

**siRNA YÜKLÜ ALBUMİN TAŞIYICI
SİSTEMLERİN İNHALER UYGULAMA
İÇİN GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Serdar ALAGÖZ

ESKİŞEHİR 2019

**siRNA YÜKLÜ ALBUMİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN
İNHALER UYGULAMA İÇİN GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Serdar ALAGÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKÖROĞLU

(İkinci Danışman: Arş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2019

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1708S472)

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Serdar ALAGÖZ'ün "SiRNA Yüklü Albumin Taşıyıcı Sistemlerin İnhaler Uygulama İçin Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 13/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

Doc. Dr. Bilal Büyük Eroğlu

Üye

: Doc. Dr. Emine SALLYA

Üye

: Doc. Dr. İbrahim BAŞARAN

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Nalan GUNDOĞDU-KARABURUN
Müdür

ÖZET

SİRNA YÜKLÜ ALBÜMİN TAŞIYICI SİSTEMLERİN İNHALER UYGULAMA İÇİN GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Serdar ALAGÖZ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2019

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

(İkinci Danışman: Arş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL)

Günümüze kadar olan süreçte, kanser ve virütik hastalıkların tedavisinde kullanılan geleneksel ilaç kullanımı artık yerini gen tedavisine bırakmaktadır. Bunlar arasında siRNA aracılı gen susturma, kanser gibi hastalıkların tedavisinde umut verici bir stratejiyi temsil eder. Spesifik genin susturulmasında kullanılacak olan bu genetik materyallerin kararlı bir halde hücreye ulaştırılması ve hücre tarafından alınmasının sağlanması için etkili bir taşıyıcı sisteme ihtiyaç duyulmaktadır.

Albümin, suda çözünürlüğü yüksek, toksik ve immünojenik olmayan, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak bozunur özelliğe sahiptir. Son yıllarda ise Sığır Serum Albümini (BSA) yeni gen taşıyıcı sistem olarak incelenmektedir.

İnhalasyon yolu kullanılarak tedavi çalışmaları antik çağlara kadar uzanmaktadır. Bu yol ile ilaç uygulama parenteral tedavinin bir basamağıdır. Lokal amaçla inhalasyon uygulamasında küçük oranlardaki sıvı ilaç, akciğer epitallerine hızlı bir şekilde difüze olur ve kan dolaşımına penetre olarak sistemik sirkülasyona karışmadan doğrudan akciğerlere ulaştığından etki anında başlar.

Bu çalışmada, albümin nanopartiküllerine siRNA'nın yüklenmesi ve inhaler uygulanacak özellikte sistemlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, geliştirilen albümin bazlı gen taşıyıcı sistemin in vitro koşullarda karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve elde edile sonuçlar ile bu sistemin akciğer kanser tedavisi için inhaler olarak uygulanmasının uygunluğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Albümin nanopartikül, siRNA, Antisens teknolojisi, Kanser, Gen taşıyıcı sistem

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF siRNA LOADED ALBUMIN CARRIER SYSTEMS FOR INHALER APPLICATIONS

Serdar ALAGÖZ

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2019

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

(Co-Supervisor: Res. Ass. Dr. Behiye ŞENEL)

Until now, traditional drugs used in the treatment of cancer and viral diseases are being replaced by gene therapy. Among these, siRNA-mediated gene silencing is a promising strategy in the treatment of diseases such as cancer. An efficient delivery system is required for the stable delivery and cellular uptake of this genetic material to be used for silencing the specific gene.

Albumin is highly water soluble, toxic and non-immunogenic, biocompatible and biodegradable. In recent years, Bovine Serum Albumin (BSA) has been investigated as a new gene delivery system.

Inhalation treatment method goes back to ancient times. This method is a step of parenteral treatment. In local inhalation administration, small amounts of liquid drug rapidly diffuse into the lung epithelium and penetrate the bloodstream. The effect starts immediately because the drug is not involved in the systemic circulation and reaches the lungs directly.

The aim of this study was to load siRNA into albumin nanoparticles and to develop systems for inhaler application. For this purpose, in vitro characterization studies of the developed albumin based gene delivery system were performed. According to the results, applicability of this system as an inhaler for lung cancer was evaluated.

Keywords: Albumin nanoparticle, siRNA, Antisense Technology, Cancer, gene carrier system

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışma sürecimiz boyunca desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Lisansüstü hayatım boyunca her konuda desteğini aldığım, çalışmalarım sırasında beni cesaretlendirip motive eden, sitotoksiste ve transfeksiyon çalışmalarında hücre kültürünü ve çalışma prensibini öğreten yardımcı tez danışman hocam Arş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL'e,

Üniversite hayatım boyunca ve sonrası için hayata dair kazanmam gereken bakış açısını ve prensipleri edinmem konusunda bilgi ve deneyimlerinden sıklıkla faydalandığım hocam Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a,

Çalışmalarım sırasında bilgilerinden ve desteklerinden faydalandığım farmasötik teknoloji bölümü hocalarım Prof. Dr. Müzeyyen Demirel'e, Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIMLIOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, ve Dr. Öğr. Üyesi Alper ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmamda, laboratuarda ve araştırma teknikleri konusunda emeği büyük olan, birçok konuda desteğini gördüğüm laboratuvar ve yüksek lisans arkadaşım Rasim Masimov'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca birlikte zaman geçirdiğim ve yardımlarını paylaştığım tüm yüksek lisans arkadaşlarıma,

Memleketimden ayrıldığımdan beri maddi manevi her türlü desteklerini gördüğüm, fikirlerimde bana inanan ve güvenen sevgili aileme,

Yüksek lisans tezimin TÜBİTAK 2210-c yurt içi öncelikli alanlar kapsamına dahil edilmesiyle birlikte, almış olduğum proje burs desteği için TÜBİTAK kurumuna

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

13/06/2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Serdar ALAGÖZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜRLER	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antisense Teknolojisi	3
2.1.1. RNA interferans	3
2.1.2. RNAi mekanizması	5
2.2. Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinleri	8
2.2.1. STAT3 proteini ve onkojenez	9
2.2.2. STAT3'ün hücre büyümesi ve sağkalımdaki rolü	10
2.3. siRNA'nın fonksiyonu ve etki mekanizması	11
2.4. siRNA'nın Hücre İçine Taşınmasında Kullanılan Sistemler	12
2.4.1. <i>İnorganik viral olmayan taşıyıcı sistemler</i>	14
2.4.2. <i>Organik viral olmayan taşıyıcı sistemler</i>	15
2.4.2.1. <i>Çıplak siRNA</i>	15
2.4.2.2. <i>Lipozomlar</i>	15
2.4.2.3. <i>Katı Lipit Nanopartiküller (KLN)</i>	19

2.4.2.4. Polimerik nanopartiküller	20
2.4.2.4.1. Polietilenimin (PEI)	20
2.4.2.4.2. Polietilen Glikol (PEG)	21
2.4.2.4.3. Poli(D,L-laktit-ko-glikolit) (PLGA)	22
2.4.2.4.4. Poli-L-Lizin (PLL)	22
2.4.2.4.5. Dendrimerler	23
2.4.2.4.6. Kitosan (CS)	23
2.4.2.4.7. Albümin	25
2.5. Albümin Nanopartikülleri Hazırlama Yöntemleri	28
2.5.1. Desolvasyon (koaservasyon) yöntemi	28
2.5.2. Emülsiyon oluşturma yöntemi	29
2.5.3. Termal jelasyon yöntemi	30
2.5.4. Püskürterek kurutma yöntemi	30
2.5.5. Nanopartikül albümin bağlama teknolojisi	31
2.5.6. Kendiliğinden oluşma yöntemi	31
2.6. Transfeksiyon Yöntemleri	32
2.7. İnhaler Uygulama ve Akciğer Kanseri	33
3. GEREÇLER	36
3.1. Kullanılan Maddeler	36
3.2. Kullanılan Cihazlar	37
4. YÖNTEM	38
4.1. Formülasyon Geliştirme Sırasındaki Ön Çalışmalar	38
4.1.1. Ön çalışmalardaki formülasyonların hazırlama aşamalar	38
4.2. Ön Çalışmalarla Elde Edilen Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları	43
4.2.1. Ön çalışmalarla ait partikül boyutu ve dağılımı	43
4.2.2. Ön çalışmalarla ait zeta potansiyel ölçümleri	43

4.3. Albümin Nanopartikül Hazırlama Çalışmaları	43
4.3.1. A4 formülasyonu	43
4.3.2. A7 formülasyonu	45
4.3.3. A4 formülasyonlarına genetik materyal yükleme çalışmaları	45
4.3.3.1. Çekirdeğe Enkapsülasyon	46
4.3.4.2. Çekirdeğe Adsorbsiyon	46
4.4. A4 ve A7 Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	47
4.4.1. Morfolojik inceleme	47
4.4.2. pH değeri	47
4.4.3. Jel retardasyon çalışmaları	47
4.4.4. Serum içindeki kararlılık	48
4.5. Hücre Kültürü	48
4.5.1. Sitotoksikite çalışması	49
4.5.2. Transfeksiyon çalışması	50
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	52
5.1. Ön Çalışmalara Ait Bulgular	52
5.2. Partikül Boyutu ve Dağılımı	53
5.3. Zeta Potansiyel Değeri	55
5.4. A4 ve A7 Formülasyonların Morfolojisi	57
5.5. Formülasyonların pH Değeri	59
5.6. Formülasyonlara Albümin Bağlanması	60
5.7. Formülasyonların SEM görüntüsü	69
5.8. A7 formülasyonuna siRNA Bağlama ve Jelde Görüntüleme Çalışmaları	64
5.8.1. Serum İçinde Kararlılık Çalışması	66
5.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	67
5.9.1. A4 formülasyonunun sitotoksikite değerleri	68
5.9.2. A7 formülasyonunun sitotoksikite değerleri	71

5.9.3. A7 formülasyonunun siRNA'lı sitotoksosite değerleri	74
5.9.4. A7 formülasyonlarının hücrelere transfeksiyonu	79
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	87

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. STAT3 proteininin etki ettiği metabolik faktörler	10
Tablo 2.2. Transfeksiyon Yöntemleri	32
Tablo 4.1. Ön formülasyonların bileşenleri ve hazırlama yöntemleri	42
Tablo 5.1. Formülasyonların partikül boyutu ve polidispersite indisi	53
Tablo 5.2. A formülasyonlarının partikül boyutu	56
Tablo 5.3. AD1 ve AD2 Formülasyonları ile albümin çözeltisi oranları	61
Tablo 5.4. K4-Ad ve K4-En Formülasyonlarına adsorbe edilen albümin çözeltisi oranları	62
Tablo 5.5. A4D1 ve A4D2 formülasyonlarına adsorbe edilen siRNA oranları	63
Tablo 5.6. Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite indisi ve zeta potansiyel değerleri	64
Tablo 5.7. Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonları ile Ç2'ye siRNA yüklendikten sonraki formülasyonların Jele yüklemesi	66
Tablo 5.8. Formülasyonlarının sitotoksikite çalışmasında kullanılan miktarları	68
Tablo 5.9. Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonlarının sitotoksikite çalışmasında kullanılan miktarları	71
Tablo 5.10. Ç2-siRNA, Ç2k-siRNA ve A7-siRNA formülasyonlarının ve kuyu başına uygulanan siRNA'nın sitotoksikite çalışmasında kullanılan miktarları	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Dicer enziminin şematik gösterimi	5
Şekil 2.2. siRNA aracılı mRNA bölünmesi işlemi sırasında RISC kompleksi	6
Şekil 2.3. siRNA molekülü	6
Şekil 2.4. mRNA kesimi	7
Şekil 2.5. STAT aktivasyonu	8
Şekil 2.6. İnorganik ve organik nanopartiküller	14
Şekil 2.7. Lipozomun yapısı ve çeşitleri	16
Şekil 2.8. Gen taşınmasında kullanılan katyonik lipitler	17
Şekil 2.9. DOTAP katyonik lipitinin yapısal formu	18
Şekil 2.10. Kitinin deasetilasyonu ve kitosan'ın kimyasal yapısı	24
Şekil 2.11. Kitosanın depolimerizasyonu ve kitooligosakkarit'in yapısı	24
Şekil 2.12. İnsan serum albümini amino asit sekans dizilimi	26
Şekil 2.13. SPARC proteinlerinin albümine spesifik bağlanması	27
Şekil 2.14. Albümin nanopartiküllerinin desolvasyon yöntemi ile hazırlanışı	28
Şekil 2.15. Gen taşıyıcı nanopartiküllerin hücre içine alım yolları	32
Şekil 5.1. A4 formülasyonunun SEM görüntüsü	58
Şekil 5.2. A4 formülasyonunun SEM görüntüsü	58
Şekil 5.3. K4, K4k ve A4 formülasyonlarının pH değerleri	59
Şekil 5.4. Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonlarının pH değerleri.....	60
Şekil 5.5. AD1 ve AD2 Formülasyonlarına adsorbe edilen albümin miktarı	61
Şekil 5.6. K4-Ad ve K4-En formülasyonuna adsorbe edilen albümin miktarı	62
Şekil 5.7. A4D1 ve A4D2 formülasyonun K4k çekirdeğine farklı miktarlarda DNA yüklenmesi	63
Şekil 5.8. A7 formülasyonlarına siRNA'nın bağlanma kapasitesi	66
Şekil 5.9. Ç2-siRNA, Ç2k-siRNA ve A7-siRNA formülasyonlarının serumla inkübasyonu	67

Şekil 5.10. K4 formülasyonunun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	68
Şekil 5.11. K4 formülasyonunun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	69
Şekil 5.12. A4 formülasyonu'nun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	69
Şekil 5.13. A4 formülasyonu'nun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	70
Şekil 5.14. K4 ve A4 formülasyonlarının 3T3 hücrelerindeki hücre canlılığı	70
Şekil 5.15. K4 ve A4 formülasyonlarının A549 hücrelerindeki hücre canlılığı	71
Şekil 5.16. Ç2 formülasyonu'nun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	72
Şekil 5.17. Ç2 formülasyonu'nun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	72
Şekil 5.18. Ç2k formülasyonu'nun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	73
Şekil 5.19. Ç2k formülasyonu'nun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	73
Şekil 5.20. A7 formülasyonu'nun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	73
Şekil 5.21. A7 formülasyonu'nun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	74
Şekil 5.22. Çıplak siRNA'nın 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	75
Şekil 5.23. Çıplak siRNA'nın A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	75
Şekil 5.24. Ç2-siRNA formülasyonunun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	76
Şekil 5.25. Ç2-siRNA formülasyonunun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	76
Şekil 5.26. Ç2k-siRNA formülasyonunun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	76
Şekil 5.27. Ç2k-siRNA formülasyonunun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	77
Şekil 5.28. A7-siRNA formülasyonunun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi	77
Şekil 5.29. A7-siRNA formülasyonunun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi	77
Şekil 5.30. Çıplak siRNA ve A7 formülasyonlarının 3T3 hücrelerindeki sitotoksite değerleri	78
Şekil 5.31. Çıplak siRNA ve A7 formülasyonlarının A549 hücrelerindeki sitotoksite değerleri	79
Şekil 5.32. 3T3 hücrelerinde Lipofectamine® 2000'in transfeksiyon görüntüsü	80
Şekil 5.33. A549 hücrelerinde Lipofectamine® 2000'in transfeksiyon görüntüsü	81
Şekil 5.34. 3T3 hücrelerinde Ç2-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü	81
Şekil 5.35. A549 hücrelerinde Ç2-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü	81

Şekil 5.36. 3T3 hücrelerinde Ç2k-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü	82
Şekil 5.37. A549 hücrelerinde Ç2k-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü	82
Şekil 5.38. 3T3 hücrelerinde A7-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü	82
Şekil 5.39. A549 hücrelerinde A7-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü	83
Şekil 5.40. 3T3 hücrelerinde çıplak FITC-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü	83
Şekil 5.41. A549 hücrelerinde çıplak FITC-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü	83

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABL	: Abelson Lösemi proteini
AS ODN	: Antisens Oligodeoksinükleotit
BCR	: Breakpoint-Cluster Region
BSA	: Bovin serum albümin
CDK	: Cyclin-Dependent Kinase (Sikline Bağımlı Kinaz)
CHS	: Chalcone synthase
CMV	: Sitomegalovirüs
CS	: Chitosan (Kitosan)
cSLN	: Cationic Solid Lipid Nanoparticles (Katyonik Katı Lipit Nanopartikülleri)
dak	: Dakika
Dc-Chol	: N,N-dimetil-N-etilkarboksamidokolesterol
DKM	: Diklorometan
DMD	: Duchene musküler distrofisi
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOGS	: Dioktadesilamidoglisil spermin
DOPE	: Dioleilfosfatidiletanolamin
DOPC	: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DOSPA	: (2,3-dioleiloksi-N-[2(spermin-karboksamido)etil] N,N-dimetil-1-propanaminyum- trifluoroasetat
DOTAP	: N-[1-(2,3-dioleiloksi) propil]-N,N,N- trimetilamonyum

DOTMA	: N-[1-(2,3-dioleiloksi) propil]-N,N,N trimetil amonyum klorür
DSPE-PEG 2000	: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine -N-[amino(polyethylene glycol)-2000]
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
EGF	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
FBS	: Fetal Bovin serum
FITC	: Floressein izotiyosiyanat
G-CSF	: Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör)
GFP	: Green Floresan Protein
IC50	: % 50 inhibisyon konsantrasyonu
IGF	: İnsulin Growth Factor (İnsülin Büyüme Faktörü)
JAK	: Janus Kinaz
KLN	: Katı Lipit Nanopartikül
LIF	: Leukemia Inhibitory Factor (Lösemi İnhibitör Faktörü)
Lipofectamin® 2000	: Piyasa ürünü katyonik lipozom
LUV	: Large Unilamer Vesicles (Büyük Tek Katlı Veziküller)
miRNA	: MikroRNA
MLV	: Multilammer Vesicles (Çok Katlı Veziküller)
mRNA	: Mesajcı RNA

MVL	: Multivesicular Liposomes (Çok Veziküllü Lipozomlar)
MTT	: 3-(4, 5-Dimetil-2-tiyazolil-2, 5-difenil -2H tetrazolyum bromür
NSCLC	: Non-Small Cell Lung Cancer (Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri)
Ort.	: Ortalama
PAMAM	: Poli(amidoamin)
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat sodyum klorür tamponu)
pDNA	: Plazmit DNA
PEG	: Polietilen glikol
PEI	: Polietilenimin
PI	: Polidisperslik indisi
PLGA	: Poli(D,L-laktit-ko-glikolit)
PLK1	: Polo-Like Kinaze1
PLL	: poli(L-lisin)
PMSF	: Fenil metan sülfonil florür
PPI	: Poli(propilenimin)
PTGS	: Post-transcriptional gene silencing (Transkripsiyon Sonrası Gen Susturulması)
PTX	: Paklitaksel
RISC	: RNA-Induced Silencing Complex (RNA ilişkili susturma kompleksi)
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA intereferans
SH	: Standart hata

siRNA	: Small interfering RNA (Küçük susturucu RNA)
SEM	: Scattering electron microscope (Girişimli elektron mikroskobu)
SMA	: Spinal musküler atrofi
SPARC	: Secreted Protein Acidic And Rich İn Cysteine (Asidik Ve Sistein Bakımından Zengin Olarak Salgılanan Protein)
STING	: Stimulator of Interferon Genes
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription (Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü)
SUV	: Small Unilamer Vesicles (Küçük Tek Katlı Veziküller)
TBE	: Tris-borik asit EDTA
TE	: Tris/EDTA
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
Tris-HCl	: Hidroklorik asit ile pH değeri ayarlanmış Tris çözeltisi
TE	: Tris-HCl ve EDTA içeren genetik madde çözeltisi
Tween® 80	: Polioksietilen-80-sorbitan monooleat
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gen tedavisi, genetik materyal kullanımı ile fonksiyonunu doğru bir biçimde yerine getiremeyen genlerin işlevselliklerini geri kazandırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu tedavi yönteminde genetik materyalin yeterli miktarda ve etkili olacak düzeyde hücre içine taşınması, taşınan genin tedavi sürecinde etkinliğini göstermeye devam etmesi, konakçı hücrenin taşıyıcı sistem ve genetik materyale cevabının organizma için uygun olması ve bu genin başka bir hastalığa neden olmaması istenmektedir.

Gen ekspresyonunun baskılanması, RNA interferans teknolojisi ile gerçekleştirilebilmektedir. Bir antisens teknolojisi olan RNA interferans daha önce kullanılan yöntemlere göre daha güvenilir, etkili ve spesifiktir. Bu yöntemle oldukça küçük dozlarda siRNA, spesifik olarak hedef gene bağlanıp protein üretimini inhibe etmekte ve gen ekspresyonunu baskılamaktadır.

Terapötik amaçla kullanılan genlerin hücreye aktarılmasında kullanılan vektörler, viral ve viral olmayan taşıyıcı sistemler olacak şekilde sınıflandırılmaktadır. Viral vektörlerin transfeksiyon etkisi daha yüksek olmasına rağmen mutasyon veya onkogenik etki yaratma olasılığı ve yüksek maliyetli olmaları, viral olmayan vektörlere yönelim sağlamıştır. Viral olmayan vektörler, üretilme ve saflaştırma kolaylığı, güvenilir ve kararlı olması, uygulanması kolay ve büyük boyutlarda da genetik materyal taşıması nedeniyle tercih edilmektedir. Viral olmayan vektörler olarak lipozomlar, lipitler, polimerler ve protein yapılar en sık kullanılan sistemlerdir.

