15). Mae ymchwili yn awgrymu y gall y corona hwn reoli rhyngweithiadau'r NGau â'r celloedd gan y bydd yn dylanwadu'n fawr ar eu priodweddau arwynebol (16). Gallai trwch y corona hefyd effeithio ar allu croesgysylltu NGau gan y bydd cynyddu eu maint hefyd efallai yn cyflwyno mwy o rwystr steorig. Pryder ymarferol arall ynghylch y corona yw y gallai wneud ligandau targedu yn aneffeithiol os yw'n cronni yn ddigon trwchus i orchuddio'r ligandau targedu a'u hatal rhag rhwymo i'r targed dderbynnydd (16,17). Byddai ein data yn awgrymu nad yw'n ymddangos bod y corona yn effeithio'n negyddol ar y PLGA-Tz fel y gwelir gan y bilen blasma yn crychu a hefyd y data hyfywedd, gyda'i gilydd maent yn dangos gwahaniaeth tymor byr a hir yn y ffordd y mae'r NGau-Tz yn rhwymo a'r effaith wenwynig y mae'r hwyluso. Mae'r gwahaniaeth mewn gwenwyndra a welir rhwng y llinellau cell MCF7 HER2 isel a HER2+ yn dangos y gallai ein NGau ddangos eu heffeithiolrwydd o fewn astudiaethau *in vivo* sydd ei angen i gefnogi'r data *in vitro*.

Sefydlodd yr ymchwili flaenorol yn ein labordy a gyflawnwyd gan Moody *et al* fod croesgysylltu derbynnyddion sy'n eistedd ar wyneb y gell yn ddull newydd o yrru eu mewnlifiad i'r lysosomau i'w diraddio (18). Ehangodd Wymant *et al* ar hyn a chanolbwyntio ar yr effeithiau y mae croesgysylltu'r derbynnydd HER2 yn eu cael ar y celloedd (19). Darganfuwyd bod croesgysylltu yn effeithiol i yrru mewnosodiad y HER2, sydd fel arfer yn gwrthsefyll endocytosis i'r lysosomau, i'r organyn hwn a'i ddiraddio. Datgelodd delweddu MES ar draws wyneb y celloedd SKBR3 croesgysylltiedig hyn ar ôl

10 munud o driniaeth croesgysylltu sawl strwythur tebyg i betalau y credir eu bod yn ran o'r broses macropinosytosis sydd yn nodweddiadol yn ffynnu o strwythurau fel hyn (19). Yn ein hymdrechion i ddefnyddio NGau fel platfform i gyflawni'r un effaith, ni allem ail-greu'r un gostyngiad yn mynegiant HER2, fodd bynnag, roeddem yn gallu dangos bod croesgysylltu a gyfryngir gan NGau wedi sbarduno ffurfio'r strwythurau tebyg iawn i'r hyn a welwyd yn Wymant et al (19). O ystyried nifer y derbynyddion HER2 ar wyneb celloedd HER2+ SKBR3, mae'n bosibl, rhwng graddfa labelu'r NGau a'r cyfyngiad ffisegol ar faint o NGau a allai rwymo i un gell, mai hyn yw un o'r brif resymau fod ni methu mesur unrhyw effaith ar mynegiant HER2 (20). Hynny yw mae'n bosib fod y nifer o dderbynyddion HER2 croesgysylltiedig a ddiraddiwyd yn cynrychioli carfan bychan iawn o'r derbynyddion a oedd yn bresennol fel na ellid ei ganfod. Yn ogystal, dangoswyd bod celloedd HER2+ yn arddangos gallu rhyfeddol i ailgyflenwi mynegiant HER2 yn dilyn lawr-reoleiddio gorfodol (21). Gan ddefnyddio dextran i labelu lysosomau roedd gallu y NGau-Tz i mewnosod i'r lysosomau yn amlwg ond dim ond ar ôl 24 awr ar ôl y driniaeth. O safbwynt mynegiant, mae'n bosibl nad oedd y gyfradd fewnoli yn ddigonol i leihau mynegiant HER2 yn sylweddol, fodd bynnag, o safbwynt danfon cyffuriau, mae hyn yn caniatáu targedu'r celloedd yn gyson gan y bydd y targed arwyneb yn bresennol yn barhaus.