İnsan fizyolojisine yabancı bir molekül olmayan albümin, çeşitli kaynaklardan elde edilebilen bir protein yapısıdır. İnsan vücudunda dolaşım sisteminde pek çok endojen molekülün ve ilacın bağlandığı bir yapıdır, parçalanma ürünlerinin de toksik olmaması ve immunojenik reaksiyon göstermemesi nedeni ile ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, siRNA genetik materyalini hücre içerisine taşıyabilecek, toksik etkisi az, biyoyumlu ve biyoçözünür özellikte olan, geni biyolojik ortamda enzimatik yıkımdan koruyabilecek protein yapıda taşıyıcı sistem tasarlanmaya çalışılmıştır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında kötü prognozunu belirteci olan STAT3 (sinyal ileticisi ve transkripsiyon 3 aktivatörü) geninin

baskılanarak kanser oluşumunun azaltılması hedeflenen bu taşıyıcı sistem olarak sığır serum albümini kullanılmıştır.

Bu çalışma kapsamında:

- Sığır serum albümini ile mikro ve nanopartikül sistemlerin hazırlanması.
- Sistemlere katyonik yük kazandırılması veya katyonik yükün artırılması.
- siRNA genetik materyalinin taşıyıcı sisteme adsorbsiyonu ve enkapsülasyonu oranının belirlenmesi
- Hazırlanan taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi
- Sistemlerin ve genetik materyalin, sağlıklı ve hasta hücrelerdeki etkinliklerinin araştırılması hedeflenmiştir.
- Eld edilen sonuçların inhaler uygulama için uygunluğunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antisens Teknolojisi

Antisens teknolojisi kavramı 1978’de, Zamecnick ve Stephenson tarafından antisens oligodeoksinükleotit (AS ODN) olarak bilinen tek iplikli DNA moleküllerinin keşfedilmesiyle ortaya çıkmıştır. İlk başta terapötik amaçlı DNA veya RNA’nın bütün olarak uygulanıp, hedef protein ekspresyonu bloke edilmiştir. Sonra AS ODN’ler tümör tedavisi için lokal olarak uygulanmıştır. Daha sonra başka bir katalitik oligonükleotit sınıfı olan ribozimler, gen ekspresyonunu araştırmak için yeni bir araç olarak ortaya çıkmıştır (Kher vd., 2011).

Antisens teknolojisinde sentetik olarak üretilen tamamlayıcı moleküller protein üretiminin son basamağını bloke etmek için messenger RNA (mRNA)’ya bağlanırlar. mRNA’ya bağlanan antisens ilaçlar hastalığa özgü proteinlerin üretimini inhibe etmiş olurlar. "Sens", DNA veya RNA molekülünün orijinal dizisini ifade eder. "Antisens", DNA veya RNA moleküllerinin tamamlayıcı dizisini ifade eder (Gupta vd., 2011).

Günümüze kadar, Amerikada FDA (Food and Drug Administration) dört antisens ilacını onaylamıştır. Bunlar; bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sitomegalovirüs (CMV) retinit tedavisi için Vitravene®, immün sistemi baskılanmış hastalarda homozigos familial hiperkolesteroleminin tedavisi için Kynamro®, duchenne musküler distrofisi (DMD) tedavisi için Exondys51® ve spinal musküler atrofinin (SMA) tedavisi için Spinraza®. Bu başarılı klinik çalışmalar, AS ODN’lerin hedef mRNA’lar üzerinde etkili bir şekilde fonksiyon gösterip çeşitli hastalıkların üstesinden geldiğini ve kullanımlarının kapsamını göstermektedir (Le vd., 2018).

1992 yılında Fire ve arkadaşları RNAi mekanizmasını AS ODN’lerin hedef mRNA’nın yıkımını sağlayan etki mekanizması olarak tanımlamıştır (Kher vd., 2011).

2.1.1. RNA interferans

RNA İnterferans (RNAi), çift sarmallı RNA (double-stranded RNA, dsRNA) kullanılarak hedef mRNA’nın kırılmasına yol açan bir mekanizmayı temsil eder. Diziye özgü bir şekilde işleyen RNAi, gen baskılanması noktasında oldukça etkili bir yöntem olarak kendini gösterir (Farrel, 2017). RNAi, çok hücreli biyolojik sistemlerde doğal ve evrimsel olarak yüksek düzeyde korunarak gelmiş bir mekanizmadır. Hücresel

savunmada rol alan RNAi, hücreyi istenmeyen gen dizilerinin tekrarlanmasından, virüs kalıtım materyali ve transpozon gibi hareketli genetik faktörlerden korur. (Uprichard, 2005).

RNAi mekanizması ile ilgili ilk bulgular 1980'lerin sonlarına doğru bitkilerde yapılan genetik düzenlemeler aracılığıyla keşfedilmiştir. Chalcone synthase (CHS) geni aktarılarak petunya bitkisinde pigmentasyonu katalizleyen enzimlerin bitkinin mor renge dönüşmesini sağlayan etkisi arttırılmak istenmiş ama beklenen etkinin tersi gözlemlenmiş ve petunyalarda alacalı bir renklenme oluşmuştur. Daha sonra Jorgensen ve arkadaşları petunya çiçeklerini incelemeye almışlar ve bu durumu transkripsiyon sonrası gen susturulması (post-transcriptional gene silencing, PTGS) olarak tanımlamışlardır (Karagüzel vd., 2007).

Petunya bitkisine benzer şekilde PTGS mekanizmasının gözlemlendiği bir diğer yapı *Neurospora crassa* fungusu olmuştur. "Quelling" olarak adlandırılan bu olayda fungusun turuncu renk pigmentasyonu etkileyen albino1 (al1) geninin mRNA'sında önemli miktarda azalış gözlemlenmiştir (Romano ve Macino, 1992).

Daha sonra 1998 senesinde Andrew Fire ve Craig Mello isimli iki araştırmacı RNAi mekanizmasının varlığını *Ceanorhabditis elegans* isimli bir solucan türünde göstermişlerdir. Sens ve antisens RNA'nın sinerjik etkisini ölçmek amacıyla *C. elegans*'a dsRNA enjekte edilip gen düzenlenmesi üzerindeki etkisini incelemek istemişlerdir. Bu yöntemin sens ve antisens RNA'ya kıyasla 10 kat daha etkili olduğu tespit edilmiştir. *C. elegans*'a kas kasılmasında etkili olan genin belirli bir dizisine özgü dsRNA moleküllerini enjekte etmeleri sonucu gözlemledikleri kas hareketlerindeki artış ile RNAi mekanizmasının çalışma biçiminin birçok ökaryotik canlıda benzer olduğunu göstermişlerdir (Fire vd., 1998).

RNAi, 2001 yılında *Science* dergisinde "yılın molekülü" olarak seçilirken 2002'de "yılın en önemli bilimsel hamlesi" olarak görülmüştür. 2006 yılında ise Andrew Fire ve Craig Mello'nun isimli araştırmacıların *C. elegans*'ta RNAi varlığını ortaya koymaları nedeniyle Nobel Tıp ödülünü almışlardır (Koç ve Oğuzoğlu, 2015).

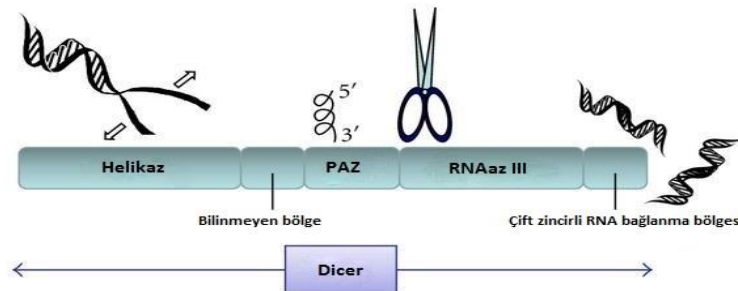
2.1.2. RNAi mekanizması

RNAi mekanizması mRNA aşamasında gen ifadesinin sonlandırılması ile sonuçlanan bir kontrol mekanizmasıdır. İki önemli adımda gerçekleşir; İlk adım; uzun

dsRNA'ların 21-23 nükleotitli RNA fragmentlerine (siRNA ve miRNA, mikroRNA) ayrılması. İkinci adım ise; RISC (RNA-Induced Silencing Complex) molekülünün yapısına dahil olan siRNA'nın öncülüğünde tamamlayıcı mRNA'nın belirlenmesi ve yıkılması işlemidir (Aigner, 2006; Koç ve Oğuzoğlu, 2015).

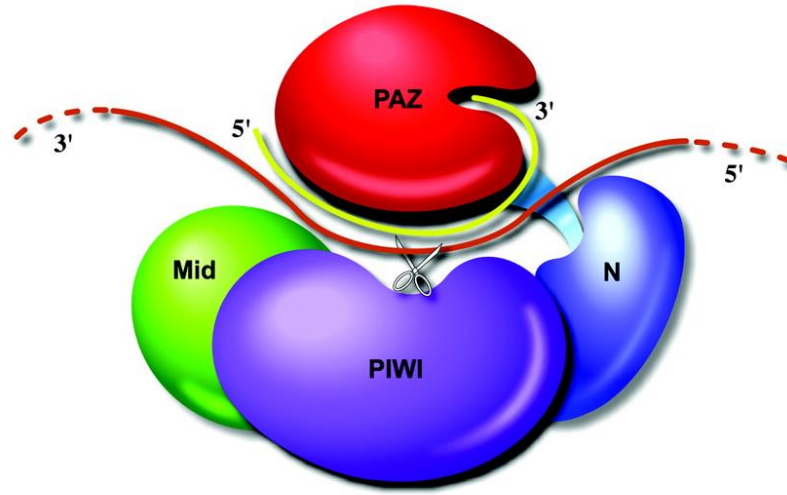
RNAi çalışmalarında yaygın şekilde kullanılan, protein yapımında katkısı olmayan iki çeşit RNA'nın (siRNA ve miRNA) sentezlenip, olgun yapılara dönüşmeleri ortak bir süreçten geçmesine rağmen aralarında bazı farklar vardır. siRNA'lar ökaryotik canlılarda ve memelilerde mevcut iken, miRNA'lar sadece memelilerde bulunmaktadır. siRNA'lar sentetik yapılardır, hedef sekanslarla tam eşleşme sağlarlar, miRNA'lar genom kaynaklıdır ve tam eşleşme gerçekleştiremezler (Şenel, 2012).

Bu mekanizma çalışırken 2 tane başlıca moleküler yapı oldukça önemli roller almaktadır. Bunlardan birisi RNase III familyası enzimi olan “Dicer” enzimi, diğeri ise nükleaz aktiviteli multiprotein kompleksi olan “RISC” molekülüdür. Meyve sineği'nden (*Drosophila melanogaster*) izole edilen Dicer, dsRNase aktivitesi ile çift sarmallı RNA'ların siRNA'lara kesilmesi işlemini gerçekleştirir. Dicer enzimi ayrıca siRNA moleküllerinin RISC kompleksine taşınmasında da görev almaktadır (Bodak vd., 2017). Dicer enzimi, dört çeşit domaine sahiptir: N-terminal helikaz domaini, PAZ domaini (Piwi-Argonaute-Zwille proteinleri barındıran domain), iki adet RNase III domaini ve C-terminal dsRNA bağlanma bölgesi (dsRBD domain). Ayrıca işlevi tam olarak tespit edilememiş DUF 283 isimli bir domaine de sahiptir (Şekil 2.1) (Jaronczyk vd., 2005).



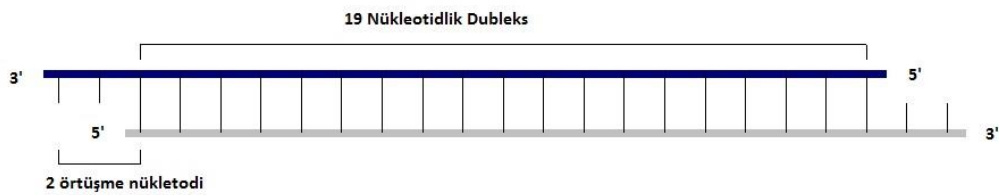
Şekil 2.1. Dicer enziminin şematik gösterimi (<http-1>).

RISC molekülü ise Dicer enzimiyle oluşturulan siRNA'ya bağlanıp uygun zincir yapısını bünyesinde barındırarak hedef mRNA'nın kesilmesi işlemine aracılık eder. RISC kompleksi yapısında endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimlerini barındırır ve protein yapısı Argonaute protein sınıfına dahildir (Wadhwa vd., 2004). Argonaute proteinleri evrimsel olarak iyi korunmuş PAZ ve PIWI isimli iki domainden oluşmaktadır (Şekil 2.2). Hedef mRNA'nın kesilmesi için rehber zincir olan siRNA argonaute proteinlerinden PAZ domainine bağlanır ve mRNA'nın parçalanması işlemi PIWI domeni üzerinden gerçekleşir (Höck ve Meister, 2008).



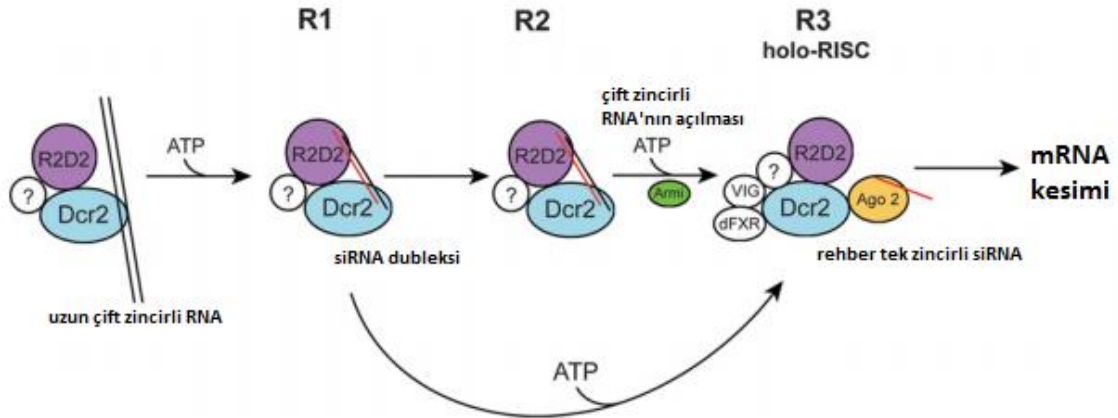
Şekil 2.2. siRNA aracılı mRNA bölünmesi işlemi sırasında RISC kompleksi'nin şematik gösterimi (Song vd 2004).

Hücre içerisinde sentezlenmiş olan uzun çift zincirli RNA, dicer enzimine PAZ domaini üzerinden bağlanıp, RNase III'ün katalitik aktifleşmesi sonucu 3'OH ucundan iki nükleotitlik çıkıntı kalacak şekilde 21-23 nükleotitlik siRNA molekülüne kırılır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. 3'OH üzerinden 2 baz çifti sarkan, 19 nükleotit çift sarmal yapıda siRNA molekülü (http-2).

Efektör evresinde siRNA molekülü, rehber zincirinin 3'OH ucundan Dicer enzimiyle bağlantılı R2D2'ye bağlanırken, dupleksin diğer ucundan Dcr-2'ye bağlanır. Dcr-2/R2D2 yapısı daha sonra siRNA'yı RISC molekülünün bileşeni olan Ago2'ye taşır. siRNA'nın taşınması işlemi çift zincirli olarak gerçekleşmektedir ve mRNA'nın kırılması için gerekli olan siRNA'nın rehber zincirinin diğer zincirden ayrılması işlemi Ago2 proteini tarafından gerçekleştirilir. Bu olay ATP'ye bağlı bir reaksiyon ile meydana gelir. Ayrılma işlemi sonrasında aktif hale gelen rehber zincir RISC kompleksinde Ago2 üzerinde kalır ve mRNA'nın parçalanması işlemine aracılık eder. (Şekil 2.4). mRNA molekülüne yönelik RISC kompleksinde, rehber zincirin 3'OH ucu argonaute proteinlerinden PAZ domainine bağlanırken 5'PO₄ ucu ise PIWI domainine bağlanır. RNase H ve endonükleaz V gibi endonükleazlara benzer yapıda olan PIWI domaini mRNA'yı rehber zincirin 5' ucundan ölçerek 10. ve 11. nükleotitler arasındaki fosfodiester bağını endonükleolitik olarak keser. Fragmentlerine ayrılmış olan mRNA, ATP kullanılan bir reaksiyon ile RISC molekülünden ayrılır (Hutvagner, 2005; Jaronczyk vd., 2005).



Şekil 2.4. mRNA kesimi:

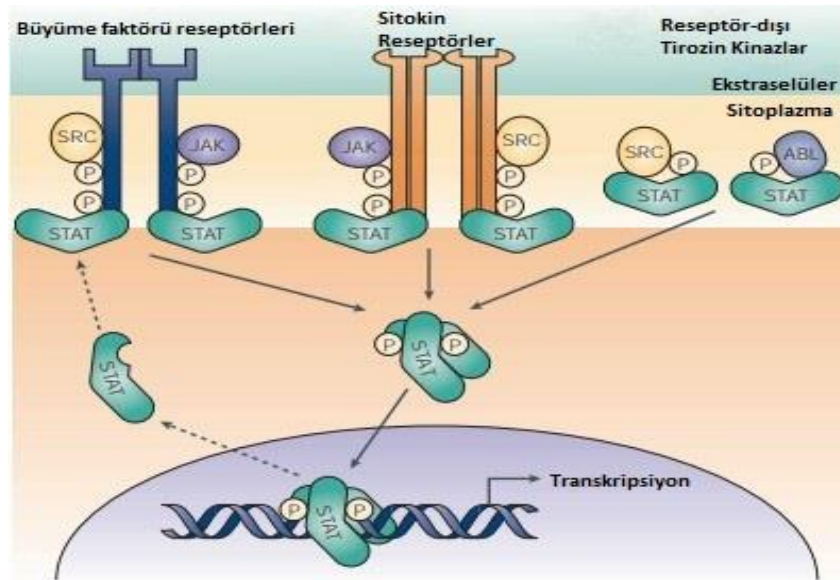
- R1: Dcr-2/R2D2 bileşimi aracılığıyla dsRNA'dan siRNA elde edilir.
- R2: R1'den türeyen ve R3'e olgunlaşan siRNA dupleksinin çözülmesinde işlev gördüğü düşünülen aşamadır.
- R3: Ago2 üzerinden rehber zincir aracılığıyla mRNA'nın kırılması işlemi gerçekleşir. (Jaronczyk vd., 2005).

2.2. Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) proteinleri

Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü (STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription) proteinleri, hücre çekirdeğinde DNA'ya müdahale ederek transkripsiyon aşamasında fonksiyon gösteren yapılardır (Yu ve Jove, 2004). Tirozin fosforilasyonuna uğrayarak aktifleşen STAT'lar dimerize olup çekirdeğe taşınırlar ve hedef genin promotör bölgesine bağlanarak gen ekspresyonunda değişikliklere sebep olurlar (Şekil 2.5) (William, 1999).

STAT'lar hücrel farklılaşma, bağışıklık, proliferasyon ve apoptoz gibi birçok hücrel fonksiyonlarda görev alan proteinlerin ekspresyonunda görev almaktadır. STAT protein ailesi yedi üyeden oluşmaktadır: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6.

Bu proteinlerden STAT3 ve STAT5'in bloke edilmesi tümör hücrelerinde apoptoza neden olduğuna dair birçok çalışma mevcuttur (Yu ve Jove, 2004). STAT3 proteini ayrıca tümörlü bölgede gerçekleşen anjiyogenez ve immün sistemin çalışması gibi hücre dışı faktörlerde de oldukça önemli rolü vardır.



Şekil 2.5. STAT'ın büyüme faktörü ve sitokin reseptörlerine bağlanmasıyla oluşan aktivasyonu. (Yu ve Jove, 2004).

Büyüme faktörü ve sitokinlerin kendi reseptörlerine bağlanmaları sonucu Janus Kinaz (JAK) ve SRC gibi reseptöre bağlı kinazların aktivasyonu gerçekleşir. Bu tirozin

kinazlar reseptörün kuyruğunu fosforile ederek STAT'ların fosforilasyonu işlemini başlatırlar. Ayrıca SRC ve BCR-ABL (Breakpoint-Cluster Region ve Abelson Lösemi proteinlerinin sonucu oluşan şimer) onkoproteinleri de reseptör uyarılmasına ihtiyaç duymadan STAT'ları fosforile edebilirler. Fosforile olan STAT'lar dimerleşerek nükleusa taşınır ve gen ekspresyonunda görev alırlar (Yu ve Jove, 2004).

2.2.1. STAT3 proteini ve onkojenez

STAT3 proteini interlökin-6 ailesinin üyelerinin (interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), lösemi inhibe edici faktör (leukemia inhibitory factor, LIF)) de dahil olduğu sitokin reseptörleri, granülosit koloni stimulan faktör (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), leptin, epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF) gibi birçok sitokin ve büyüme faktörü tarafından aktiveleştirilebilir (Takeda vd., 1997).

STAT3'ün aktifleşmesi kanser oluşumu esnasındaki malign hücresel dönüşümü, hücre proliferasyonunu, hastalığın tümör hücresinden extraselüler ortama invazyonunu, kanser metastazında gerçekleşen hücresel göçü, tümör hücresini immün sistemden korumasını ve hücre intravazasyonu, tümörlü bölgede gerçekleşen anjiyogenezi artırırken, hücre apoptozu azaltıcı yönde etki eder. Ayrıca T-hücreleri, dentritik hücreler ve makrofajlar gibi immün-supresif ajanlara ve hücrelerin de çalışma fonksiyonlarını azaltarak tümörlü bölgedeki immün sistemin etkili bir şekilde çalışmasına engel olur (Kamran vd., 2013). STAT3 proteinin aktifleşmesinin tümör oluşumunda rolleri olan çeşitli ajanlar, hücre ve yolaklar üzerindeki etkisi aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Birçok JAK inhibitörü kanser tedavisinde kullanılmak için geliştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi de JAK2 inhibitörü AZD1480, STAT3 aktivasyonunu küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) de dahil olduğu birçok kanser türünde bloke ettiği görülmüştür. Jak1/2 inhibitörü ruxolitinib'in çıplak farelere ksenograflanmış NSCLC hücrelerinin büyümesini ciddi oranda azaltma görülmüştür. Ayrıca sh/siRNA'nın immün yetmezliği olan farelere verilmesi tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Dutta vd., 2014).

Bir çalışmada; STAT3 siRNA kullanılarak STAT3 ve STING (Stimulator of Interferon Genes) immün yolaklarının inhibe edilmesiyle 4T1 farelerinde tümör çevresinde CD8⁺ T hücreleri artırılıp, T hücreleri (Treg) ve miyeloid türevli baskılayıcı

hücreleri azaltılarak tümör büyümesinde belirgin azalma gözlemlenmiştir (Pei vd., 2019).

2.2.2. STAT3'ün hücre büyümesi ve sağkalımdaki rolü

Tümör gelişimi, kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, apoptoza direnç göstermesi, anjiyogenezin sürdürmesi ve immün sistemin kontrolünden kaçınmasıyla gerçekleşmektedir. STAT3, çok sayıda insan kanserinde yapısal olarak aktive edildiği görülmüştür ve bu süreçlerin düzenlenmesine dahil olur. Hem STAT3 hem STAT5'in kontrolsüz hücre çoğalması ve hayatta kalım için gerekli olan genlerin ekspresyonuna doğrudan veya dolaylı olarak müdahale ettiği gösterilmiştir. Bunlar, c-MYC, siklin D1 ve siklin D2, BCL-XL, MCL1 ve survivin'i kodlayan genleri içerir. STAT3, hücre proliferasyonunu inhibe etme ve apoptozu indüklemeye görev alan p53 proteininin ekspresyonunu negatif olarak düzenlemektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF) ekspresyonunda da anahtar bir rolü olan STAT3 tümör anjiyogenezini düzenlemeye görev almaktadır (**Tablo 2.1**). Ayrıca STAT3 pro-enflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunu bloke ederek ve immün reaksiyonların baskılanmasını sağlayan tümör faktörlerinin ekspresyonunu indükleyerek tümörün immün sistem tarafından kaçınmasını sağlar (Yu ve Jove, 2004).

Tablo 2.1. *STAT3 proteininin etki ettiği metabolik faktörler*

Fonksiyon	Proliferasyon ve Sağkalım	Anjiyogenez	İmmün-supresif Etki
STAT3 tarafından düzenlenen yapılar	↑MYC	↑VEGF	↑IL-6
	↑Cyclin D1/D2	↑HGF	↑IL-10
	↑BCL-XL	↑bFGF	↑TGFβ
	↑MCL1	↑HIF1α	↑VEGF
	↑Survivin	↑MMP2	↓IFNβ
	↓p53	↓IL-12	↓IFNγ
		↓IFNβ	↓IL-12
		↓IFNγ	↓CXCL10
		↓CXCL10	↓CCL5
		↓p53	↓MHC Class II
		↓AKT	↓CD80
			↓CD86

AKT, timoma viral proto-onkogen 1; BCL-XL, B-hücreli lenfoma-2 benzeri 1; bFGF, basit fibroblast büyüme faktörü; CCL5, CC-kemokin ligandı 5; CXCL10, CXC-kemokin ligandı 10; HGF, hepatosit

büyüme faktörü; HIF1 α , hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α ; IFN, interferon; IL, interlökin; MCL1, miyeloid hücre lösemi dizisi 1; MMP, matris metaloproteinaz; MYC, v-myc miyelositomatoz viral ilişkili onkojen; STAT3, sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 3; TGF β , dönüştürücü büyüme faktörü - β ; TNF, tümör nekroz faktörü; VEGF, vasküler endotel büyüme faktörü (Yu vd., 2007).

2.3. siRNA'nın fonksiyonu ve etki mekanizması

siRNA terapötiklerinin kanser tedavisinde kullanılmasıdaki temel strateji, fonksiyon kaybı oluşturmaktır. Bu, hücrelerdeki hedef protein ekspresyonunu sınırlayarak veya önleyerek kanser hücrelerinin proliferasyonunu değiştirerek elde edilir. siRNA'nın sahip olduğu bir diğer avantaj ise DNA'ya dahil olmamasıdır. Bu sebepten genomu kalıcı olarak değiştirmez. Dolayısıyla siRNA tedavisi herhangi bir aşamada kolaylıkla durdurulabilir ve kontrol edilebilir, bu nedenle düzenleme ve güvenlik gibi parametreler için kritik bir faktöre sahiptir (Young vd., 2016).

RNAi, kontrolsüz hücre proliferasyonunu yöneten faktörlere karşı kullanılabilir. Örneğin siklinler ve sikline bağımlı büyüme faktörleri (cyclin-dependent kinases, CDKs) hücre döngüsündeki kontrol noktalarını düzenlerler ve kanser gelişiminde rol alırlar. Proliferasyon sinyalleri, insülin büyüme faktörü (insulin growth factor, IGF) gibi büyüme araçları tarafından üretilirler, hücre çoğalmasını, bölünmesini ve hayatta kalmasını destekleyen hücre içi kaskadları aktive ederler. Anjiyogenez, kanserin ilerlemesi için kritik bir faktördür, tümör büyümesi, besinleri sağlamak için zengin bir vasküler kaynağı gerektirir. Anjiyogenez olmadan, kanser büyümesi çapı 2 mm ile sınırlı olacaktır. Bu nedenle tümör büyümesi, vasküler endotel büyüme faktörleri (vascular endothelium growth factors, VEGFs) tarafından teşvik edilen anjiyogenik mekanizmanın inhibe edilmesiyle kontrol altına alınabilir (Young vd., 2016).

2.4. siRNA'nın Hücre İçine Taşınmasında Kullanılan Sistemler

siRNA'nın sistemik uygulanması sırasında hedef bölgeye ulaşmaya kadar karşılaşılabilecek engellerin üstesinden gelebilmek için bir taşıyıcı sistem gereklidir. Çıplak siRNA serum ve doku nükleazları tarafından parçalanır, böbrek yolu ile atılır veya makrofajlar tarafından alınırlar. Bu sebepten hedef dokuya ulaşamaz ve fonksiyonunu yerine getiremez. Kullanılacak taşıyıcı sistem; siRNA'nın kan dolaşımındaki dolaşım süresini uzatmalı ve siRNA'yı enzimatik veya kimyasal bozunmalardan kaynaklı inaktivasyonlardan, eliminasyondan korumalıdır. Böylelikle

siRNA'nın kandaki kararlılığını sağlanmış olur. Ayrıca aktif veya pasif hedeflendirme sağlayarak siRNA'nın hedef doku ve hücrelere ulaşmasını sağlayıp, hücre içine alımında ve sitoplazmaya verilmesinde rol alması da istenir. Böylelikle siRNA'nın protein sentezini inhibe edecek RNA interferans fonksiyonu sağlanmış olur (David vd., 2010).

siRNA bazlı tedavilerin sistemik uygulamalarında en büyük zorluk siRNA'nın taşıyıcı sistemle dağıtımıdır. siRNA'nın etkili olabilecekleri ve gen susturmalarını indükleyebilecekleri hedef hücrenin sitoplazmasına ulaşmalarına yardımcı olmak için farklı gen taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Bunlar viral ve viral olmayan taşıyıcı sistemler olmak üzere iki ana gruba ayrılmışlardır (Li vd., 2006).

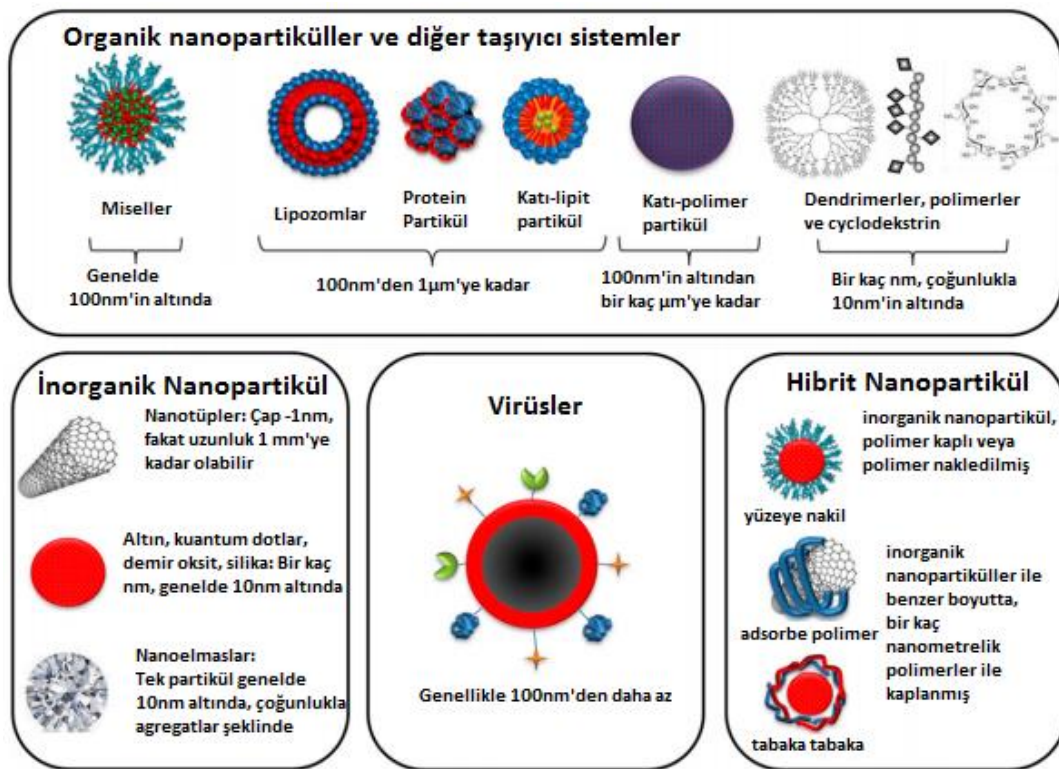
Virüsler uzun yıllar boyunca geçirdikleri evrim sonucunda konakçı bir hücreyi enfekte edebilecek biyolojik forma ulaşmışlardır. Bu işlemi, taşıdıkları genetik materyali hücreye ulaşana kadar koruyarak ve genlerini konakçı hücreye aktararak gerçekleştirirler. Genetik materyalin virüs tarafından taşınması genellikle zararsız kabul edilmektedir. Viral hastalıkların kaynağı olarak, virüsün taşıdığı genin hastalık yapıcı bir sekansı veya taşınan genin tamamı gösterilmektedir. Bu durum virüslerin genetik materyal taşıyıcısı olarak gen tedavisinde kullanabileceğini fikrini ortaya çıkarmıştır (Nance ve Duan, 2018).

Gen tedavisi için kullanılan virüslerin laboratuvar ortamında patojenite fonksiyonları ortadan kaldırılmış, gen aktarım özellikleri korunmuştur. Diğer yöntemlerle transfeksiyonu zor olan hücrelerde, hatta bölünmeyen hücrelerde bile kullanılmaları büyük avantajlar sağlamaktadır. Buna rağmen üretimlerinin zor olması, toksik etki oluşturmaları, immün yanıt sağlamaları ve sınırlı miktarda genetik materyal taşımalarından dolayı yaygın şekilde kullanılmazlar. Gen tedavisi amacıyla kullanılan viral taşıyıcı sistemler başlıca; retroviral vektörler, adenoviral vektörler, adeno-ilişkili viral vektörler, lentiviral vektörler, herpes simplex virüsü ve poxvirüstür (Nance ve Duan, 2018; Ryu, 2017; Merten ve Gaillet, 2016).

Viral taşıyıcıların genetik materyali istenen hedef doku ve hücrelere taşıma kapasitesi oldukça iyi kabul edilmektedir. Buna rağmen viral olmayan taşıyıcıların toksik olmaması, yüksek miktarlarda genetik materyal yükleme kapasiteleri olması, uygun kimyasal yapıları sayesinde etkin kullanılabilmeleri, üretimlerinin kolay olması gibi

özellikleri sayesinde araştırmacıların ilgisini çeken taşıyıcı sistemler olmuştur (Guo ve Huang, 2011).

Viral olmayan taşıyıcılar, inorganik/sert ve organik/yumuşak nanopartiküller şeklinde sınıflandırılabilir. Çoğu zaman sert nanopartiküller sulu çözelti içinde çözünürlüklerini attırmak için polimerler gibi organik malzemelerle kaplanır. Özellikle çoklu kaplama yapılarak elde edilen sistemler bu grubu oluşturur, her iki kategorinin özelliklerini taşırlar ve sınıflandırmaları zordur (Young vd., 2016).



Şekil 2.6. İnorganik ve organik sınıflara dahil çeşitli nanopartikül türleri (Tatipari vd., 2017).

2.4.1. İnorganik viral olmayan taşıyıcı sistemler

İnorganik nanopartiküller çoğunlukla non-biyodegradabl özellikte olup biyolojik olarak parçalanamazlar (Young vd., 2016). Çoğunluğunu asal metallerin (altın Au, gümüş Ag, platin Pt) ve metal oksitlerin (seryum oksit CeO₂, çinko oksit ZnO₂) oluşturduğu nanopartiküller bu sınıfa dahildir (Kim ve Hyeon, 2013). Bu sınıfa dahil sistemler içerisinde en çok altın ve gümüş nanopartiküller kullanılmaktadır.

Song ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; polietilenimin (PEI) kaplı altın nanopartiküllerini siRNA ile elektrostatik etkileşim sağlayarak taşıyıcı sistem olarak kullanmışlardır. MDA-MB-435s hücrelerinde yaptıkları çalışmada endojen hücre döngüsü kinazı olan polo-like kinaze1 (PLK1) hedefleyen siRNA/PEI-AuNP önemli miktarda gen ekspresyonu yıkımı ve arttırılmış hücre ölümü göstermiştir (Song vd., 2010).

Bir başka çalışmada ise entovirüs71 (EV71) kaynaklı el, ayak ve ağız hastalığında (hand, foot, mouth disease, HFMD) yeni bir tedavi yöntemi olarak PEI ve siRNA'nın gümüş nanopartikülleri ile taşınarak antiviral terapötik etki sağlanmıştır. Araştırmalar doğrultusunda PEI/siRNA/AgNP'leri konakçı hücreye bulaşmadan DNA fragmentasyonunu, kromatin yoğunlaşmasını ve kaspaz3 aktivasyonunu önleyebildiği tespit edilmiştir. Elde edilen MTT ve TEM görüntülerine göre, EV71 enfeksiyonuna karşı belirgin inhibasyon gözlemlenmiştir (Li vd., 2017).

2.4.2. Organik viral olmayan taşıyıcı sistemler

Biyolojik olarak parçalanmayan materyallerin vücutta oluşturduğu rahatsızlıkların yanı sıra, karaciğer ve dalakta gösterdiği toksisite de, taşıyıcı sistemlerin biyoparçalanabilir özellik taşıması gereksinimini doğurmuş ve inorganik nanopartiküllerin yerine organik taşıyıcı sistemlerin tercih edilmesini sağlamıştır. Biyoparçalanma mekanizması çoğunlukla taşıyıcı materyalin özelliklerine bağlıdır (Felice vd., 2014).

Organik nanopartiküller doğal veya sentetik bir kanyaktan olabilen organik bir malzeme ile hazırlanan nanopartiküllerdir (Romero ve Moya, 2012). Organik nanopartiküllerden lipidik yapıda olan lipozomlar, katı-lipit nanopartiküller ve polimerik yapıda olan polimerler, protein/peptit yapılar en çok kullanılanlar arasındadır.

2.4.2.1. Çıplak siRNA

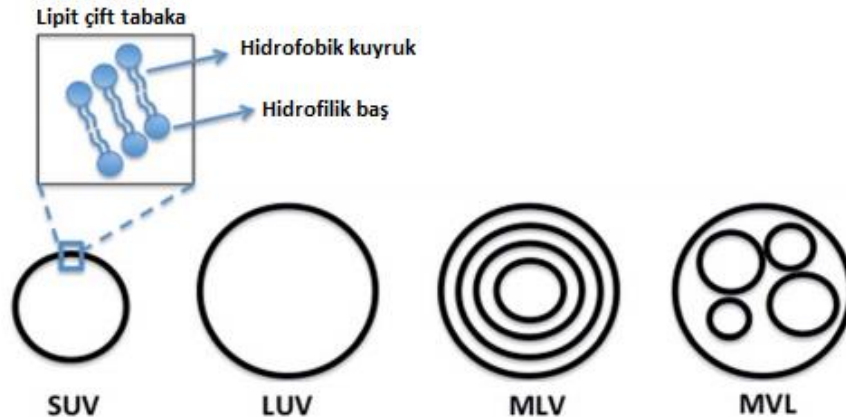
Çıplak siRNA veya formüle edilmemiş siRNA viral olmayan taşıyıcı sistemlere dahil olsa da herhangi bir vektör kullanılmadan gerçekleştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde siRNA'nın tuz formunda veya %5'lik dekstroz gibi basit yardımcı maddelerle uygulanmasından bahsedilir (Şenel, 2012).

Büyük molekül ağırlıkları (~13 kDa) ve siRNA fosfodiester yapısının anyonik (~40 negatif fosfat yükü) olması, çıplak siRNA'nın hücre zarından geçişini oldukça zorlaştırmaktadır. Bunun yanında yarı ömürlerinin kısa olması da siRNA'nın taşınmasında bir vektör kullanılması gerekliliğini doğurmaktadır (Kim ve Kim, 2009).

2.4.2.2. Lipozomlar

Lipozomlar, iç kısımda sulu fazdan oluşan çekirdeği ile organik lipidlerden meydana gelen iki veya çok katmanlı veziküllerdir. Katman sayılarına ve büyüklüklerine göre küçük tek katlı veziküller (small unilamer vesicles, SUV), büyük tek katlı veziküller (large unilamer vesicles, LUV), çok katlı veziküller (multilamellar vesicles, MLV) ve çok veziküllü lipozomlar (multivesicular liposomes, MVL) olacak şekilde 4 çeşittir (Şekil 2.7) (Salim vd., 2014).

Katyonik ve nötr lipozom olmak üzereye ikiye ayrılırlar. Nötr lipozomlar, katyonik lipozomlara göre daha biyo-uyumlu ve daha üstün farmakokinetik özellikler taşımalarına rağmen, formülasyon hazırlama çalışmalarında nötr yapıları anyonik özellikteki nükleotitler ile etkileşime giremediği için genetik materyali tutma verimlilikleri daha düşüktür (Lee vd., 2013).



Şekil 2.7. Lipozomun yapısı ve çeşitleri (Salim vd., 2014).

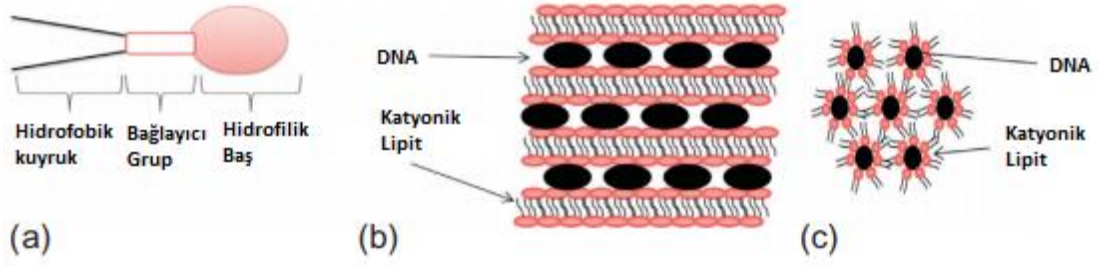
Nötr lipozomların oluşumunda kullanılan nötral lipidlerden biri olan 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, DOPC) antisens oligonükleotitlerin *in vivo* taşınmasında kullanılmıştır. Bu çalışmada EphA2 genine hedeflenmiş siRNA'nın DOPC ile taşınmasındaki etkinliği ve uygulanabilirliği araştırılmak istenmiştir. Yumurtalık kanseri ksenograft fare modelinde yapılan

çalışmada elde edilen sonuçlarda tümörlü bölgede protein üretiminde ve tümör gelişiminde önemli derecede azalma gözlemlenmiştir (Landen vd., 2005).

Yardımcı lipitler (helper lipits) veya füzojenik lipitler (fusogenic lipits) olarak da adlandırılan bazı nötral lipitler, lipoplekslerin transfeksiyon etkinliğini arttırmada rol oynar. Bunlar arasında en çok kullanılanlar kolesterol ve dioleil fosfatidiletanolamindir (dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE). DOPE'nin pozitif elektriksel yüzey yükünü azaltması lipozomların kararlılığında azalmaya dolayısıyla agregasyona ve transfeksiyon etkinliğinde azalmaya sebep olmaktadır. Bu durum kolesterolün transfeksiyon etkinliğinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Hirsch-Lerner vd., 2005; Balazs ve Godbey, 2011).

Lipopleksler katyonik lipitler ile oluşturulmuş lipozomların negatif yüklü siRNA ile etkileşmesi sonucu oluşan komplekslerdir. Katyonik lipozomlar siRNA'yı etkin bir şekilde enkapsüle etmesine rağmen, hücre içindeki kararlılıkları ve siRNA'nın salımı ile ilgili sorunlar gözlenmesi nedeniyle düşük başarı göstermişlerdir. Katyonik lipozomların in vivo kullanımında, doza bağımlı toksisite ve pulmoner enflamasyon tespit edilmiştir. Bu durum çok değerlikli katyonik lipitlerde tek değerlikli katyonik lipitlerden daha fazla gözlenmiştir (Lee vd., 2013).