Awgrymwyd, rhag ofn y bydd mynegiant derbynyddion yn cael eu lleihau neu fel dull o wella croesgysylltu, y dylid defnyddio targedu aml-ligand i ganiatáu targedu canran uwch o dderbynyddion (22–24). Gan fod tiwmorau yn aml yn heterogenaidd, mae hefyd yn caniatáu, os oes angen, targedu poblogaeth gymysg o gelloedd. Cynigiwyd hefyd, o ganlyniad i hyn, y gall optimeiddio cargo'r NGAu ganiatáu iddynt ladd timworau yn fwy cyflawn drwy dewis cyffuriau yn dibynnol ar yr athreiddedd sydd o awydd. Er mwyn

lleihau sgîl-effeithiau, mae'n aml yn well capsiwleiddio cyffuriau anhydraid fel bod yr effaith cytotocsig wedi'i leoleiddio i'r celloedd sydd yn amlygu'r targed, gyda'r anfantais na fydd celloedd canseraidd sydd naill ai o dan wyneb hygyrch y tiwmor neu ddim yn mynegi'r derbynnydd yn cael eu heffeithio (25). Fel arall, gellir lladd tiwmorau yn fwy cyflawn trwy gapsiwleiddio cyfansoddion athraidd gyda'r gost o'r godid mewn siawns o sgîl-effeithiau mwy difrifol (25). Er mwyn atal amlygiad ymwrthedd ac i leihau effaith mewnosod gronynnau gwael, mae hefyd yn bosibl capsiwleiddio cyfansoddion sy'n gweithio'n synergaid â'i gilydd i wneud y mwyaf o effeithiolrwydd therapiwtig; fel yr hyn a welwyd efo NGAU x yn cludo y a z (26).

O ran athreiddedd y cyffuriau, mae'r ddau ddull wedi cael eu defnyddio mewn CCGau sy'n targedu HER2 er enghraifft Kadcylla ac Enhertu sy'n cynnwys trastuzumab wedi'i gysylltu ag emtansin a deruxtecan yn y drefn honno (27). Yn yr achos hwn, mae'r emtansin yn anhydraid i'r bilen tra bod y deruxtecan yn fwy athraidd ac o ganlyniad yn fwy abl i ladd celloedd trwy effaith y sefyllwr (28,29). Yn debyg i'r farn gyfredol ar NGau, credwyd bod CCGau yn ffordd effeithiol o gyflwyno cyffuriau cytotocsig iawn, yn llawer rhy wenwynig i'w rhoi'n rhydd, i gelloedd penodol a thrwy hynny hwyluso lladd y targed gelloedd. Yn anffodus, fodd bynnag, nid oeddent mor effeithiol ag y gobeithiwyd, yn bennaf oherwydd mewnosodiad gwael iawn o'r CCG gydag amcangyfrif o 1% yn cael ei fewnosod a oedd yn ei dro yn rhoi gorddibyniaeth ar lwythi gwenwynig iawn er mwyn gallu cyrraedd crynodiad therapiwtig (30).

Mae NGau, ar y llaw arall, yn gallu amgáu crynodiadau llawer uwch o ba bynnag lwythi a ddewisir, oherwydd eu cyfaint, gan sicrhau, gyda cymhariaeth o un gronyn yn erbyn un CCG bod llawer mwy o'r cyffur yn cael ei ddanfôn. Yn ogystal, gallai NGau osgoi rhai o

gyfyngiadau CCGau mewn canser y fron HER2+ sy'n gwrthsefyll triniaeth trastuzumab, yn enwedig y bregusrwydd i bachu gyda HER2 hydawdd. Hynny yw o fewn tiwmorau a gafodd eu trin yn flaenorol â trastuzumab, adroddwyd bod y rhan allgellog o'r derbynnydd HER2 wedi'i ollwng fel mecanwaith ymwrthedd (31). Mae dau effaith o ganlyniad i hyn, mae'n amddifadu triniaethau pellach â'r un CCGau pellach a gall y rhan allgellog rydd rwymo i'r CCG gan eu hatal rhag rhwymo i targed gelloedd.