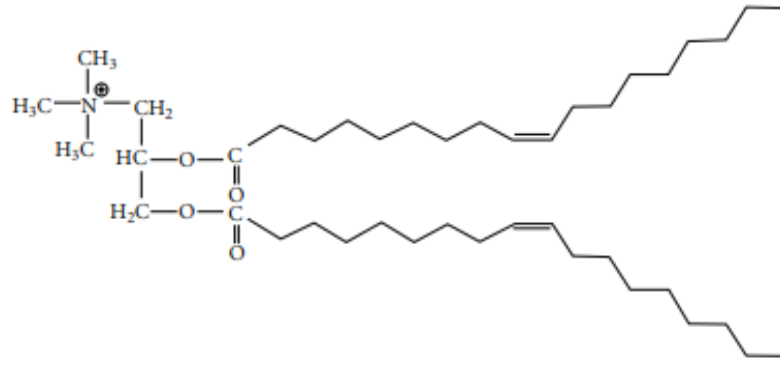
Katyonik lipozomların oluşumunda rol alan katyonik lipitler ise, bir hidrofilik baş bölgesi ve bir hidrofobik kuyruk kısmından oluşan amfifilik moleküllerdir (**Şekil 2.8**). Hidrofobik grup bir veya iki yağ asidi ya da değişken bir karbon zincirinin alkil kısımları olabilir. Bu hidrofobik kısımlar katyonik amin baş bölgesine bağlanır ve iki katlı veziküller oluşturarak kuyruk kısımlarını sulu fazdan korumuş olurlar. Hidrofilik baş bölgesi ve hidrofobik kuyruk bölgesi bir birlerine bağlayıcı bölge (linker group) aracılığı ile bağlanırlar. Katyonik amin baş bölgeleri ise genetik materyale elektrostatik olarak bağlanıp küçük taşınabilir veziküller oluştururlar (**Şekil 2.8**) (Thapa ve Narain, 2016).



Şekil 2.8. Gen taşınmasında kullanılan katyonik lipidlerin genel yapısı (a), Lipoplekslerin oluşumu sırasında tek tabakalı (b) ve içe dönük formda (c) yapısal formları (Thapa ve Narain, 2016).

Tek değerlikli katyonik lipidlerden biri olan N-[1-(2,3-dioleyoksi)propil]-N, N,N-trimetilamonyumklorür (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA) gen taşıyıcı amaçlı ticari olarak ilk sentezlenen katyonik lipidlerden birisidir. DOTMA'nın hücre kültürü *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında gösterdiği başarı sayesinde içinde DOTAP'ın da bulunduğu birçok katyonik lipidin geliştirilmesi ve formülasyon hazırlamada kullanımları söz konusudur (Balazs ve Godbey, 2011).

Bir diğer tek değerlikli katyonik lipid [1,2-bis(oleoiloksi)-3-(trimetilamonyo)propan] ([1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane], DOTAP) ise kuaterner amin formunda bir baş bölgesi ve iki adet oleoil zinciri olan bir gliserol omurgasına sahiptir. Bu molekülün DOTMA'dan tek farkı baş bölgesini kuyruk kısmına bağlayan yapıların eter bağları yerine ester bağları olmasıdır. (Şekil 2.9) İlk başta ester bağlarının hidrolize olabilmeleri, lipiti biyolojik olarak parçalanabilir hale getireceği ve daha az sitotoksik etki göstereceği düşünülse de yapılan çalışmalar her iki lipidin de transfeksiyon etkinlikleri ve sitotoksikite seviyelerinde pek bir fark olmadığını göstermiştir (Balazs ve Godbey, 2011). DOTAP katyonik lipidi lipozom hazırlanmasında tek başına kullanıldığı gibi DOPE ve/veya kolesterol gibi yardımcı nötral lipidlerle birlikte kullanılmaktadır (Pedroso de Lima vd., 2001).



Şekil 2.9. DOTAP katyonik lipitinin yapısal formu (Balazs ve Godbey, 2011).

DOTAP ve DOTMA gibi tek değerlikli katyonik lipidler gibi yine tek değerlikli 3β [N-(N',N'-dimetilaminoetan)-karbamoyl]kolesterol(3β [N-(N',N'-dimethylamino ethane) -carbamoyl]cholesterol, DC-Chol) ile çalışmalar mevcuttur.

Ayrıca çok değerlikli katyonik lipidler 2,3-diöleiloksi-N-[2(spermin)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminyum (2,3-diöleiloksi-N-[2(spermin)karboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminyum, DOSPA) ve di-oktadesil-amido-glisil-spermin (di-octadecyl-amido-glycyl-spermine, DOGS) de birçok gen tedavisi çalışmasında kullanılmıştır (Balazs ve Godbey, 2011).

DOTMA (Lipofectin®), DOSPA (Lipofectamine®) DOTAP, DC-Chol ve DOGS (Transfectam®) gibi farklı katyonik lipid türü ile üretilmiş lipozomlar transfeksiyon ajanı olarak günümüzde ticari olarak üretilmekte ve sıklıkla kullanılmaktadır (Dal-Maso vd., 2008).

2.4.2.3. Katı Lipit Nanopartiküller (KLN)

Katı lipid nanopartiküller 90'lı yılların başında, hazırlanışları sırasında organik çözücü kullanılmaması ve uzun süreli kararlılık sağlanmasınedeniyle, liposomlara ve emülsiyon sistemlere alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (Radaic vd., 2015). Polimerik sistemlere de alternatif olan KLN'lerin partikül çapı 50 ile 1000 nm arasında değişmektedir. Vücut ve oda sıcaklığında katı, biyo-uyumlu, biyolojik olarak çözünebilen, hidrofobik lipid matristen oluşan kolloidal sistemlerdir (Carrillo vd., 2013).

Katı lipid nanopartiküllerin, konvensiyonel ilaç taşıyıcılara göre başlıca avantajları; yüksek biyoyumluluk, düşük sitotoksite, başarılı hedeflendirme, üretim amacıyla ölçeklendirme imkanının ve uygulamasının kolay olması, ilaç salımı modülasyonunda daha esnek olunabilmesi, formülasyonun hazırlanması aşamasında organik çözücülerini kullanma gereği olmaması ve uygulama yolu açısından (oral, dermal, intravenöz vb) geniş miktarda seçenek sunmasıdır (Attama, 2011).

KLN'lerin hazırlanmasında kullanılan lipidler (örn, yağ asitleri, mono-,di-, trigliseritler, fosfolipitler) ve yüzey etkin maddeler GRAS (Generally Recognized as Safe) özelliğine sahiptirler. Sıvı yerine katı lipid kullanılması ise yavaş ve kontrollü salım için oldukça uygun özellik kazandırır çünkü nanopartiküllerin katı çekirdeği ilacın mobilitasını sınırlandırmaktadır (Gopinath vd., 2015).

Katı lipid nanopartiküller için kullanılan hazırlama yöntemleri şunlardır; yüksek kayma homojenizasyonu, sıcak homojenizasyon, soğuk homojenizasyon, ultrasonikasyon veya yüksek hızda homojenizasyon, mikroemülsiyon ile KLN hazırlama, süperkritik akışkan tekniği, çözücü emülsifikasyon-evaporasyon tekniği, çift emülsiyon yöntemi, püskürtürerek kurutma tekniğidir (Dolatabadi vd., 2015).

KLN'ler oluşturuldukları lipid karakteri nedeniyle negatif yüklü nanopartiküllerin dispersiyonu formundadır. Genetik materyali elektrostatik etkileşim ile taşıyıcı sistemler olarak hazırlanmasında pozitif yük vermek amacıyla, formülasyon aşamasında katyonik özellikteki ajanların kullanılması gerekmektedir (Büyükköroğlu vd., 2016).

Yu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada paklitaksel (PTX) ve siRNA'nın birlikte verilmesi için katyonik katı lipid nanopartikülleri (cationic solid lipid nanoparticles, cSLN) tasarlamışlardır. İnsan MCL1'e özgü siRNA kullanılarak yapılan çalışmada paklitaksel yüklü cSLN'ler siRNA ile kompleks olarak kullanılmış ve epitel karsinoma KB hücreleri-ksenograflanmış farelerde intratümöral enjeksiyon uygulama sonrasında tümörlü büyümesinde önemli miktarda azalma gözlenmiştir (Yu vd., 2011).

2.4.2.4. Polimerik nanopartiküller

Bir diğer siRNA taşınmasında kullanılan viral olmayan vektörler polimerlerdir. Bu nanotaşıyıcıların üretimi diğerlerine kıyasla daha ucuzdur. Biyoçözünürlük ve hücreye özgü hedefleme gibi istenen özellikleri kazanması için, immün sistemden ve

mutajeniteden kaçınmak amacıyla kimyasal olarak kolay değiştirilebilirler (Merkel vd., 2014).

Bu polimerlerin pozitif yüklü amin grupları ile nükleik asitlerin negatif yüklü fosfat grubu arasındaki elektrostatik etkileşimi ile hazırlanmış sistemler polileks olarak adlandırılır. Birçok katyonik polimer ticarileşmiştir ve viral olmayan vektör tasarlanmasında kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanlar; polietilenimin (PEI), poli(L-lisin) (PLL), katyonik dendrimerler, poli(amidoamin) (PAMAM) ve kitosandır (CS). (Thapa ve Narain, 2016).

2.4.2.4.1. Polietilenimin (PEI)

Polietilenimin, gen transfeksiyonu yapabilen katyonik polimerler içerisinde en önemlilerinden birisidir. İlk defa 1995 yılında Behr ve arkadaşları tarafından yürütülen (Boussif vd., 1995) polietilenimin aracılı oligonükleotit transferinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu süreçten itibaren PEI, polilekslerin biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerini geliştirmek için sıkça kullanılan bir polimer olmuştur (Neu vd., 2005).

Polietileniminin transfeksiyon etkinliğinin farklı moleküler ağırlıklarda incelenmiştir. Godbey ve arkadaşları, PEI polilekslerinin transfeksiyon etkinliğinin 600'den başlayıp 70.000 dalton (Da) ağırlığa kadar arttığını göstermişlerdir (Godbey vd., 1999) fakat molekül ağırlığı yükseldikçe daha yüksek toksik etki gözlenmiştir (Fischer vd., 2003). Kissel ve arkadaşları ise bu artan toksisitenin agregasyona ve hücre yüzeyinde yapışmalara dolayısıyla nekroza sebep olduğunu göstermiştir (Fischer vd., 1999). Polileksleri oluşturmada kullanılan PEI polimeri için en uygun molekül ağırlığı 5000 ile 25.000 dalton arasında kabul edilmiştir (Neu vd., 2005).

2.4.2.4.2. Polietilen Glikol (PEG)

Polietilen glikol, düşük maliyetli, hazırlanışı kolay, uygun moleküler ağırlıkta olması ve lipit veya proteinlere (antikorlar dahil) bağlanma özelliğinin bulunması nedeniyle oldukça kullanışlı polimerlerdir. PEG'in kullanımı, immünojenik ve sitotoksik etki göstermemesi, su ve organik çözücülerde çözünürlüğünün yüksek olması gibi nedenlerden dolayı proteinlerin modifikasyonunda da tercih edilmektedir (Kundu ve Sharma, 2008).

PEG ayrıca insanda kullanılmak üzere FDA tarafından da onaylanmıştır. Taşıyıcı sistemlere PEG polimeri dahil edilmesiyle gerçekleşen pegilasyon işleminin yapılmasının yaygın sebepleri, ilacın böbreklerden atılımını azaltmak, enzim veya ortam tarafından bozulmasını önlemek, immünojenik ve antijenik etkileri engellemektir. Poliplekslerin PEG ile modifiye edilmesi plazma proteinleri ve tuz gibi yapıların taşıyıcı sisteme bağlanmasını inhibe edip agregasyonları önleyerek kararlılık kazanmalarını sağlar, bu durum partikül-partikül ve partikül-protein etkileşiminde azalmaya sebep olur. PEG'in moleküler ağırlığı, miktarı ve bağlanma yöntemi kararlılığa etki eden faktörlerdir (Kundu ve Sharma, 2008).

Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada katyonik lipid destekli PEG-PLA (poly(ethylene glycol)-b-poly(d,l-lactide)) kopolimeri kullanarak siRNA taşıyıcı sistemi tasarlamışlardır. Enkapsüle edilen siRNA başarılı bir şekilde hücre içerisine girmesi sağlanmış ve endosomal/lizozomal kaçış sağlayarak siRNA'yı parçalanmadan korumuşlardır. Plk1 genini hedef alan siRNA taşıyan nanopartiküller, HepG2 ve MDA-MB-435 kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (Yang vd., 2011).

2.4.2.4.3. Poli(D,L-laktit-ko-glikolit) (PLGA)

PLGA, laktik asit ve glikolik asitlerin ester bağlarıyla birbirlerine bağlanması ile oluşan bir polimerdir (Jin vd., 2014). PLGA, biyouyumlu ve biyoçözünür özellikte olması nedeniyle oldukça ilgi çeken bir polimer türü olmuştur. Hücre içerisinde endolizozomal kısımdan sitoplazmayageçip içeriğini uzun sürede serbest bırakmasından dolayı, PLGA nanopartikülleri, yüklenen maddeler için etkin bir sürekli salım imkanı sunar (Bivas-Benita vd., 2004).

Güvenli ve yüksek biyoçözünür özellik göstermesi PLGA polimeri için avantaj bir durum iken düşük salım oranı, genetik materyali enkapsülasyon kapasitesinin düşük olması, asidik ortamdan etkilenme gibi durumlardan dolayı kullanımı sınırlanmaktadır (Jin vd., 2014). Bu durumun üstesinden gelmek için katyonik polimer PEI ile modifiye edilmiş PLGA nanopartikülleri denenmiştir. Patilve Panyam'ın yaptıkları bir çalışmada, siRNA enkapsülasyonunu arttırmak için PLGA'nın yüzeyine PEI katyonik polimerini bağlamışlardır. Elde ettikleri sonuca göre, siRNA'nın 2 kat daha fazla enkapsüle edildiğini ve salım profilinde artışın gözlemlendiği rapor edilmiştir (Patil ve Panyam, 2009).

2.4.2.4.4. Poli-L-Lizin (PLL)

Poli-L-Lizin gen taşınmasında kullanılan etkili bir polipeptittir. Yapısındaki lizinin birincil amin grubu fizyolojik ortamdan proton toplayarak genetik materyal ile elektrostatik etkileşime girer. PLL'in etkinliği, moleküler ağırlığı arttıkça doğru orantılı bir şekilde artış gösterir fakat yüksek molekül ağırlığında toksik etki de oldukça artar, bu durum kullanımını sınırlandırmaktadır. PLL'in gen taşıma kapasitesi, tek başına kullanıldığında zayıf kalmaktadır, etkinliğini arttırmak için transferin, folat, monoklonal antikorlar ve basit fibroblast büyüme faktörleri ile modifiye edilebilmektedir. (Thapa ve Narain, 2016).

İlk kez 1987 yılında, bir tür glikoprotein olan asialo orosomucoid ile konjuge edilen PLL, gen aktarımında kullanılmıştır. Zhang ve Smith, yaptıkları çalışmada PLL polipleksinin uzunluğu ve partikül boyutunun, genetik materyali taşıması ve gen ifadesi üzerindeki etkilerini *in vivo* ve *in vitro* incelemişlerdir. Yüksek moleküler ağırlığı ve düşük boyuttaki PLL'lerin kullandıkları pDNA'yı bozunmalara karşı etkili bir şekilde koruduğunu ve HuH7 hücrelerinde yüksek gen ifadesi gözlemlediklerini belirtmişlerdir (Thapa ve Narain, 2016).

2.4.2.4.5. Dendrimerler

Yapısal olarak dendrimerler monodispers, üç boyutlu ve çok miktarda dallanmış makromoleküller olarak bilinirler. Boyutları 1-100 nm arasında olan dendrimerler çekirdek, iç boşluk ve dış yüzey grubu olacak şekilde üç ana kısımdan oluşurlar. ,bu üç ana grup kontrollü bir şekilde değiştirilerek yapıya çözünürlük, termal kararlılık gibi özellikler kazandırılabilir (Çalış ve Pehlivan, 2014).

İlaç yükleme kapasitesinin yüksek olması, kolay sentezlenebilmesi, kararlılığının yüksek olması, boyutlarının kontrol edilebilir olması, aktif hedeflendirme yapılabilmesi ve yüzeylerinin fonksiyon kazandırılarak kontrollü ve sürekli salım sağlayan sistemlere dönüştürülebilmeleri başlıca üstünlükleri arasındadır. Parenteral, transdermal, oküler, oral, pulmoner, rektal, vajinal ve nazal yolla uygulanabilmektedirler (Çalış ve Pehlivan, 2014).

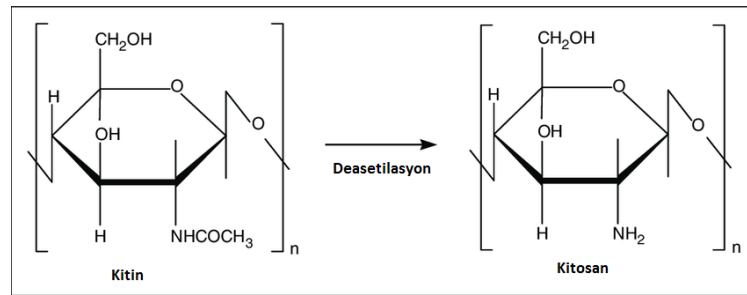
Antikanser terapötik etkinlik için taşıyıcı sistem olarak; Taratula ve arkadaşları poli(propilenimin) (PPI) dendrimerini Bcl-2 siRNA taşınmasında kullanmışlardır.

Lateral ve sterik kararlılık kazandırılmak istenen nanopartiküller peg polimeri ile kaplanarak SKOV-3, A549 ve A2780 hücrelerine hedeflendirilmiştir. Gözlemlenen sonuçlar doğrultusunda hücre ölümlerinde büyük miktarda artış olmuştur (Taratula vd., 2009).

2.4.2.4.6. Kitosan (CS)

Kitosan, kitinin (kabuklu hayvan ve böceklerin dış iskeletinde bulunan bir polisakkarit) deasetilasyonu ile elde edilen biyo-uyumlu ve biyoçözünür olan bir amino-polisakkarittir (Şekil 2.10). Molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak kararlı ve küçük (20-500nm) partiküller oluşturabilir ve katyonik özelliği sayesinde negatif yüklü mukozal yüzeyler ve genetik materyaller ile elektrostatik etkileşime girebilirler (Morille vd., 2008).

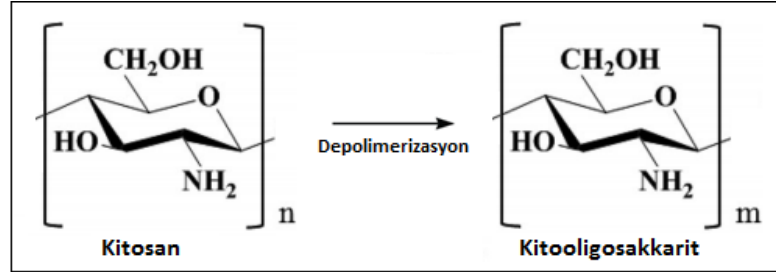
Bu özellikleri taşıyan kitosanın, sudaki çözünürlüğünün zayıf olması ve düşük transfeksiyon verimliliğinden dolayı siRNA taşıyıcı sistem olarak tasarlanmasında bazı modifikasyonlara ihtiyaç duyulmuştur (Merkel vd., 2014). Bu modifikasyonlardan bazıları; pH'a duyarlı modifikasyon, ısıya duyarlı modifikasyon, hedefleme amaçlı kimyasal modifikasyonlardır (Wang vd., 2011). Kimyasal modifikasyonlar içerisinde en çok ilgi çeken ise kitosanın kitooligosakkaritlere dönüştürülmesi işlemidir (Şenel, 2012).



Şekil 2.10. Kitinin deasetilasyonu ve kitosan'ın kimyasal yapısı (Dutta ve Dutta, 2012).

Kitooligosakkaritler kitosanın depolimerize edilmiş halidir. Genellikle 3900 Da'dan daha az molekül ağırlığına sahiptirler. Kitooligosakkaritlere olan ilgi giderek artmaktadır çünkü düşük molekül ağırlıkları, düşük viskoziteleri ve kısa zincir uzunluğuna sahip olmaları endüstriyel alanda kullanımlarını kolaylaştırmaktadır. Suda

çözünür özellikte olmalarının yanı sıra, mükemmel biyolojik özelliklere sahiptirler ve bu özellikleri ile kolesterol düşürücü, antibakteriyel, antitümör ve immün arttırıcı etkiler göstermektedirler (Hamed vd., 2016).



Şekil 2.11. Kitosanın depolimerizasyonu ve kitooligosakkarit'in yapısı ($n > m$) (Vo vd., 2015).

Yapılan bir çalışmada kitooligosakkarit polimeri Bcl-2 siRNA taşınması için taşıyıcı sistem olarak tasarlanmıştır. Yapılan jel çalışmalarında kitooligosakkarit'in siRNA'yı farklı konsantrasyonlarda tuttuğu gösterilmiştir. A549 ve MCF-7 hücrelerinde yapılan transfeksiyon çalışmaları sonuçlarına göre hücre içine transfeksiyon işlemi gerçekleştirilebilmiştir (Şenel vd., 2015).

2.4.2.4.7. Albümin

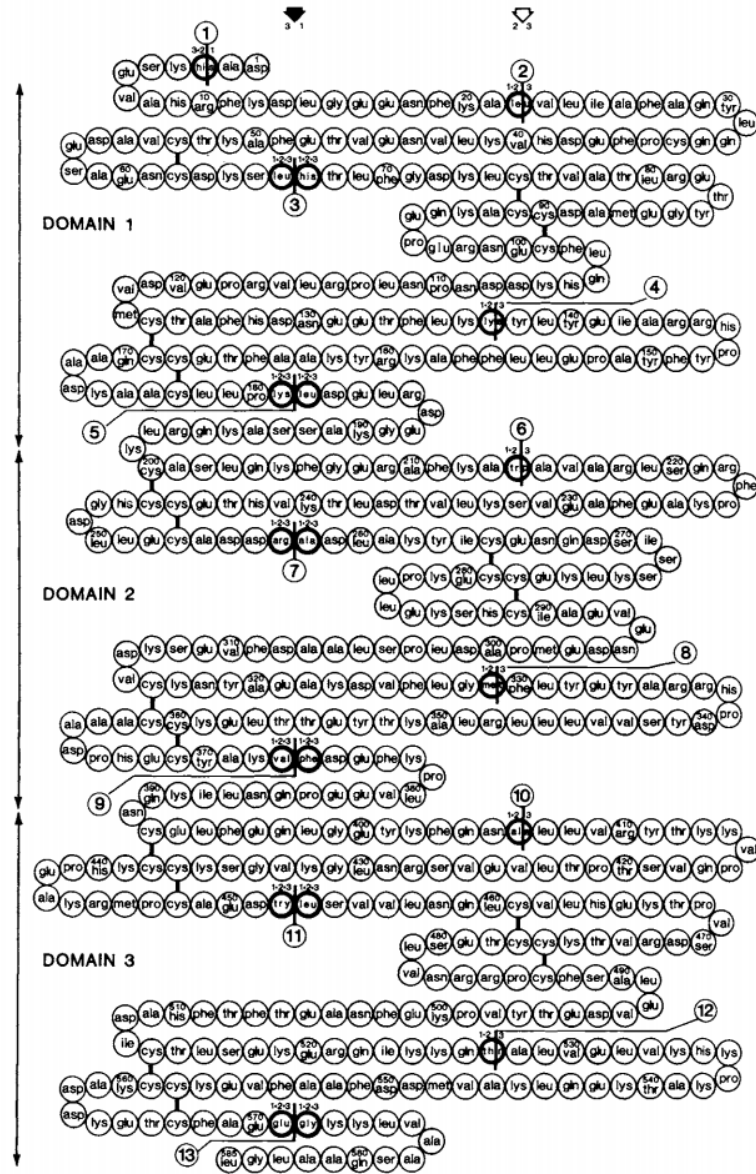
Sentetik polimerlerle hazırlanan formülasyonlarda yüzey etkin madde ve toksik çözücülerin kullanılması, istenen düzeyde uygulanmalarını sınırlamaktadır. Bu nedenle, proteinlerin de dahil olduğu doğal biyomoleküller güvenli olmaları ve biyo-uyumlu olmaları nedeniyle uygun bir alternatif taşıyıcı molekül olarak karşımıza çıkmaktadır. Literatür çalışmaları sonuçlarına göre protein tabanlı nanopartiküller, biyo-uyumlu, biyolojik olarak çözünebilir, kolay modifiye edilebilir olmaları nedeniyle ilaç taşıyıcı sistem hazırlamada tercih edilmektedirler (Razei vd., 2019).

Protein nanopartikülleri, amfifilik özellikleri sayesinde de ideal nanotaşıyıcılar olarak görülmektedirler. Birçok doğal kaynaktan kolayca sentezlenebilen protein nanopartiküller başlıca 2 sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; hayvansal proteinler (albümin, süt proteinleri, kollajen, jelatin, elastin, ipek proteini, avidin) ve bitkisel proteinler (gliadin, legumin, zein, soya proteini) olarak sınıflandırılır (Razei vd., 2019).

Bu protein yapıları nanopartiküllerden son zamanlarda kanser alanında kullanılan en önemli taşıyıcı yapı ise albümindir (Razei vd., 2019). FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan Abraxane® (Albumin bound paclitaxel), kanser tedavisi alanında potansiyel bir aday ve ticari olarak ortaya çıkmış albümin bazlı bir nanopartiküldür (Green vd., 2006; Miele vd., 2009).

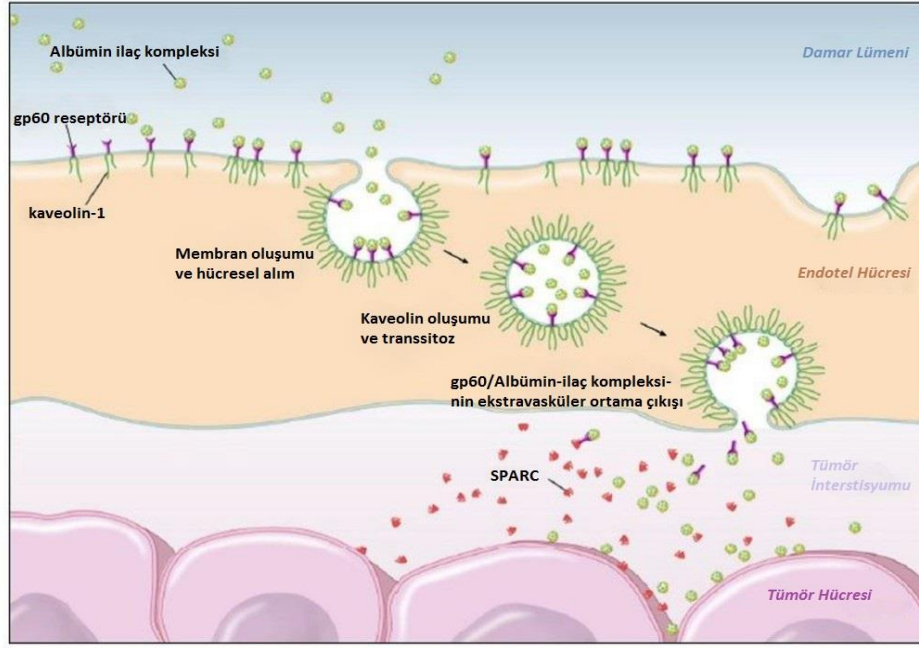
Albümin, 66,5 kDa molekül ağırlığına sahip, 585 amino asit dizisinden meydana gelen, 17 tane disülfid köprüsü ve 1 tane sülfhidril grubu oluşturacak şekilde 35 sistein yapısı barındıran (Hirose vd., 2010) (**Şekil 2.12**), kanda en çok bulunan plazma proteindir (35-50 g/L insan serumu). Plazma proteinlerinin çoğu gibi albümin de karaciğerde üretilir ve karaciğerin her gramında yaklaşık 0,7 mg/saat olacak hızda üretilmektedir (günlük 10-15 g). İnsan serum albümini için ortalama yarı ömür 19 gün olarak kabul edilmektedir (Kratz, 2008). Günümüzde albümin; sığır serum albümini (Bovine Serum Albumin, BSA), insan serum albümini (Human Serum Albumin, HSA), sıçan serum albümini ve ovalbümin gibi birçok kaynaktan elde edilmektedir. Elde edilen albüminler ilaç, genetik materyal, peptit ve antibiyotiklerin de dahil olduğu birçok molekülü taşımak için kullanılan taşıyıcı sistemlerdir (Elzoghby vd., 2012). Ayrıca, albümin, yanık, şok, kardiyopulmoner baypas, hipoalbüminemi, hemodiyaliz ve akut solunum yetmezliği tedavilerinde de kullanılmaktadır (Mendez vd., 2005).

Albümin; glikoproteinler (Gp18, Gp30 ve Gp60), Megalin/Cubilin kompleksi, yenidoğan Fc reseptörü (FcRn) ve SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine, asidik ve sistein bakımından zengin olarak salgılanan protein) gibi çeşitli hücreler reseptörlerle etkileşime girer.



Şekil 2.12. İnsan serum albümini amino asit sekans dizilimi (Peters, 1995).

Gp60 reseptörü, bir diğer adı albondin, molekül ağırlığı 60 kDa olduğu için bu şekilde isimlendirilmiştir. Gp60; membran geçirgenliğini arttırarak, kan dolaşımındaki proteinlerin alımını sağlayan, vasküler endotelyal membran proteindir. Albümin gibi proteinlerin Gp60 reseptörüne bağlanması, membran proteini olan kaveolin-1'in (caveolin-1) aktifleşmesini dolayısıyla kaveola (caveolae) veziküllerinin oluşumunu indüklemektedir. Oluşan kaveoller sitoplazma boyunca ilerleyip, içerdiği molekülleri hücreler arası sıvıya bırakacak şekilde diğer hücre duvarına dahil olur (Şekil 2.13). Bu özelliğinden dolayı Gp60'ın albüminin hücresel transsitozunda büyük katkısı olduğu ve albümini lizozomal yıkımdan koruduğu düşünülmektedir (Larsen vd., 2016).



Şekil 2.13. Gp60 reseptörleri aracılığı ile ve hücreler arası sıvıda SPARC proteinlerinin albümine spesifik bağlanması (Nitta ve Numata, 2013).

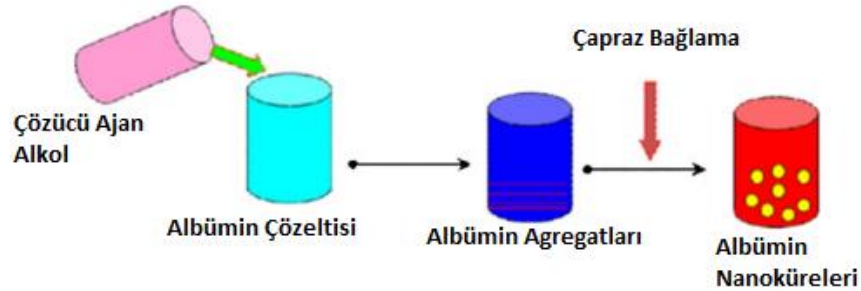
Osteonektin veya bazal-membran 40 olarak da bilinen SPARC, hücreler arası sıvıda bulunan ve albümin bağlayan bir proteindir (Şekil 2.13). Fibroblastlar, endotel hücrelerinin de dahil olduğu birçok hücre tipi tarafından üretilirler ve doku büyümesi, hücre proliferasyonu gibi olaylarla bağlantılıdır (Larsen vd., 2016). SPARC'ın albümin bağlama özelliği terapötik amaçlar için de kullanılabilir. Bazı kanser türlerinde, kanserli bölgedeki SPARC miktarının fazla oluşu, albümine bağlı kemoterapi ilaçlarının tutulmasına ve tedaviye daha olumlu cevap verilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Baş ve boyun bölgesinde tümör taşıyan hastalarda Abraxane® uygulandığında, tedavinin etkinliğinin tümör SPARC ekspresyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (Wong ve Sukkar, 2017).

Albümin nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanmaktadır; Desolvasyon(koaservasyon), emülsiyon oluşturma, terman jelasyon, nano püskürterek kurutma, nab-teknolojisi (nab-technology, nanoparticle albumin-bound technology) ve kendiliğinden oluşma (Elzoghby vd., 2012).

2.5. Albümin Nanopartikülleri Hazırlama Yöntemleri

2.5.1. Desolvasyon (koaservasyon) yöntemi

Desolvasyon prosedürü protein bazlı partiküller elde etmek için yaygın bir yöntemdir. Etanol ve aseton gibi su ile karışabilen organik çözücüler ile albümin çözeltisinin belirli oranlarda karıştırılması, albüminin denatüre olmasını ve iyi tanımlanmış nanoparçacıkların oluşmasına neden olur. Etanol, albümin bazlı nanopartiküllerin hazırlanmasında esas olarak tercih edilen desolvasyon ajanı olarak kullanılmaktadır. Etanolün ilave edilmesiyle, albüminin sudaki çözünürlüğü giderek azalır ve faz ayrışması gözlenir. Etanol veya aseton gibi su ile karışabilen çözücülerin konsantrasyonunun arttırılmasının, protein hidrasyonunda ve sulu karışımın dielektrik sabitinde azalmaya neden olmaktadır. Desolvasyon aşamasında değişen dielektrik sabiti ile oluşan partiküllerin büyüklüğü arasında bir korelasyon olduğu varsayılmıştır. Albümin nanopartikülleri morfolojik olarak yeterince kararlı değildir ve su içerisinde tekrar çözülebilir özelliktedir. Albümin molekülündeki amino gruplarının kantitatif çapraz bağlanması için glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcılar kullanılmaktadır. Böylece koaservatların sağlamlaştırılması mümkün olmaktadır (Şekil 2.14) (Von Storp vd., 2012; Elzoghby vd., 2012).



Şekil 2.14. Albümin nanopartiküllerinin desolvasyon yöntemi ile hazırlanışı (Elzoghby vd., 2012).

Etanol ilavesi albüminin üçüncül yapısını değiştirmektedir ve çözeltiye etanolün eklenmesi esnasında, albüminin sudaki çözünürlüğü azalır ve faz ayrışmasına maruz kalır. Belirli bir çözünme seviyesine ulaştığında protein kümeleri oluşur. Daha sonra glutaraldehit gibi bir aldehit grubunun ilave edilmesiyle albüminin arjinin rezidülerindeki guanidin yan zincirleri ile lizin rezidülerindeki amino gruplarında

kondensasyon gerçekleşir ve nanopartiküller çapraz bağlanarak daha kararlı bir form kazanmış olurlar (Iwao, 2016).

2.5.2. Emülsiyon oluşturma yöntemi

Emülsiyon oluşturma yöntemi, polimerlerin hazırlanmasında da yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle hazırlanan albümin nanopartiküllerinin kararlılığı için iki yöntem kullanılır; Isıl işlem, albümin damlacıkları içeren yağ fazı yüksek bir hızda homojenleştirilip, albümin nanoküreleri (0,3-1 μm) elde edilmiş ve 10 dakika boyunca 175-180 $^{\circ}\text{C}$ 'de ısıtılarak kararlı hale getirmiştir. Bu karışım soğutulup, santrifüjleme işleminde ayrılmayı kolaylaştırmak amacıyla yağ viskozitesini azaltmak için etil eter ile seyreltme işlemi yapılmıştır (Elzoghby vd., 2012).

Diğer yöntem ise kimyasal işlem, albümin sulu çözeltisi yağlı faz (pamuk yağı) içinde 25 $^{\circ}\text{C}$ emülsiyon haline getirilmiş ve ardından çapraz bağlayıcı ajan 2,3-butadiene veya formaldehit içeren eter ile resüspande edilerek denatüre edilmiştir (Elzoghby vd., 2012).

Yağ/su emülsiyonu hazırlama yöntemi için, albüminin sulu çözeltisi üzerine, suda çözünürlüğü olmayan etkin maddenin çözündürüldüğü organik solvan (diklorometan gibi) damla damla eklenerek emülsiyon oluşumu sağlanır. Daha sonrasında, organik solvanın uçurulması ile etkin madde yüklü albümin nanopartikülleri elde edilir. Bu partiküllere, formülasyon hazırlaması sırasında organik solvan içerisinde PEG'in çözülmesi ile pegilasyon ya da çapraz bağlayıcılar ile ligand konjugasyonu da mümkündür (Lee vd., 2011).

Su/yağ emülsiyonu hazırlama yönteminde ise albümin içeren sulu çözelti, yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak oda sıcaklığında organik fazda (pamuk tohumu yağı gibi) homojen bir emülsiyona dönüştürülür. Bu emülsiyon 120 $^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerinde bir sıcaklıkta büyük hacimli ve önceden ısıtılmış bir yağa damla damla eklenir. Bu işlem ile mevcut suyun hızla buharlaşması sağlanırken nanopartiküllerin oluşması indüklenmiş olur (Iwao, 2016).

2.5.3. Termal jelasyon yöntemi

Albümin gibi proteinlerin ısıtılmasıyla oluşturulan jelasyon iki aşamalı bir işlemdir. İlk aşama ısı verilerek proteinin konformasyonal yapısında değişiklik elde edilip bazı polipeptit zincirlerinin açılması olarak gösterilmiştir. Bu aşamada proteinin ayrışması ve denatürasyonu söz konusudur. Denatürasyon işleminin gerçekleşmesi için proteinin denatürasyon sıcaklığının üzerinde ısıtılması gerekir. İkinci aşamada ise jelasyona uygun hale gelen protein moleküller arası etkileşim gerçekleştirecek şekilde protein-protein bağlanması oluşturur. Moleküller arası etkileşimin çözücü içerisinde yer almasıyla oluşan bu oluşumu çözücü boyunca jel formunu alarak devam etmektedir. Jelleşmeye sıcaklık dışında pH, iyonik kuvvet, protein konsantrasyonu gibi faktörler de etkilemektedir (Boye vd., 1996).

Bir çalışmada BSA-dekstran konjugatları karışımının BSA ve kitosan arasındaki elektrostatik çekim ve BSA'nın jelleşmesi sayesinde ısıtılarak üretilmiştir. Ortamın pH'sı 7,4e getirilerek doksorubisin yüklemesi yapılan nanopartiküllerin antitümör etkisi mürin asit hepatoma H22 tümörü taşıyan farelerde denenmiştir. Doksorubisinin sitotoksitesini önemli ölçüde azalttığı ve tümörlü farelerde hayatta kalımı arttırdığı gözlenmiştir (Qi vd., 2010).

2.5.4. Püskürterek kurutma yöntemi

Püskürterek kurutma işlemi, bir sıvı içerisinde maddelerin çözünmüş, süspande edilmiş ya da emülsüfiye edilmiş formlarının sıcak hava ortamına püskürtülmesi ve örneğin içerdiği sıvının evaporasyonu sonucu ürünün toz halinde elde edilmesine dayanmaktadır. Kurutma işlemi sırasında çözelti atomizerler tarafından sıcak havanın içerisine küçük damlacıklar oluşturacak şekilde püskürtülür. Çözelti kurutma çemberinin üst tarafından radyal olarak sıcak havada ilerler. Nem hızlıca damlacıklardan buharlaşarak ayrılır. Soğuyan hava, vakum fanları yardımıyla (partiküllerin dışarı atılmasını önleyecek düzenek ile) boşaltılır ve kurutulan toz ürünün toplama kabında birikmesi sağlanır (Lee vd., 2011).

Püskürterek kurutma, yaygın olarak kullanılan, sıvı bir fazdan kuru bir toz üretmek için kullanılan etkili bir yöntemdir. Son zamanlarda, pulmoner, nazal ve oral yoldan verme amaçlı proteinlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bu yöntemde partikül büyüklüğü, kütle yoğunluğu, akış özellikleri gibi partikülün çeşitli özelliklerini

ayarlamak oldukça kolaydır. Bu sebeplerden dolayı püskürterek kurutma protein ve peptid ilaçların formüle edilmesinde kullanılan çok yönlü ve ticari olarak da uygulanabilir bir teknolojidir (Lee vd., 2011).

2.5.5. Nanopartikül albümin bağlama teknolojisi

Amerikan Bioscience şirketi, lipofilik ilaçları nanopartiküllerin içine enkapsüle etmek için özel nanopartikül albümin bağlama teknolojisi (nab-technology) geliştirmiştir. İlaç etkin maddesi insan serum albümini ile birlikte sulu bir çözücü içerisinde karıştırılır ve ardından yüksek basınç altında püskürtülerek 100-200nm aralığında albümin nanopartikülleri elde edilir. Yaklaşık 130nm çapında Abraxane® metastatik meme kanseri tedavisinde önemli derecede fayda sağlayan ve FDA tarafından onaylanmış olup, bu yöntemle üretilmiş bir kemoterapötik ilaçtır (Kratz, 2008).

2.5.6. Kendiliğinden oluşma yöntemi

Burada yöntemde, hidrofobik özellikteki bir ilacın albümine eklenerek albüminin yüzeyinde bulunan birincil amino gruplarının değişikliğe uğraması ve albüminin hidrofobikliğinin artması söz konusudur. Hidrofobikliği artan albüminlerin topaklanarak misel yapı oluşturmaları sağlanır (Elzoghby vd., 2012; Bhushan vd., 2017; Xu vd., 2011). Nano boyutta misel oluşturmak için kimyasal olarak modifiye edilmiş albüminlerin kendiliğinden birleşmesi suda çözünürlüğü zayıf etkin maddeler için hazne görevi gördüğü için yüksek miktarda yükleme işlemi yapılabilir. (Elzoghby vd., 2012).

2.6. Transfeksiyon Yöntemleri

Gen transferi yabancı bir genetik materyalin hücre içerisine aktararak hücrede genetik olarak değişiklik yapılmasıdır (Carter ve Shieh, 2014). siRNA transfeksiyon işleminde, transfekte edilen genetik materyal, konakçı genomuna yerleştirilmez, hedef genin ekspresyonuna müdahale edilmiş olur (Ma ve Chen, 2005).

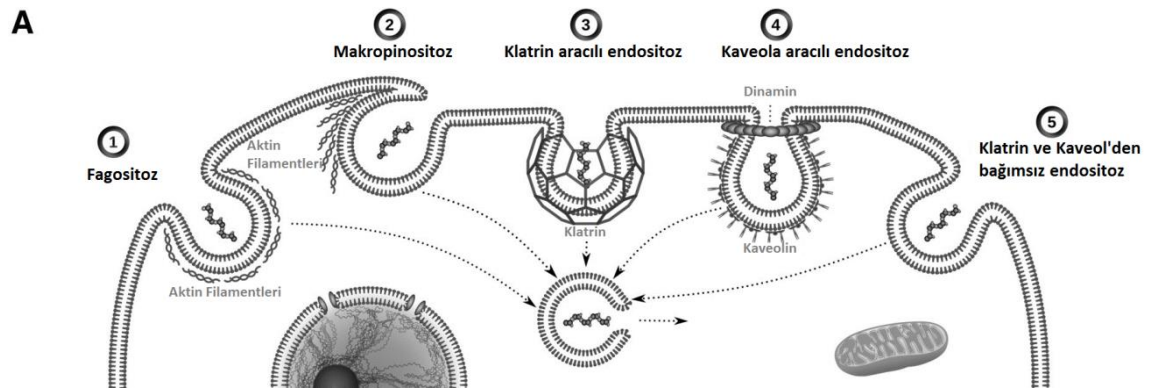
Transfeksiyon için genellikle kullanılan yöntemler, Lipit aracılı metot, Kalsiyum fosfat aracılı, DEAE(dietil aminoetil metil)-dekstran aracılı, elektroporsayon, biyolistikler, viral vektörler, polibren, laser transfeksiyon, yüksek sıcaklıkla arttırılmış

gen transfeksiyonu yöntemleridir (Ma ve Chen, 2005). siRNA transfeksiyonu için en yaygın lipid/polimer aracılı yöntemler ile viral vektörler kullanılmaktadır (Kim ve Eberwine, 2010).