Oherwydd bod gan NGAu addurnedig nifer o ligandau targedu ar eu harwyneb (10-50 yn y gwaith yma), does ddim angen i pob un ohonynt i fod yn weithredol er mwyn hwyluso rhwymo celloedd ac felly cyflenwi cyffuriau'n llwyddiannus. Yn diddorol, fodd bynnag, er gwaethaf y flaenoriaeth i ddatblygu therapïau sy'n targedu celloedd penodol mewn rhannau arbennig o'r corff, mae Enhertu wedi'i gymeradwyo i'w ddefnyddio'n therapiwtig y tu allan i ganser HER2+ (32). Gan fod canran isel iawn o celloedd yn y tiwmorau hyn gyda mynegiant gymharol uwch o HER2 y strategaeth yw i targedu'r is-boblogaeth yma gyda Enhertu a dibynnu ar effaith y sefyllwr i ladd weddill y canser. Mae hyn eto'n codi'r cwestiwn os oes gwir angen y fuddsoddiad mewn datblygu ac optimeiddio nanofeddyginiaethau targedol? Fodd bynnag, dangosodd ein astudiaethau hyfywedd, er nad yw NGAu Tz mor wenwynig NGAu PLGA-Dox, rhoddodd addurno Tz wenwyndra dewisol sy'n galluogi i ni fynegi y buasent yn fwy effeithio ac yn llai gwenwynig mewn astudiaethau mewn vivo.

Ar gyfer NGAu lipid (LNP), o ran eu cyfraddau trawsffeithio celloedd â mRNA, sefydlwyd fod eu heffeithiolrwydd yn ddibynnol ar natur y linell neu'r fodel gell. Arweiniodd hyn ar waith rhwng ein labordy ni ag AstraZeneca i ddarganfod y rheswm am y gwahaniaethau hyn ac yn rhan o hyn oedd "proffilio endocytig" tair llinell benodol oedd unai yn hawdd (HCT116 colon dynol), cymedrol hawdd (H358 ysgyfaint dynol) neu'n anodd i'w

trawsffeithio (CT26 coluddyn llygoden). Roedd BT474 yn cynrychioli'r grŵp cymedrol hawdd (33) ond chafodd y linell hon ddim o'i llygadu'n fanwl. Rhaid cofio nad oedd y NGau LNP wedi ei haddurno ond buasai'n ddiddorol archwilio ar draws panel tebyg o linellau cell a ellid gweld ymateb tebyg i NGau sy'n llawn cyffuriau ac i sefydlu ffactorau penodol y gellir eu defnyddio i ragweld effeithlonrwydd mewn sosod a thueddiad i groesgysylltu gwahanol fathau o gelloedd.

Canlyniadau

Er bod y mecanweithiau manwl gywir sy'n llywodraethu'r rhyngweithiadau cynnar rhwng NGau a'r derbynwyr ar bilen plasma a'i heffeithiau llawn yn parhau i fod yn anhysbys, mae'r gwaith hwn yn dangos gwerth astudiaeth manwl o'r ffenestr gynnar hon o'r gydberthynas ac yn amlygu sut y gall delweddu o fath newydd roi dealltwriaeth a syniadau ar sut i greu nanofeddyginiaethau mwy effeithiol.