Tablo 2.2. *Transfeksiyon Yöntemleri (Kim ve Eberwine, 2010).*

Tip	Yöntemler	Örnek
Biyolojik	Virüs ilişkili	Herpes simpleks virüs, Adeno ilişkili virüs, Adeno virüs, Vaccinia virüsü, Sindbis virüsü
Kimyasal	Katyonik polimer Kalsiyum fosfat Katyonik lipid	Polietilenimin, dendrimer, lipofektamin, lipofektin DOTAP, DOTMA, kalsiyum fosfat
Fiziksel	Direkt enjeksiyon Biyolistik parça taşıma Elektroporasyon Sonaporasyon	Mikro-iğne, AFM tip, gen tabancası, nükleofektör, fototransfeksiyon, manyetofeksiyon

Hücre içerisine nanopartiküllerin geçişi için birçok yol belirlenmiştir, bunlar arasında reseptör aracılı endositoz, fagositoz ve makropinositoz gibi yöntemler mevcuttur. Katyonik taşıyıcı sistemler için en önemli giriş yolu pozitif yüklerinin, hücrenin negatif yüzeyi ile etkileşimi sayesinde gerçekleşen endositoz yoludur. Fagositoz ve makropinositoz çoğunlukla granülosit ve makrofajların büyük molekülleri parçalamak amacıyla kullandıkları yollardır. (Şenel, 2012).



Şekil 2.15. *Gen taşıyıcı nanopartiküllerin hücre içine alım yolları (Durzyńska vd., 2015).*

2.7. İnhaler Uygulama ve Akciğer Kanseri

İnhalasyon yolu kullanılarak tedavi çalışmaları antik çağlara kadar uzanmaktadır. Yıllar boyunca, birçok bileşik ve komponent inhalasyon yolu ile uygulanarak tedavi amacıyla kullanılmıştır. İnhaler ilaç uygulamak sadece solunum yolu hastalıklarının tedavisi için değil, astım, Tüberkuloz ve diğer bakteriyel enfeksiyonlar, grip virüsünden kaynaklanan enfeksiyon, mantar enfeksiyonları, sistik fibroz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, diyabet ya da kanser gibi hastalıkların lokal ve sistemik olarak tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır. İnhalasyon yolu ile ilaç uygulama parenteral tedavinin bir basamağıdır. İnhalasyon uygulamasında etkinin başlama süresi çok kısadır (Andrade vd., 2014). Yanlış pulmoner uygulama, terapötik ilaç etkisinde önemli miktarda azalmaya sebep olmaktadır. Çoğu inhale edilen ilacın alveoler bölgeye ulaşması istenmektedir çünkü çok ince epitel ($0.1-0.5 \mu m$) ve dev alveoler yüzey ($\sim 140 m^2$) ilaç emilimi için üstün koşullar sunmaktadır. Genel olarak alveoler yüzey, akciğerlerin toplam yüzeyinin % 80'inden fazlasını oluşturur (Weibel, 1979). Bu yolla, doğru ilaç uygulamasının üstün bir terapötik etki oluşturduğu ve sonuç olarak daha düşük bir uygulama sıklığına yol açtığı belirtilmiştir (Booker, 2005).

Lokal amaçla inhalasyon uygulamasında küçük oranlardaki sıvı ilaç, akciğer epitallerine hızlı bir şekilde difüze olur ve kan dolaşımına penetre olarak sistemik sirkülasyona karışmadan doğrudan akciğerlere ulaştığından etki anında başlar. Sistemik amaçla uygulamada ise ilaç alveoller aracılığıyla çok hızlı bir şekilde kan dolaşımına geçtiği için etki saniyeler içerisinde gerçekleşir ve bu etki ilaç karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramadığı için çok daha düşük dozlarla elde edilir. Bu nedenle, son yıllarda inhaler uygulama ile çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla pek çok ürün marketlerde yerini almıştır (Loira-Pastoriza vd., 2014).

Akciğer; trake, bronşlar ve iletim bronşiyollerinden oluşan iletken hava yolları ile solunum bronşiyolları, alveol kanalları ve alveollerden oluşan solunum bölgesi olacak şekilde 2 ana kısımdan oluşur. Akciğer gaz değişim fonksiyonunu solunum bölgesi içinde gerçekleştirir ve inhaler uygulama ile ilaç dağıtım gerçekleştirileceği zaman boyutsal faktörler akciğer içindeki kontrollü ve etkili ilaç birikimi için önemli hale gelmektedir (Albertine, 2016). Büyük ve porlu mikropartiküllerin mükemmel aerodinamik özellikleri ve büyük geometrik boyutları alveol makrofajları tarafından yakalanmasını düşürür. Bu da partiküllerin akciğer içerisinde yerleşmesini ve

geciktirilmiş ilaç salınımının gerçekleşmesini mümkün kılar. Aynı özellik nanopartiküller için de sağlanmaktadır. Nano boyuttaki bu partiküllerin çoğu akciğer yüzey makrofajları tarafından yakalanırlar ve pulmoner doku içerisinde birikerek haftalarca kalabilmektedirler (Loira-Pastoriza vd., 2014). Büyük partiküllerin daha küçük gaz moleküllerine çarpması sonucu oluşan brownian hareketi, sedimentasyon ve çarpma-vurma olacak şekilde üç ana mekanizma partiküllerin farklı bölgelerde birikmesine neden olmaktadır. 1 μm 'den küçük partiküller, brownian hareketi göstererek akciğerin alveoler bölgesinde birikim gösterirler. 1-5 μm aralığında olan partiküller trakeo-bronşiyal bölgeye girip çökme göstermeye elverişli olup, 5 μm 'den büyük olan partiküller ise yoğunlukla çarpma-vurma nedeniyle orofarinks hava yollarında birikecektir (Heyder vd., 1986; Oberdörster vd., 2005).

Akciğer kanseri dünya genelinde kansere bağlı ölüm oranının en yüksek olduğu kanser türü olarak gözlemlenmektedir. Üç ana akciğer kanseri türü arasında, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri en sık görüleni olup tüm akciğer kanserinin yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır (Molina vd., 2008; Herbst vd., 2008). Akciğer kanserleri sıklıkla metastaz yapar ve tedavi başarısızlık ile sonuçlanır. Yeni moleküler tedaviler, cerrahi işlem ve radyo-kimyasal tedavilerin gelişimine rağmen, hastaların çoğu için prognoz oldukça düşük olmaktadır. siRNA bazlı terapötiklerin akciğere sistemik amaçlı veya intrapulmoner uygulama şeklinde verilmesi mümkündür (Shim vd., 2013; Lam vd., 2012). İntrapulmoner uygulama, düşük siRNA dozlarına izin vermektedir, istenmeyen sistemik yan etkileri azaltıp aynı zamanda siRNA'nın yarı ömrünü de arttırmaktadır (Merkel vd., 2014). Ayrıca siRNA'nın akciğere lokal olarak verilmesi; invazif bir hastalığın ortaya çıkmasını ve i.v. uygulama sonrasında siRNA'yı parçalayan serum proteinleri ile etkileşimini önler. Bununla birlikte, akciğerin hava tarafında serum yoktur ve nükleaz aktivitesi nispeten düşüktür (Zheng vd., 2012). Akciğer, yüksek vaskülarizasyonlu büyük alveoler yüzey alanı ve absorpsiyon için faydalı faktörler olan ince hava-kan bariyeri gibi sistemik uygulamaya kıyasla başka avantajlar da sunmaktadır (Cryan vd., 2007).

Akciğerlerdeki kanserleşme, klasik kemoterapiyle etkin bir şekilde tedavi edilemez ve bu nedenle kemoterapötik etkileri artıracak teknikler akciğer kanserinin klinik tedavisinde çok önemlidir. STAT (Signal transducer and activator of transcription) proteinleri, büyüme faktörleri ve sitokinlere yanıt olarak aktive hale gelen

latent sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir. Aktive edilmiş STAT'lar homo- veya hetero-dimer oluşturur ve çekirdeğe translokasyon yapar, spesifik hedef genlerin promotör bölgesine bağlanır ve gen transkripsiyonunu düzenler. STAT3'ün yapısal olarak aktive olmasının akciğer kanserinde sıklıkla yer aldığını gösteren bol miktarda kanıt vardır. Sitokinler (örneğin IL-6) ve büyüme faktörleri (örneğin epidermal büyüme faktörü), STAT3'ün reseptörlerine bağlanır ve daha sonra onun tirozin kalıntısını aktive eder. Aktivasyonla birlikte, STAT3 dimerleri çekirdeğe translokasyon yapar ve STAT3 DNA yanıt bölgesine bağlanır ve STAT3'ün transkripsiyonunu aktive eder. STAT3'ün sabit up-regülasyonu, BCL-XL, BCL2, siklin D1, c-myc, mcl-1 ve VEGF gibi hücre proliferasyonunu arttıran ve anjiyogenezi yükselten gen dizisi ve protein yapıların upregülasyonunu sağlayarak onkojeneze katkıda bulunur. RNA interferans ile hedeflenen post-transkripsiyonel gen susturulması, hücrelerdeki spesifik genin ekspresyonunun inhibisyonu için umut verici yeni bir yaklaşımı temsil eder. Nöron tümör hücrelerinde RNAi mekanizması ile STAT3 miktarında azalış gerçekleşerek apoptoz indüklenmektedir (Das vd., 2014).

Projemiz kapsamında, antisens teknolojisi, albümin nanopartiküllerinin üstünlükleri ve inhaler uygulama yönteminin avantajlarını bir arada sunabilecek bir formülasyon geliştirilmeye çalışılmıştır.

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Madde Adı	Firma Adı
Agaroz	: Prona, İspanya
DKM (Diklorometan)	: Sigma-Aldrich, Almanya
DMSO (Dimetilsülfoksit)	: Applichem, Almanya
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	: Biological Ind., İsrail
DOTAP [®]	: Cayman Chemical, ABD
DSPE-PEG2000	: Cayman Chemical, ABD
DNA (GFP) (?)	: Aldevron, ABD
Etanol (%99,8)	: Merck, Almanya
Etidyum bromür	: Amresco, Amerika
FITC siRNA	: Santa Cruz, ABD
Fötal sığır serumu	: Sigma-Aldrich, Almanya
Kitosan Oligosakkarit Laktat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Lipofectamin [®] 2000 transfeksiyon ajanı	: Invitrogen, İngiltere
MTT boyası	: Applichem, Almanya
Oktadesilamin	: Fluka Chemicals, ABD
RPMI – 1640 Medium	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sığır Serum Albumini	: Merck, Almanya
siRNA STAT3	: Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Hidroksit	: Merck, Almanya
Sodyum klorür	: Merck, Almanya
Tween [®] 80 (Polioksietilen-20-Sorbitan Monooleat)	: Merck, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Firma Adı
Büyük kapasiteli santrifüj	: Eppendorf 5810, Almanya
CO ₂ 'li etüv	: Hera Cell 240i, Amerika
Cytation 5 plaka okuyucu	: BioTek, ABD
Distile su cihazı	: Millipore, Amerika
Dondurucu (-20°C)	: Arçelik, Türkiye
Dondurucu (-80°C)	: New Brunswick Sci., Amerika
Floresan mikroskop	: Leica 400DMI, Almanya
Güç kaynağı	: Consort E861, Belçika
İnvert mikroskop	: Leica DMIL, Almanya
Jel dokümantasyon cihazı	: Kodak 440CF, Amerika
Laminar akış kabini	: Heal, Force Çin
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph, Almanya
Mekanik karıştırıcı	: Heidolph Almanya
Mikrosantrifüj	: Eppendorf, Almanya
Orbital karıştırıcı	: Stuart SSL1, İngiltere
Otoklav	: Hirayama, Japonya
Otomatik mikropipetler	: Eppendorf, Almanya
pH-metre	: ThermoScientific Amerika
Rotavapor Buchi	: (R-205), İsviçre
SEM Cihazı	: Carl Zeiss Ultra Plus, ABD
Su banyosu	: GFL T-251425, Almanya
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech Co., Çin
Yatay Çalkalayıcı	: Stuart SSL2, Amerika
Yatay elektroforez cihazı	: ThermoScientific, Amerika
Zeta potansiyel ve parçacık boyutu ölçer (Malvern)	: Nano Zetasizer ZS, İngiltere

4. YÖNTEM

4.1. Formülasyon Geliştirme Sırasındaki Ön Çalışmalar

Emülsifikasyon, termal jelasyon, spray drying (püskürterek kurutma), koaservasyon, nanopartikül-albümin bağ teknolojisi (nab teknolojisi) ve kendiliğinden oluşma yöntemleri olmak üzere, albümin taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında literatürde 6 hazırlama yönteminden bahsedilmektedir (Elzoghby vd., 2012).

Bu çalışmada katyonik özellik taşıması istenen albümin nanopartiküllerinin hazırlanmasında desolvasyon tekniği kullanılmıştır. Taşıyıcı sistemin temel birimi olarak sığır serum albümini kullanılmıştır.

Yapılan ön çalışmalarda, partiküllere katyonik özellik kazandırması için DOTAP®, oktadesilamin gibi katyonik lipidler ile kitosan oligosakkarit laktat katyonik polimeri kullanılmıştır. Formülasyonda partiküllerin boyutlarının küçültülmesi, agregasyonun önlenmesi ve karalığın sağlanması amacıyla % 4'lük polioksietilen-80-sorbitan monooleat (Tween®80) yüzey etkin maddesi ve 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG2000) kullanılmıştır.

Karıştırma işlemi manyetik karıştırıcıda 300 - 600 rpm arasında ve alkolün uzaklaştırılmasına bağlı olacak şekilde 30 dk ile 3 saat arasında değişen süre aralıklarında devam ettirilmiştir.

Formülasyonlar 2 cm çapında 10 mL'lik ve 3 cm çapında 25 mL'lik iki çeşit beherde denenmiştir. Kullanılan behere göre çapı 1 cm ve 2 cm olacak şekilde iki farklı manyetik balık tercih edilmiştir.

Formülasyon hazırlama esnasında kullanılan su, 1M NaOH çözeltisi kullanılarak pH'sı 7,4'e ayarlanmış ve 0,22 µm filtreden geçirildikten sonra otoklavlanmış (121°C'de 1atm basınç, 20 dakika) distile su özelliğindedir. Albüminin desolvasyonu için kullanılan alkol % 99,8'lik alkoldür.

4.1.1. Ön çalışmalardaki formülasyonların hazırlama aşamaları

Çalışmamız süresince, en ideal formülasyonun belirlenmesi için farklı formülasyonlar hazırlanmıştır ve bu hazırlanan formülasyonların genel özellikleri aşağıda sunulmuştur.

-F1 formülasyonu: Desolvasyon yöntemiyle hazırlanan formülasyonda 20 mg albümin 2 mL distile suda çözüldükten sonra 500 µL alkol ilave edilerek albüminlerin denatüre olması sağlanmıştır. 2 mg DOTAP® 500 µL alkol'de çözülüp 125 µL'si damla damla albümin çözeltisine ilave edilmiş, formülasyonda bulanma görüldükten sonra alkolün eklenmesi durdurulmuş ve alkolün uçması için beher, ağzı açık bir şekilde oda sırasında manyetik karıştırıcıda bırakılmıştır.

-F2 formülasyonu: F1 formülasyonunda olduğu gibi 20 mg albümin 2 mL distile suda çözüldükten sonra 500 µL alkol ilave edilerek albüminlerin denatüre olması sağlanmıştır. 2 mg DOTAP® 500 µL alkol'de çözülüp 125 µL'si damla damla albümin çözeltisine ilave edilmiş ve formülasyonda bulanma gözlenmiştir. Daha sonra 4 mg DSPE-PEG2000 500 µL alkolde çözülmüş ve 125 µL'si formülasyona damla damla ilave edilmiş ve alkolü uçmaya bırakılmıştır.

-F3 formülasyonu: 20 mg albümin 2 mL distile suda çözüldükten sonra 500 µL alkol ilave edilerek albüminlerin denatüre olması sağlanmıştır. F1 formülasyonunda kullanılan DOTAP® yerine 2mg oktadesilamin katyonik lipidi 250 µL alkolde çözülüp 50 µL'si damla damla albümin çözeltisine ilave edilmiş. Oktadesilamin çözeltisinin damlatılarak ilave edilmesi sonucu agregasyon gözlenmiştir. Daha sonra 4 mg DSPE-PEG2000 500µL alkolde çözülüp 250 µL'si damlatılarak formüle ilave edilmiştir. Yaklaşık 2 saatlik karıştırma işlemi sonrasında topaklanmalar kaybolmuştur.

-F4 formülasyonu: 20 mg albümin 2 mL distile suda çözüldükten sonra 500 µL alkol ilave edilerek albüminlerin denatüre olması sağlanmıştır. F3 formülasyonunda kullanılan oktadesilamin miktarı iki katına çıkarılmış 4 mg oktadesilamin katyonik lipidi 250 µL alkolde çözülüp 50 µL'si damla damla albümin çözeltisine ilave edilmiş. Oktadesilamin çözeltisinin damlatılarak ilave edilmesi sonucu agregasyon gözlenmiştir. Daha sonra 4 mg DSPE-PEG2000 500 µL alkolde çözülüp 250 µL'si damlatılarak formüle ilave edilmiştir. Yaklaşık 2 saatlik karıştırma işlemi sonrasında topaklanmalar kaybolmuştur.

-F5 formülasyonu: Film kaplama yöntemiyle denenmek istenen bu formülasyonda 20 mg albümin bir beherin içinde 2 mL distile suda çözülmüştür. 4 mg DOTAP® ve 8 mg DSPE-PEG2000 ise 10 mL'lik rotavapor balonunda 1mL alkolde çözülüp rotavaporda 100 mBar basınçta, 100 rpm dse döndürülerek alkolün uçması ve balın yüzeyin ince film tabakanın oluşması sağlanmıştır. Albumin çözeltisi daha sonra bu balona alınmış

ve elde çalkalanarak DOTAP[®]/DSPE-PEG2000'nin balon yüzeyinden kendiliğinden vezükül oluşturma işlemi sağlanmış ve serbest haldeki albüminlerin bu film tabakası ile kaplanması sağlanmıştır.

-F6 formülasyonu: Bir diğer formülasyon çalışmamızda ise, F5 formülasyonunda kullanılan DOTAP[®] miktarı iki katına çıkarılmıştır. 20 mg albümin 2 mL distile suda çözülmüştür. 8 mg DOTAP[®] ve 8 mg DSPE-PEG2000 1 mL alkolde çözülüp 10 mL'lik balona aktararak rotavaporda 100 mBar basınçta, 100 rpm dönüş hızında alkolü uçurulmuştur. Alkolün tamamı uçtuktan sonra albumin çözeltisi balona alınmış DOTAP[®]/DSPE-PEG2000 ile kaplama işlemine tabi tutulmuştur.

-K1 formülasyonu: Kitosan oligosakkarit laktat katyonik polimerinin ile hazırlanan bu formülasyonlar için 2 mL distile suda 20 mg albümin çözülmüştür, 2 mg kitosan 500 µL distile suda çözülmüştür. Kitosan çözeltisinin tamamı albümin çözeltisine damla damla ilave edilmiştir. Daha sonrasında bu karışımın üzerine 1 mL alkol damlatılarak ilave edildiğinde, lif ve topak şeklinde agregasyonlar gözlenmiştir. Bu agregasyonları gidermek amacıyla 1 mL %4 Tween[®]80 ilave edilmiş ve oda ısısında 600 rpm'de karıştırmak suretiyle alkolü uçmaya bırakılmıştır. Alkolü uçtuktan sonra formülasyondaki agregasyonun giderilemediği görülmüştür.

-K2 formülasyonu: Bu formülasyonda, K1 formülasyonunda kitosan ilavesinden sonra eklenen alkol miktarının yarısı, kitosan çözeltisiyle karıştırılıp birlikte damlatılarak ilave edilmiştir. 20 mg albümin 2 mL distile suda bir beher içerisinde çözülmüştür, 2 mg kitosan 2 mL'lik mikrotüp içinde 500 µL distile suda çözülmüş, üzerine 500µL de alkol ilave edilip 1 mL'lik çözelti elde edilmiştir. Kitosan çözeltisinin tamamı albümin çözeltisine karıştırma altında damla damla ilave edilmiş ve aynı şekilde agregasyon gözlenmiştir. Daha sonra 1 mL %4 Tween[®] 80 ilave edilmiş ve alkolü uçmaya bırakılmıştır. Yüzey etkin madde ilavesi sonrası alkolü uçmaya bırakılan formülasyonda agregasyonun alkol varlığında sabit olduğu alkolün uçması sonucunda gözle görülmez olduğu belirlenmiştir.

-K3, K4, K5 formülasyonları: K2 formülasyonundaki tüm parametreler sabit tutularak, kullanılan kitosan miktarı sırasıyla 4mg, 8mg ve 16mg olacak şekilde artırılarak K3, K4, K5 formülasyonları elde edilmiştir.

-K4k formülasyonu: Bu formülasyonda, K4'ün DOTAP[®] ve DSPE-PEG2000 ile kaplama işlemi yapılmıştır. Zeta potansiyel ve partikül boyutu değerlendirmeleri sonucu

kitosanlı formüller içerisinde en uygun formülasyonun **K4** olduğu tespit edildiğinden, **K4k** formülasyonunun hazırlanmasında **K4** çekirdek yapı olarak kullanılmıştır. DOTAP® ve DSPE-PEG2000 ile kaplama işlemi yapılmasının nedeni ise formülasyona daha sonra albümin adsorbsiyonunun sağlanması böylelikle dış yüzeye tutunan albüminin sağlayacağı avantajların kullanılabilmesi için zeta potansiyelinin yükseltilmesi ve kararlılığın artırılmasıdır. Buna göre oluşturulan formülasyonun hazırlama tekniği aşağıda detaylı olarak sunulmuştur.

İlk aşamada, yukarıda anlatıldığı gibi K4 çekirdeği hazırlanmıştır. Ayrı bir 10 mL'lik balonda 2 mg DOTAP® ve 2 mg DSPE-PEG2000, 500 µL alkolde çözülüp rotavaporda 100 mBar basınçta, 100 rpm de alkolü uçurulmuştur. Alkolün tamamı uçuktan sonra K4'den 500µL balona alınmış DOTAP®/DSPE-PEG2000 ile kaplama işlemine tabi tutulmuştur.

-A2, A3, A4, A5 ve A6 formülasyonları: K4k formülasyonu hazırlandıktan sonra bu formülasyondan 500'er µL alınarak 2 mL'lik mikro tüplere aktarılmıştır. Her bir mikrotübe sırasıyla 3.3 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 20 mg/ mL konsantrasyonlarda 500 µL albümin çözeltisi eklenerek, albüminin K4k formülasyonuna adsorbe edilmesi ile sırasıyla **A2, A3, A4, A5 ve A6** formülasyonları elde edilmiştir. Adsorbsiyon işlemi mikrotüp içinde yatay çalkalayıcı da 100 rpm, 30 dk boyunca gerçekleştirmiştir.

Ön çalışmalar sonunda elde edilen tüm formülasyonlara ait kodlar, formülasyon işlemleri ve içerikleri ile ilgili detaylı bilgi **Tablo 4.1**'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Hazırlanan ön förmülasyonlar ve son formülün isimlendirilmesi, kullanılan bileşenler, ve hazırlama yöntemler

Formülasyon	Taşıyıcı	Kationik Lipitler			Antiagregan	Yüzey Etkin Madde	Albumin Adsorbe	Kullanılan Yöntemler		
	Albumin (%mg/mL)	DOTAP® (%mg/mL)	Oktadesiamin® (%mg/mL)	Kitosan (%mg/mL)	DSPE-PEG (%mg/mL)	%4 Tween®80 (%mL/mL)	(%mg/mL)	Desolvasyon	Kaplama	Adsorbsiyon
F1	10	0,125	-	-	-	-	-	+	-	-
F2	10	0,25	-	-	0,125	-	-	+	-	-
F3	10	-	0,2	-	1	-	-	+	-	-
F4	10	-	0,4	-	1	-	-	+	-	-
F5	10	2	-	-	4	-	-	-	+	-
F6	10	4	-	-	4	-	-	-	+	-
K1	~5,714	-	-	~0,57	-	~0,286	-	-	-	-
K2	~5,714	-	-	~0,57	-	~0,286	-	-	-	-
K3	~5,714	-	-	~1,14	-	~0,286	-	-	-	-
K4	~5,714	-	-	~2,28	-	~0,286	-	-	-	-
K5	~5,714	-	-	~4,56	-	~0,286	-	-	-	-
K4k	~5,714	2	-	~2,28	2	~0,143	-	+	+	-
A2	~5,714	2	-	~2,28	2	~0,143	~1,904	+	+	+
A3	~5,714	2	-	~2,28	2	~0,143	~2,857	+	+	+
A4	~5,714	2	-	~2,28	2	~0,143	~5,714	+	+	+
A5	~5,714	2	-	~2,28	2	~0,143	~8,571	+	+	+
A6	~5,714	2	-	~2,28	2	~0,143	~11,428	+	+	+

4.2. Ön Çalışmalarla Elde Edilen Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

Bu kısımda ön çalışmalarda hazırlanmış formülasyonların partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli, en uygun formülasyonların belirlenmesi için araştırılmıştır.

4.2.1. Ön çalışmalarla ait partikül boyutu ve dağılımı

Formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerde kullanılan su pH 7.4 ve 50 μ S iletkenlikte olup, 0.22 μ m'lik filtrelerden geçirilmiş distile su özelliğindedir. Formülasyondan 100 μ L alınıp, 50 μ S su ile 1 mL'ye tamamlanmış ve 25 °C'de yapılmış olan 100 ölçümün ortalaması alınarak 3 kez tekrarlanmıştır. Ölçümler *Zetasizer* cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. Ön çalışmalarla ait zeta potansiyel ölçümleri

Zeta potansiyel ölçmek için partikül boyutu ölçmek amacıyla hazırlanan örnekler ile *Zetasizer* cihazı kullanılmıştır. Elektrostatik hareketlilik *Helmholtz-Smolochowski* eşitliği kullanılarak zeta potansiyeline dönüştürülmüştür. 20 ölçümün ortalaması alınmak üzere ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

4.3. Albümin Nanopartikül Hazırlama Çalışmaları

Formülasyon geliştirme sırasında yapılan ön çalışmalar sonucunda elde edilen formüllerin partikül boyutu, dağılımı ve yüzey yükü özelliklerinin belirlenmesi sonra, **A4** formülasyonunun en uygun formül olduğu belirlenmiştir. A4 formülü baz alınarak, ana formül olarak araştırılacak **A7** formülüne geçiş yapılmıştır.

4.3.1. A4 formülasyonu

Desolvasyon yöntemiyle formülasyon hazırlamak için sığır serum albümini seçilmiştir. Sığır serum albümini; 69.323 Da molekül ağırlığında ve 25 °C su içerisinde 4.7'lik izoelektrik noktasına (PI) sahiptir. Düşük maliyeti ve bol bulunabilmesi özelliklerinin

yanı sıra saflaştırma kolaylığı ve sıradışı ligant bağlama özelliği sayesinde ilaç taşıyıcı sistem amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Elzoghby vd., 2012).

A4 formülasyonunun hazırlanması için, 20 mg albümin, 2 mL suda, manyetik karıştırıcıda 300 rpm dönüş hızında 5 dakika karıştırılarak çözündürülmüştür. Albümin çözeltisi üzerine albüminin desolvasyonuna yardımcı olaması için 2 mL %99.8 saflıkta etil alkol damla damla ilave edilmiştir. Diğer yandan, 8 mg kitosan oligosakkarit 500 µL su kullanılarak 2 mL'lik mikrotüp içinde pipetaj yapılarak çözündürülmüş ve 500 µL alkol ilave edilerek karıştırılmıştır. 1 mL hacme ulaşan kitosan/su/alkol karışımı, albümin çözeltisi üzerine damla damla ilave edilerek çözeltinin rakı beyazı görünümünde bulanıklaşması (albüminin denatüre olması nedeniyle) sağlanmıştır. Agregasyonun giderilmesi için 1 mL %4 Tween® 80 ilave edilmiş ve formülasyon, 300 rpm'de ki manyetik karıştırıcıda alkolün uçması için oda ısısında bırakılmıştır. Elde edilen dispers sistem **K4** çekirdek formülasyonu olarak adlandırılmıştır.

Hazırlanan bu **K4** çekirdek formülasyonun kararlılığının sağlanması amacıyla yapılan kaplama işlemi için, bir balona 2 mg DOTAP® ve 2 mg DSPE-PEG2000 tartılmış, üzerine 1 mL alkol ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım 100 mBar basınçta ve 100 rpm dönüş hızında alkolün uçması ve balonun iç yüzeyinde film tabakanın oluşması için evapore edilmiştir. **K4** çekirdek formülasyondan alınan 500 µL balonun içine aktarılmış ve 300 rpm dönüş hızında manyetik karıştırıcı üzerinde 1-2 dakika boyunca balonun tüm yüzeyinde gezdirilecek şekilde karıştırılmıştır. Bu kaplanmış **K4** çekirdek formülasyonu **K4k** olarak adlandırılmıştır.

Bu kısımda, çekirdek formülasyonda bulunan albüminin DOTAP® ve DSPE-PEG2000 ile kaplanması nedeniyle Gp60 yolağında etkin bir şekilde fonksiyon gösterememe olasılığı düşünüldüğünden, nanopartiküllerin dış yüzeyine albüminin adsorbe edilmesi, bu yolağın kullanılmasına yardımcı olması için, gerekli görülmüştür. Bu amaç için, 10 mg/mL konsantrasyondaki albümin çözeltisi hazırlanmış, bu çözeltiden 500 µL alınarak 2 mL'lik mikrotüp içerisine aktarılmıştır. Üzerine 500 µL **K4k** ilave edilmiş ve 100 rpm'de oda ısısında 30 dakika yatay çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen Formül **A4** olarak isimlendirilmiştir.

4.3.2. A7 formülasyonu

A4 formülasyonu baz alınarak hazırlanan A7 formülasyonunda, kullanılan çekirdek formüldeki kitosan miktarı ¼'e düşürülmüştür ve yüzey etken madde kullanılmamıştır.

Biçin, 20 mg albümin, 2 mL suda, manyetik karıştırıcıda 300 rpm dönüş hızında 5 dakika karıştırılarak çözündürülmüştür. Albümin çözeltisi üzerine albüminin desolvasyonuna yardımcı olması için 2 mL %99.8 saflıkta etil alkol damla damla ilave edilmiştir. Diğer yandan, 2 mg kitosan oligosakkarit 500 µL su kullanılarak 2 mL'lik mikrotüp içinde pipetaj yapılarak çözündürülmüş ve 500 µL alkol ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu karışım, albümin çözeltisi üzerine damla damla ilave edilerek çözeltinin bulanıklaşması sağlanmıştır ve formülasyon, 300 rpm'de ki manyetik karıştırıcıda alkolün uçması için oda ısısında bırakılmıştır. Elde edilen dispers sistem **Ç2** (çekirdek 2) olarak adlandırılmıştır.

Hazırlanan bu **Ç2** formülasyonun kaplama işlemi için, 10 mg DSPE-PEG2000 tartılmış, üzerine 1 mL alkol ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Hazırlanan bu karışım yukarıda anlatıldığı gibi, balonun iç yüzeyinde film tabakanın oluşması için evapore edilmiştir. **Ç2** formülasyondan alınan 1 mL, balonun içine aktarılmış ve 300 rpm dönüş hızında manyetik karıştırıcı üzerinde 1-2 dakika boyunca balonun tüm yüzeyinde gezdirilecek şekilde karıştırılmıştır. Bu kaplanmış **Ç2** formülasyonu **Ç2k** olarak adlandırılmıştır.

DSPE-PEG2000 ile kaplanmış çekirdek formülasyon yüzey yükünün negatif olduğu tespit edildiğinden dış yüzeye yüklenecek albüminin pozitif karakterde olması için, kaplanmış nanopartiküllere pozitif yükteki **Ç2** nanopartikülleri adsorbe edilmiştir. Bu amaçla, 2 mL'lik mikrotüp içine 500 µL'lik **Ç2k** formülasyonu konulmuş, üzerine 250 µL **Ç2** formülasyonu eklenmiş ve yatay çalkalayıcıda 100 rpm'de 30 dk boyunca oda ısısında elektrostatik etkileşim için inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen formülasyon ana formülasyondur ve **A7** formülasyonu olarak adlandırılmıştır.

4.3.3. A4 formülasyonlarına genetik materyal yükleme çalışmaları

A4 formülasyonunun genetik materyal bağlama yetisinin belirlenmesi için, STAT3 siRNA'yı harcamamak amacıyla laboratuvarımızda bulunan GFP (Green Floresan Protein) plazmit DNA (*Aldevron Biotechnology*) kullanılmıştır.

Farklı oranlarda DNA kullanılarak yapılan çalışmalarda genetik materyal iki farklı metot kullanılarak albümin nanopartiküllerine yerleştirilmeye çalışılmıştır.

4.3.3.1. Çekirdeğe Enkapsülasyon

Enkapsülasyon işlemi A4 formülasyonunda gerçekleştirilmiştir. Genetik materyalin enkapsülasyonu için, formülasyonun 50 µL'sinde 0,5 µg pDNA olacak şekilde A4 formülasyonunda kullanılan **K4** çekirdeğinin hazırlanma aşamasında, kitosan/su/alkol karışımına pDNA ilave edilmiştir. pDNA'nın enkapsüle edilmiş **K4** çekirdeği 4.3.1'de anlatıldığı gibi yüzey etki madde eklemiş ve alkolü uçuktan sonra DOTAP® ve DSPE-PEG2000 ile kaplanmış ve yüzeyine albümin çözeltisi adsorbe edilmiştir. Bu formülasyon **A4D1** olarak adlandırılmıştır.

4.3.4.2. Çekirdeğe Adsorbsiyon

Genetik materyalin adsorbsiyon işlemi hem A4 hem A7 formülasyonları için uygulanmıştır. Kullanılan genetik materyal, A4 için pDNA, A7 için siRNA'dır. Genetik materyal miktarı, pDNA için; formülasyonun 50 µL'sinde 0,5 µg olacak, siRNA için ise; formülasyonun 50 µL'sinde 0,2 µg olacak şekilde ayarlanmıştır. Adsorbsiyon işlemi, her iki formülasyonun çekirdek kısmı hazırlandıktan sonra **K4 ve Ç2**'ye uygulanmıştır. Genetik materyal, pozitif yüzey yüküne sahip çekirdekten gerekli miktarlarda alındıktan sonra bir mikrotüp içerisinde 37 °C'de 30 dakika inkübasyona tabi tutulmasıyla partiküllere adsorbe edilmiştir. Daha sonrasında çekirdeklerin DOTAP® / DSPE-PEG2000 ve DSPE-PEG2000 ile kaplanması gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında, dış yüzeyin **bölüm 4.3.1.** de anlatıldığı gibi albümin ile ve bölüm 4.3.2.'de anlatıldığı gibi albümin nanopartiküllerinin (**Ç2**) adsorbsiyonu gerçekleştirilmiştir. Genetik materyalin çekirdeğe adsorbe edilmiş hali ile oluşturulan A4 formülasyonuna **A4D2**, A7 formülasyonuna ise **A7siR** isimlendirilmesi yapılmıştır.

4.4. A4 ve A7 Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

Bu kısımda A4 ve A7 ve bunlardan türetilmiş formülasyonların yüzey morfolojisi, pH değeri ve genetik materyal bağlama yetisi gibi fizikokimyasal özellikler ile sitotoksisite ve transfeksiyon çalışmaları yürütülmüştür.

4.4.1. Morfolojik inceleme

A4 ve A7 Formülasyonların morfolojik incelemesi taramalı elektron mikroskobu (SEM: Scattering electron microscope, SUPRA 50VP model, Oberkochen, Germany) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Örnekler çift taraflı yapışkan karbon bantlar üzerine damlatılmış ve oda ısında kurutulmuştur. Daha sonra 100 Å kalınlıkta olacak şekilde altın kaplama yapılmıştır. Görüntüler 5kV-yüksek büyütme gözlem koşulu, şarjlanma azaltıcı gözlem modu ve vakum altında SE görüntü sinyalinde alınmıştır.

4.4.2. pH değeri

Hazırlanan formülasyonların pH değerleri pH-metre ile belirlenmiştir. Hazırlanan formülasyonlar bir behere aktarılmış ve pH metrenin probu bu dispersiyonlara batırılarak cihazın gösterdiği değerler kaydedilmiştir.

4.4.3. Jel Retardasyon Çalışmaları

Bu çalışma, formülasyonların DNA ve siRNA bağlama oranlarının belirlenmesi için ve ayrıca yüklenen siRNA'nın serum varlığında olası değişiminin belirlenmesinde kullanılmıştır. TAE ve TBE ile hazırlanmış % 2.5 ve % 1.5'luk agaroz jel kullanılmıştır. Örnekler, 50 mV uygulanarak ~1-2 saat jelde yürütülmüş ve jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

siRNA elektroforez işlemi için % 2.5 agaroz içeren jel hazırlanmıştır. Yürütme tamponu ve jel hazırlamak için stok 10 X TBE'den hazırlanan 1 X TBE kullanılmıştır. DNA elektroforez işlemi için %1.5 agaroz jel hazırlanmıştır ve 50 X TAE'den hazırlanan 1 X TAE kullanılmıştır.

Tris free base

Glacial Acetic Acid 57.1 ml

10 X TBE (1 L pH 8.0)

Trizma Baz 108 g
Borik asit 55 g
0.5 M EDTA 40 mL

50 X TAE (1 L pH 8.0)

Trizma Baz 242 g
Disodyum EDTA 18.61 g
Glasiyal Asetik Asit 57.1 ml

- 100 mL 1 X tampona 1.5 g (DNA için) ya da 2.5 g (siRNA için) agaroz eklenmiş ve manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözünmesi sağlanmıştır.
- Jel çözeltisi yaklaşık 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine % 5 oranında etidyum bromür (10 mg/mL) eklenerek jel tepsisine dökülmüştür.
- Üzerine uygun taraklar konularak jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Jel polimerleştikten sonra üzerine uygun 1 X tampon konularak taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.
- Yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir.
- Örneklerin, 50 mV uygulanarak ~1-2 saat jelde yürütülmesi ve jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmesi sağlanmıştır.

4.4.4. Serum içindeki kararlılık

Hücrelerde maksimum etkinlik gözlemlenmesi için formülasyonların genetik materyali serum bileşenlerine karşı koruması gerekir. Bu sebepten genetik materyal içeren formülasyonun serum bileşenleri içeren besiyerindeki davranışlarını incelemek gerekmektedir (Büyükköroğlu vd., 2016). Bu inceleme; transfeksiyon işleminde kullanılan oranlarda siRNA yüklenmiş formülasyonun %10 fetal sıgır serumu (fetal bovine serum, FBS) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ile 37 °C'de 1 saat, 4 saat, 10 saat, 24 saat ve 48 saat inkübasyona bırakılarak yapılmıştır.

4.5. Hücre Kültürü

Hücre olarak A549 insan akciğer kanser ve 3T3 sağlıklı fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin üretiminde ve formülasyonların uygulanması işlemlerinde hücre kültürü tekniğinden faydalanılmıştır. Tekniğin uygulanmasında;

- Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, %1 glutamin içeren DMEM içerisinde kültüre edilmiştir.

- Hücre kültürünün yapıldığı ortam 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer koşullarındadır.
- Hücrelerin hızlı büyüme evresine ulaşması durumunda, 2X Tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilerek alt kültürlerle ayrılması sağlanmıştır.
- Kullanılmayan alt kültürler kademeli olarak soğutularak hücre stoğu haline getirilip, -80 °C’de belirli süre saklanmıştır.

4.5.1. Sitotoksikite çalışması

Hücre tabanlı sitotoksikite çalışmaları, formülasyonun ve etkin maddenin hücre proliferasyonu üzerinde etkisi olup olmadığını veya hücrelerin ölümüne sebep olacak toksik dozu belirlemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Tetrazolyum indirgeme yöntemi hücre canlılığını belirlemede kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Bu yöntemde bir plaka okuyucu tarafından saptanabilen renkli veya flüoresan bir ürün elde edilecek şekilde test edilecek numunenin hücre popülasyonuna maruz bırakılması işlemi esastır (Riss vd., 2016).

MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolyum bromür), suda çözünebilen bir tetrazolyum tuzudur ve hücre mitokondrisinde suda çözünmeyen formazan denen bir maddeye indirgenir. Formazan, hücre zarından geçemez ve bu sebepten sağlıklı hücrelerde birikme gösterir (Fotakis ve Timbrell, 2006). Bu durum canlı ve mitokondriyal aktivitesi sağlam hücrelerin mor renge boyanmasını sağlarken, ölü veya mitokondriyal aktivitesi bozulmuş hücrelerin boyanmamasına sebep olur. Hücrelerin MTT indirgeme fonksiyonu hücre canlılığını gösteren bir parametredir ve MTT çalışmaları sonrasında gözlemlenen boya yoğunluğu hücre canlılığı ile doğru orantılıdır (Van Meerloo vd., 2011; Riss vd., 2016).

Bu tez çalışmasında formülasyonların hücre üzerindeki sitotoksikitesinin tespit edilmesi amacıyla MTT testi uygulanmıştır.

- Hücreler kültüre edildikten sonra % 10 FBS içeren DMEM besiyerinde süspansiyon şeklinde hazırlandıktan sonra *Thoma* lamı üzerinde hücre sayımı yapılmıştır.
- Her bir kuyuda 12.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya göre hücre süspansiyonunun konsantrasyonu ayarlanmış ve plakalara hücre ekimi yapılmıştır.

- 1 günlük üreme süresinin ardından sitotoksik etkinin gözlenmesi için hazırlanan formülasyonlar 2. gün hücrelerin üzerine eklenmiştir. Üzerine formülasyon ilave edilmeyen kontrol hücreleri ile birlikte 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer koşullarında 24-48 saat inkübasyon işlemine bırakılmıştır.
- 24-48 saatlik inkübasyon işlemi sonrasında kuyucuklarda bulunan besiyerileri uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış MTT boyasından 20 µL ilave edilmiştir.
- MTT boyasının canlı hücreler tarafından formazan tuzuna dönüştürülmesi için 37°C’de 4 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.
- 4 saatlik inkübasyon işlemi sonrasında MTT boyası kuyucuklardan uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklenerek tekrar 37°C’de 30 dakikalık inkübasyona bırakılmıştır.
- 30 dk’lık inkübasyon işlemi sonrasında gerçekleşen renk değişimini belirlemek için 570 nm’lik dalga boyunda ölçüm yapmak üzere plakalar *Cytation 5* plaka okuyucuya alınmıştır.
- Deney her bir derişim için 8 kuyuda yapılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir.