6.1 Ffynonellau

1. Lammers T, Kiessling F, Ashford M, Hennink W, Crommelin D, Storm G. Cancer nanomedicine: Is targeting our target? *Nat Rev Mater*. 2016 Sept;1(9):16069.
2. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater*. 2016 Apr 26;1(5):16014.
3. Ojha T, Pathak V, Shi Y, Hennink WE, Moonen CTW, Storm G, et al. Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017 Sept 15;119:44–60.
4. Rama E, May JN, Rix A, Lammers T, Kiessling F. Image-guided strategies to improve drug delivery to tumors beyond using the enhanced permeability and retention (EPR) effect. *Biochem Biophys Res Commun*. 2025 Sept 8;778:152346.
5. Han F, Wang Y, Dong X, Lin Q, Wang Y, Gao W, et al. Clinical sonochemotherapy of inoperable pancreatic cancer using diagnostic ultrasound and microbubbles: a multicentre, open-label, randomised, controlled trial. *Eur Radiol*. 2024 Mar;34(3):1481–92.
6. Tholen MME, Rosier BJHM, Vermathen RT, Sewnath CAN, Storm C, Woythe L, et al. Mapping Antibody Domain Exposure on Nanoparticle Surfaces Using DNA-PAINT. *ACS Nano*. 2023 June 7;17(12):11665–78.
7. Woythe L, Tito NB, Albertazzi L. A quantitative view on multivalent nanomedicine targeting. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021 Feb 1;169:1–21.
8. Kedmi R, Veiga N, Ramishetti S, Goldsmith M, Rosenblum D, Dammes N, et al. A modular platform for targeted RNAi therapeutics. *Nat Nanotechnol*. 2018 Mar;13(3):214–9.
9. Komedchikova EN, Kolesnikova OA, Tereshina ED, Kotelnikova PA, Sogomonyan AS, Stepanov AV, et al. Two-Step Targeted Drug Delivery via Proteinaceous Barnase-Barstar Interface and Doxorubicin-Loaded Nano-PLGA Outperforms One-Step Strategy for Targeted Delivery to HER2-Overexpressing Cells. *Pharmaceutics*. 2022 Dec 24;15(1):52.
10. Radford DC, Yang J, Doan MC, Li L, Dixon AS, Owen SC, et al. Multivalent HER2-binding polymer conjugates facilitate rapid endocytosis and enhance intracellular drug delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2020 Mar 10;319:285–99.
11. Mahmoudi M, Landry MP, Moore A, Coreas R. The protein corona from nanomedicine to environmental science. *Nat Rev Mater*. 2023 July;8(7):422–38.
12. Sun Y, Zhou Y, Rehman M, Wang YF, Guo S. Protein Corona of Nanoparticles: Isolation and Analysis. *Chem Bio Eng*. 2024 Oct 3;1(9):757–72.

13. Kopac T. Protein corona, understanding the nanoparticle-protein interactions and future perspectives: A critical review. *Int J Biol Macromol*. 2021 Feb 1;169:290–301.
14. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, et al. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 13;104(7):2050–5.
15. Bashiri G, Padilla MS, Swingle KL, Shepherd SJ, Mitchell MJ, Wang K. Nanoparticle protein corona: from structure and function to therapeutic targeting. *Lab Chip*. 2023 Mar 14;23(6):1432–66.
16. Nierenberg D, Khaled AR, Flores O. Formation of a protein corona influences the biological identity of nanomaterials. *Rep Pract Oncol Radiother*. 2018;23(4):300–8.
17. Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, Prapainop K, Bombelli FB, Hristov DR, et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nanotechnol*. 2013 Feb;8(2):137–43.
18. Moody PR, Sayers EJ, Magnusson JP, Alexander C, Borri P, Watson P, et al. Receptor Crosslinking: A General Method to Trigger Internalization and Lysosomal Targeting of Therapeutic Receptor:Ligand Complexes. *Mol Ther*. 2015 Oct 27;23(12):1888.
19. Wymant JM, Sayers EJ, Muir D, Jones AT. Strategic Trastuzumab Mediated Crosslinking Driving Concomitant HER2 and HER3 Endocytosis and Degradation in Breast Cancer. *J Cancer*. 2020 Mar 5;11(11):3288–302.
20. Nielsen UB, Kirpotin DB, Pickering EM, Drummond DC, Marks JD. A novel assay for monitoring internalization of nanocarrier coupled antibodies. *BMC Immunol*. 2006 Oct 2;7:24.
21. Brasó-Maristany F, Griguolo G, Pascual T, Paré L, Nuciforo P, Llombart-Cussac A, et al. Phenotypic changes of HER2-positive breast cancer during and after dual HER2 blockade. *Nat Commun*. 2020 Jan 20;11(1):385.
22. Xu H, Kona S, Su LC, Tsai YT, Dong JF, Brilakis ES, et al. Multi-Ligand Poly(L-Lactic-co-Glycolic Acid) Nanoparticles Inhibit Activation of Endothelial Cells. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013 Aug;6(4):570–8.
23. Veszeka S, Mészáros M, Porkoláb G, Szecskó A, Kondor N, Ferenc G, et al. A Triple Combination of Targeting Ligands Increases the Penetration of Nanoparticles across a Blood-Brain Barrier Culture Model. *Pharmaceutics*. 2021 Dec 30;14(1):86.
24. Covarrubias G, He F, Raghunathan S, Turan O, Peiris PM, Schiemann WP, et al. Effective treatment of cancer metastasis using a dual-ligand nanoparticle. *PLoS ONE*. 2019 July 29;14(7):e0220474.

25. Fu Z, Li S, Han S, Shi C, Zhang Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Mar 22;7(1):93.
26. Dasgupta A, May JN, Klinkenberg G, Besse HC, Buhl EM, Moeckel D, et al. Multidrug micelles and sonopermeation for chemotherapy co-delivery to brain tumors. *J Controlled Release*. 2025 Apr 10;380:818–28.
27. Chang HL, Schwettmann B, McArthur HL, Chan IS. Antibody-drug conjugates in breast cancer: overcoming resistance and boosting immune response. *J Clin Invest*. 133(18):e172156.
28. Lee HK, Kim B, Ko YG, Chung SW, Shim WS, Choi SY, et al. Enhancing the bystander effect of antibody-drug conjugate by using a novel caspase-3 cleavable peptide linker to overcome tumor heterogeneity. *J Controlled Release*. 2025 June 10;382:113738.
29. Liu F, Yin G, Xue S, Rehman FU, Liao D, Pan Y. Adverse Event Profile Differences between Trastuzumab Emtansine and Trastuzumab Deruxtecan: A Real-world, Pharmacovigilance Study. *J Cancer*. 2023 Oct 2;14(17):3275–84.
30. Sasso JM, Tenchov R, Bird R, Iyer KA, Ralhan K, Rodriguez Y, et al. The Evolving Landscape of Antibody–Drug Conjugates: In Depth Analysis of Recent Research Progress. *Bioconjug Chem*. 2023 Nov 15;34(11):1951–2000.
31. Tsé C, Gauchez AS, Jacot W, Lamy PJ. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012 Apr;38(2):133–42.
32. Modi S, Jacot W, Yamashita T, Sohn J, Vidal M, Tokunaga E, et al. Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2022 July 6;387(1):9–20.
33. Sayers EJ, Peel SE, Schantz A, England RM, Beano M, Bates SM, et al. Endocytic Profiling of Cancer Cell Models Reveals Critical Factors Influencing LNP-Mediated mRNA Delivery and Protein Expression. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2019 Nov 6;27(11):1950–62.

7 Atodiadau

Eitem	Cwmni	Rhifyn Catalog
Actin	abcam	ab235138
α -Tiwbilin	Santa Cruz	sc-32293
EEA1 (Endosomau Cynnar)	BD Biosciences	610457
Rab7 (Endosomau Hwyr)	Cell Signaling Technology	3547S
LAMP II (Lysosomau)	DSHB	H4B4
LAMP III (Lysosomau)	Santa Cruz	sc-5275
TGN46 (Golgi-trans)	BioRad	AHP500
GM130 (Golgi-cis)	BD Biosciences	610822
HER2	BD Biosciences	610162
HER3	Cell Signaling Technology	12708S
Hoechst 33342	Sigma	H3570
Gwrth Llygodyn AlexaFluor 488	Invitrogen	A21200
Gwrth Cwningen AlexaFluor 647	Invitrogen	A21443
Gwrth Dafad AlexaFluor 555	Invitrogen	A21436
FBS	Gibco	10270-106
Cyfrwng DMEM	Gibco	11594446
Cyfrwng Delweddu	Gibco	11835030
Trypsin	Gibco	11560626
PBS	Gibco	15374875
DMSO	Fisher Scientific	10103483
T75	Corning	15350591
T175	Fisher Scientific	10444112
"Mr Frosty"	ThermoScientific	5100-0001
Cryofial	Corning	10340412
Isopropanol	Acros Organics	389710025
Paraformaldehyde	Fisher Scientific	P/0840/53
Methanol	Fisher Scientific	M/4000/17
Plât 12 ffynnon	Fisher Scientific	10253041
Amoniwm Clorid	Fisher Scientific	A/3920/53
Triton X-100	Fisher Bioreagents	BP151-500
BSA	Roche	03117332001
Arwydrau	Fisher Scientific	12313138
Sleidiau	VWR International	631-1551
Olew DAKO	DAKO UK	S302380-2
Colofnau dihalwyno Zeba	ThermoScientific	87769
AlexaFluor488	Invitrogen	A20000
Sodiwm Bicarbonad	Fisher Scientific	BPE328
Dysglau MatTek	MatTek Corporation	P35G-1.5-10-C
PLGA	Sigma-Aldrich	805726

PLGA-COOH	Sigma-Aldrich	902071-500MG
PVA	Sigma-Aldrich	341584
Rhodamine B	Sigma-Aldrich	R6626
Doxorubicin	Stratech Scientific	A1832-APE
NHS	ThermoScientific	24500
EDC	Sigma-Aldrich	E7750
Dextran488	Invitrogen	D22910
Dextran647	Invitrogen	D22914
Plât 6 ffynnon	Corning	10578911
Crafwr plastig	Fisher Scientific	11597692
Asid biochoning	ThermoScientific	23223
Copr sylffad pentahydrad	Sigma-Aldrich	C2284-25ml
Plat 96 ffynnon	Fisher Scientific	10212811
Plat du 96 ffynnon	Fisher Scientific	10174221
Gel anyKDA	BioRad	4569034
PVDF	ThermoScientific	10617354
NaCl	ThermoScientific	194090010
Tris-Bâs	Roche	10708976001
NP-40	Sigma	N-6507
SDS	Sigma	L5750
Glycerol	Fisher Scientific	G/P450/08
Glas Bromophenol	BioRad	161-0404
Tris-HCL	ThermoScientific	J22676-A1
DTT	ThermoScientific	R0861
Glycine	Fisher Chemicals	G/0800/60
Tween-20	Sigma-Aldrich	P9416
Saponin	Sigma	S-7900
Pierce ECL	ThermoScientific	32106
WestFemto ECL	ThermoScientific	34094
Gwrthgorff Tubulin-HRP	Abcam	ab21058
Gwrthgorff TfR	Invitrogen	13-6800
Gwrth Llygoden-HRP	Invitrogen	32430
SiR-Actin	Tebubio	SC001
EGF	Sigma-Aldrich	E9644
CellMask DeepRed	ThermoFisher	C10046
Glutaraldehyde	Sigma-Aldrich	G7776
Osmwim Tetrosid	Polysciences Inc.	23310
Ethanol	Fisher Scientific	10048291
Hexamethyldisilazane	Sigma-Aldrich	440191
CellTiterBlue	Promega	G8081