4.5.2. Transfeksiyon çalışması

Transfeksiyon çalışması formülasyonların genetik materyali hücre içine aktarabilme kapasitesini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmadır. FITC-etiketli siRNA kullanılmıştır. FITC-etiketli siRNA hücresel alım sağladıktan sonra hücre içerisinde göstermiş olduğu floresan ışıma özelliğinden faydalanarak konfokal mikroskop ile görüntülenebilirler (Ye vd., 2018). Hücre olarak A549 akciğer kanser ve 3T3 sağlıklı fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Belirli miktarlarda formülasyon ile enkapsüle edilmiş FITC-etiketli siRNA yüklü formülasyonlar aşağıdaki protokole uygun bir şekilde çalışılmıştır. FITC-etiketli siRNA’nın etkinliğinin ve formülasyonların taşıma kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla Lipofectamine® 2000 kontrol taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır (Lipofectamine® 2000 firmanın belirttiği protokol dahilinde hazırlanmıştır).

- İlk gün 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına antibiyotik içermeyen %10 FBS içeren besiyeri ile hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve kuyudaki yoğunluk %60-70

oranında olacak şekilde 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer koşullarında 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutulmuştur.

- 1 günlük üreme süresinin ardından kuyucuklarda bulunan besiyeri uzaklaştırılıp kuyucuklar 1X PBS tamponu ile bir kez yıkanmıştır.
- Çeşitli miktarlarda hazırlanan formülasyonlar antibiyotik ve FBS içermeyen besiyeril ile hazırlanıp hücrelere damlatılarak ilave edilmiştir.
- Plakalar tekrardan 37°C'de inkübasyon işlemine bırakılmıştır. Plakalar inkübasyona bırakıldıktan 6 saat sonra formülasyon içeren besiyerilerinin üzerine antibiyotik içermeyen ve %20 FBS içeren besiyeri ilavesi yapılmıştır.
- 24 ve 48 saat inkübasyon süreçlerinin ardından plakalar floresan mikroskopu altında incelenmeye alınmıştır.

Transfeksiyon işlemi sonrasında hücrede gerçekleşen etkinlik mikroskobik olarak değerlendirilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyon periyotlarının ardından Lipofectamine® 2000 ve uygulanan formülasyonlar için transfeksiyonun gerçekleştiği ve gerçekleşmediği hücreler aynı bölgede mikroskobik olarak incelenmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Birçok hastalıkta sistemik veya lokal olarak uygulanabilecek nitelikte siRNA taşıyıcı vektörlerin geliştirilmesi son yıllarda oldukça ön plandadır. siRNA taşınmasında kullanılan vektörlerin tasarlanmasında; vektörün partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyel değeri, siRNA yüklü partiküllerin serum içindeki kararlılığı, genetik materyalin hücre içine taşınması ve endojen RISC molekülü ile siRNA'nın etkileşim göstermesi için sitoplazma içinde salım gibi başlıklar göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Şenel, 2012).

5.1. Ön Çalışmalara Ait Bulgular

Bu tez çalışmasında hücre içerisine siRNA taşınmasını sağlayabilmek amacıyla albümin nanopartikül sistemi tasarlanmaya çalışılmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında uygun zeta potansiyel değerlerine ulaşmak için üç çeşit katyonik ajan (DOTAP®, oktadesilamin, kitosan oligosakkarit laktat), kararlılığı arttırmak için DSPE-PEG2000 polimer-lipit kompleksi ve/veya Tween® 80 yüzey etkin maddesi kullanılmıştır.

Hazırlanan ön formülasyonların homojen yapıda olmaması veya agregasyon oluşturması, bu sorunların olmadığı durumlarda ise istenen partikül boyut ve dağılımı ile zeta potansiyel değerlerine sahip olmamasından dolayı birçok formülasyon denemesi yapılmıştır.

Ayrıca ilerleyen aşamalarda formülasyonun genetik materyali tutma kapasitesi, dış yüzeyinde bulunan albüminleri tutma kapasitesi, sitotoksik etki göstermesi, transfeksiyon verimliliği gibi sebeplerden dolayı formülasyonlarda tekrar değişikliklere gidilmiştir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirilmesi için ve optimum formülasyonların seçilmesi için hazırlanan formülasyonların öncelikle partikül boyutları, dağılımları ve yüzey yükleri araştırılmıştır.

5.2. Partikül Boyutu ve Dağılımı

Nanopartikül taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu ve dağılımının belirlenmesi, kullanılan maddelerin ve metodun seçilmesinde, tasarlananan sistemin uygulama

yolunun belirlenmesinde ve taşıyıcı sistemin kararlılığının gözlemlenmesi için önemlidir. Partikül boyutunun küçük olması kararlılığı arttırmakta, toksik etkinin azalmasına sebep olmaktadır. Nanopartiküllerin de dahil olduğu kolloidal sistemler için partikül boyutu 1 μm 'nin altındadır ve tasarlanan taşıyıcı sistemin partikül boyutunun mikronaltı, dağılımının ise dar aralıkta olması istenir (Büyükköroğlu, 2005).

Genetik materyal taşınması amacıyla tasarlanan sistemlerde ise partikül boyutu özellikle de transfeksiyon işleminin değerlendirilmesi amacıyla oldukça önemlidir. Transfeksiyonun etkin bir şekilde gerçekleşmesi için belirgin bir partikül boyutu yoktur. Daha önceki çalışmalara göre yaklaşık 200 nm çap uzunluğuna sahip nanopartiküllerin transfeksiyon verimliliğinin iyi sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir. Büyük partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin hücre yüzeyine daha kolay yerleştiği ama küçük partikül boyutundaki nanopartiküllerin hücre içine alımının daha kolay olduğu belirtilmiştir (Rao, 2010). Tablo 5.1'de önçalışmalarda hazırlanan formülasyonların partikül boyutları ve dağılımlarına ait veriler sunulmuştur.

Tablo 5.1. Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve polidispersite indisi (SH:Standart Hata, PDI:Polidispersite İndisi, $n=3$)

Formülasyon	Ortalama Partikül Boyutu (nm) $\pm$ SH	PDI $\pm$ SH
F1	159.22 $\pm$ 11.78	0.32 $\pm$ 0.13
F2	297.41 $\pm$ 4.96	0.38 $\pm$ 0.06
F3	104.50 $\pm$ 31.32	0.81 $\pm$ 0.05
F4	694.36 $\pm$ 28.17	0.71 $\pm$ 0.01
F5	34.42 $\pm$ 8.42	0.40 $\pm$ 0.03
F6	127.64 $\pm$ 5.66	0.44 $\pm$ 0.06
K2	178.44 $\pm$ 21.01	0.18 $\pm$ 0.09
K3	66.22 $\pm$ 17.15	0.65 $\pm$ 0.02
K4	275.53 $\pm$ 16.21	0.51 $\pm$ 0.03
K5	689.21 $\pm$ 12.09	0.67 $\pm$ 0.04
K4k	751.9 $\pm$ 54.16	0.632 $\pm$ 0.11
A2	157.0 $\pm$ 28.2	0.651 $\pm$ 0.05
A3	135.0 $\pm$ 33.62	0.741 $\pm$ 0.09
A4	203.2 $\pm$ 43.36	0.662 $\pm$ 0.03
A5	140.8 $\pm$ 4.05	1.00 $\pm$ 0.00

A6	262.2 ± 11.17	0.291 ± 0.06
A7	227.5 ± 13.04	0.359 ± 0.025

İlaçların inhalasyon yolu ile taşınması, epitelyuma direk ulaşabilme, sistemik sitotoksiteden kaçabilme ilk geçiş metabolizmasından korunma gibi yararlarının yanında, ilaçların etkili ve hızlı absorpsiyonunda akciğerlerin geniş bir yüzey alanı, ince alveolar epitelyum ve zengin bir damar ağına sahip olması büyük avantaj sağlamaktadır (Sou vd.,2013). İnhaler uygulanan partiküllerin, akciğerde ulaştıkları alana göre ultra ince partiküller (ultrafine particles; < 0.1 µm), ince partiküller (fine particles;0.1-2 µm) ve kaba partiküller (coarse particles; >2 µm) olarak tanımlanabilir. Boyutları 0.5 µm 'den küçük olan parçacıklar alveolde difüzyon mekanizmasıyla birikmektedir (El-Sherbiny vd., 2015) Akciğer, yaklaşık 300-500 milyon alveolden oluşmaktadır ve 100 m² yüzey alanına sahiptir (Nahar vd., 2013). Ayrıca alveoler makrofajların 1.5-3 µm arasında değişen büyüklükteki partikülleri yakaladığı bildirilmiştir (El-Sherbiny vd., 2015). Elde edilen sonuçlarda hazırlanan tüm formülasyonların partikül boyutlarının 1.5 µm'den küçük oluşu, formülasyonların makrofajlar tarafından yakalanmayacağına ve ortamdan makrofajlar aracılığı ile uzaklaştırılmayacağına işaret etmektedir. **F2, F4, K4 ve K5** formülasyonları haricinde diğer formülasyonların 200 nm'nin altında kaldığını belirlenmiştir. Ortalama büyüklüğü 200 nm'den küçük partiküllerin hücresel alımlarının daha yüksek olduğu (Marsh vd., 2003). ve gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR; enhanced permeability and retention) yoluyla pasif tümör hedefleme kabiliyeti gösterdiği ve bunun da akciğer kanseri tedavisinde etkinliği sağladığı belirtilmiştir (Nimmano vd., 2018). **F1, F2, K2, K4** formülasyonlarının istenen özellikte partikül boyutuna yakın değerlere sahip olduğu görülmektedir.

PDI, belirli bir sistemdeki partikül büyüklüğü dağılımının homojenliği hakkında bilgi veren bir oran olan dağılımın kalitesini 0-1 aralığında yansıtır. PDI'nin 0.01 ile 0.7 değerleri arasında olduğunda taşıyıcı sistemin monodispers, 0.7'nin üzerinde bir değer gözlemlendiğinde ise geniş partikül boyutu dağılımına sahip olduğu belirtilmiştir (Nidhin vd., 2008). Bu da, **F4 ve K1** dışında ki tüm formülasyonların monodispers sistemler olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

A serisi formülasyonları için yapılan analizlerde **K4k** formülünün 1:1 oranında albümin ile kaplanmış hali olan **A4** formülasyonu ve 1:1.5 oranında albümin ile

kaplanmış hali olan **A6** formülasyonu partikül boyutu 200 nm değerine yakındır. Sadece DSPE-PEG2000 ile kaplanmış son formül **A7** ise 200 nm partikül boyutuna yakın bir değer göstermektedir. Bu formüller partikül boyutu açısından kullanıma en uygun formülasyonlar olarak kabul edilmiştir.

5.3. Zeta Potansiyel Değeri

Zeta potansiyel, partikülün etrafında bulunan elektriksel çifte tabakanın sabit kısmı ile nötr bölge arasındaki potansiyel farktır. Zeta potansiyel ölçümleri partiküllerin bir elektriksel alan içerisindeki elektroforetik hareketlerinden yararlanılıp zetametre ismi verilen cihazlar aracılığı ile yapılır. Cihaz ölçümleri elektroforetik hareketin mikroskop altında izlenebilen bir mikroeletroforez hücresi kullanarak gerçekleştirir. Elektroforetik hareket ölçüldükten sonra ortamın viskozluğu ve dielektrik sabiti bilindiği takdirde Helmholtz-Smoluchowski eşitliğinden faydalanılarak zeta potansiyel hesaplanır (Öner, 2012).

Zeta potansiyelinin 30 mV'tan daha yüksek pozitif veya -30 mV'tan daha yüksek negatif olması sistemin monodispers olmasını sağlamaktadır. Diğer yandan 5 mV'tan düşük, -5 mV'tan yüksek olacak şekilde nötr değere yakın olması da agregasyona sebep olabilmektedir (Gumustas vd., 2017).

Zeta potansiyeli ayrıca hücresel alım ve transfeksiyon etkinliği için de oldukça kritik bir parametredir. Pozitif yüklü partiküllerin hücre membranında bulunan negatif yüklü komponentler ile etkileşimi sayesinde hücresel alımı kolaylaşmaktadır (Layek ve Singh, 2017).

İlk etapta etkin bir transfeksiyon ve hücresel alım sağlamak için pozitif değerler elde edilmeye çalışılarak hazırlanan formülasyonlardan **F1**, **F2**, **F3** ve **F4** formülasyonlarının zeta potansiyelleri negatif çıkmıştır. Bu nedenle katyonik ajanın formülasyona dahil ediliş şeklinde değişikliğe gidilmiş olup, çekirdeği oluşturan albumin nanopartikülleri üzerine pozitif yük taşıyacak bir kaplama işlemine geçiş yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 2 mg DOTAP® ve 4 mg DSPE-PEG2000 kaplama işlemine geçiş yapılan **F5** ve 4 mg DOTAP® ve 4 mg DSPE-PEG2000 ile kaplama yapılan **F6** formülasyonları pozitif zeta potansiyel değeri vermiş olmasına rağmen, düşük değerler elde edildiği için çekirdek kısmı hazırlanırken DOTAP yerine kitosan oligosakkarit formülasyona dahil edilmiştir (**Tablo 5.2**).

Tablo 5.2. Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyelleri (SH:Standart Hata, n=3)

Formülasyon	Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ SH
F1	-13.62 $\pm$ 1.38
F2	-28.31 $\pm$ 1.93
F3	-25.80 $\pm$ 4.82
F4	-21.06 $\pm$ 2.01
F5	+2.62 $\pm$ 0.04
F6	+13.53 $\pm$ 2.24
K2	+9.72 $\pm$ 1.40
K3	+20.48 $\pm$ 2.71
K4	+38.20 $\pm$ 2.43
K5	+39.09 $\pm$ 1.04
K4K	+51.50 $\pm$ 4.31
A2	+32.52 $\pm$ 4.02
A3	+28.14 $\pm$ 2.10
A4	+35.87 $\pm$ 3.06
A5	+26.59 $\pm$ 6.15
A6	+20.01 $\pm$ 3.77
A7	-18.30 $\pm$ 0.43

Kitosanlı formüllerin tümü pozitif zeta potansiyel göstermiştir. 8 mg Kitosan ile hazırlanan formülasyon **K4** ve 16 mg kitosan ile hazırlanan **K5** formülasyonları +30 mV değerinden daha yüksek bir pozitif sonuç gösterdiği için monodispers sistemler olarak kabul edilebilir. **K4** ve **K5** formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri arasında pek fazla bir fark olmadığı için 8 mg kitosan kullanılan **K4** formülasyonu ile devam edilmiştir.

K4 ve **K5** formülasyonları arasındaki zeta potansiyel farkının az olması, albümin partiküllerinin kitosana bağlanma açısından belli bir doygunluğa ulaşmış olduğu düşünülmektedir.

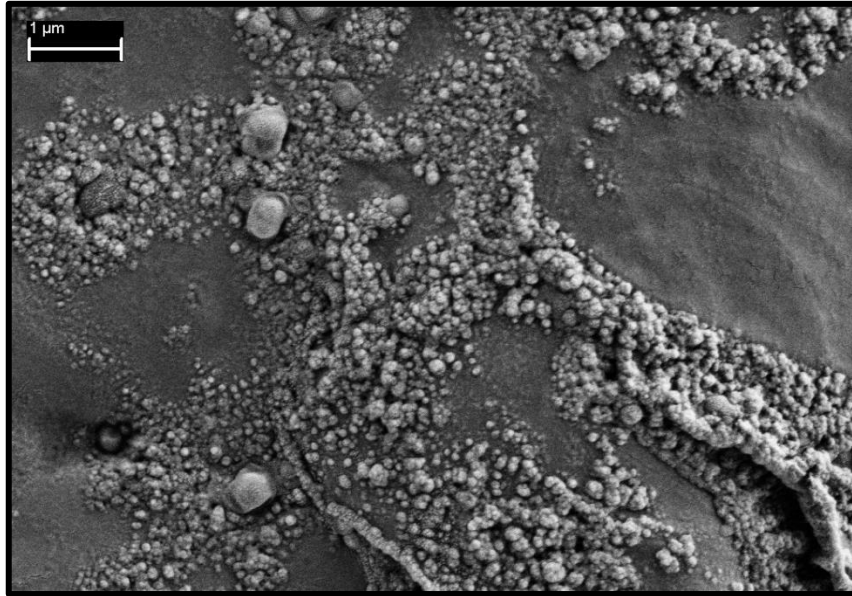
Yapılan analizler doğrultusunda **K4k** formülasyonu oldukça yüksek zeta potansiyel değeri göstermektedir fakat dış kısmına albümin adsorbsiyon işlemi gerçekleştirilmemiş bir formüldür. Ara formül olarak kabul edilen K4k'den yola çıkarak

hazırlanan formüller (A2, A3, A4, A5, A6) içerisinde **A2** ve **A4**, +30 mV değerinden daha yüksek zeta potansiyel gösterdiği için monodispers sistemler olarak kabul görmüştür.

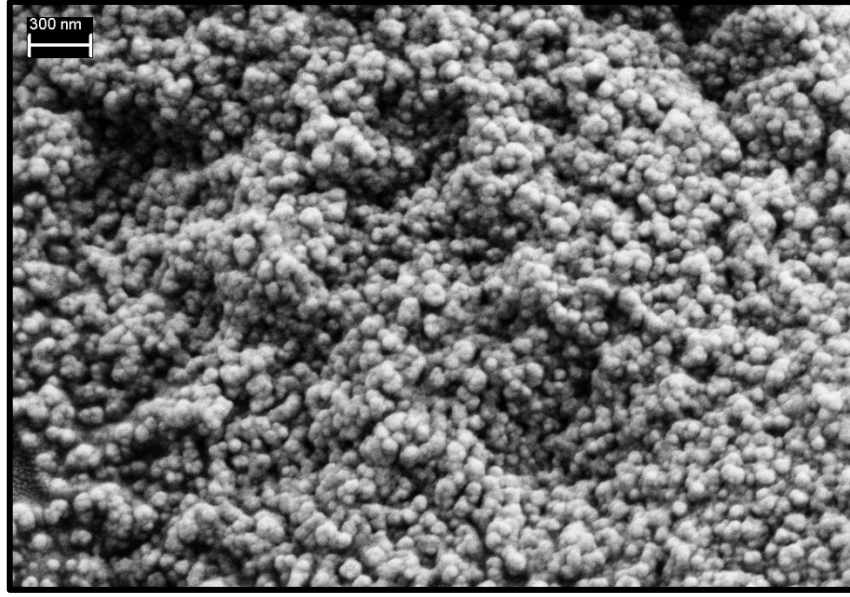
siRNA'nın yüklenmesine çalışıldığı **A7** formülasyonu kaplama işlemi sonrasında -19.4 ± 0.98 mV zeta potansiyel değerine ulaştıktan sonra, pozitif yük kazandırılmış albümin (**Ç2**) ile tekrar inkübe edildikten sonra zeta potansiyel değerinde nötrleşme gerçekleşmemiştir.

5.4. A4 ve A7 Formülasyonların Morfolojisi

Nanopartiküllerin morfolojik olarak analiz edilmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile gerçekleştirilebilir (Ekambaram vd., 2012). Albümin nanopartiküllerinin SEM analizi yapıldığı çalışmada nanopartiküllerin düzgün bir dağılıma sahip olduğu ve pürüzsüz bir yüzeye sahip küresel şekil sergiledikleri görülmüştür (Santos-Rebelo vd., 2018). Hazırlanmış olan **A4** ve **A7** formülasyonumuzun SEM görüntüsü **Şekil 5.1** ve **5.2**'de verilmiştir. Bu görüntüler partiküllerin küresel yapıya sahip olduğunu ve 200 nm'nin altında olduğunu işaret etmektedir.



Şekil 5.1. A4 formülasyonunun SEM görüntüsü (33000 X büyütme)



Şekil 5.2. *A7 formülasyonunun SEM görüntüsü (74000 X büyütme)*

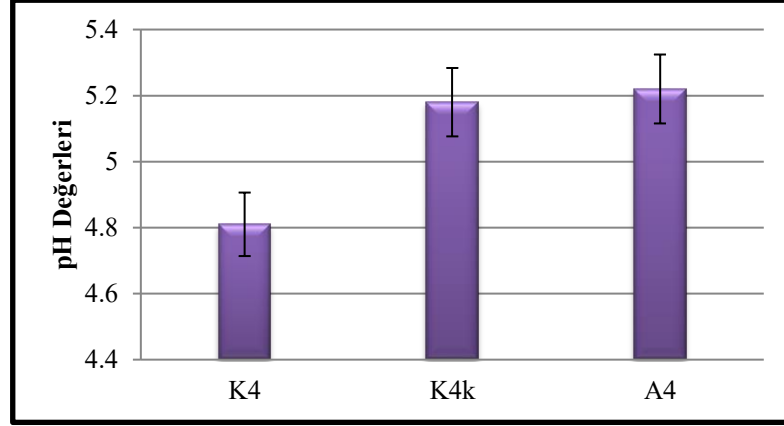
Çalışmanın bu aşamasında hazırlanan **A4** ve **A7** formüllerinin SEM ile elde edilen görüntüler doğrultusunda nanopartiküllerin şekilleri literatürde belirtilen görüntüler ile uyumluluk göstermektedir.

5.5. Formülasyonların pH Değeri

Bir diğer önemli parametre formülasyonların pH değerleridir. Formülasyonların pH değerlerinin belirlenmesi hücre kültürü çalışmalarında besiyerinin pH'sı üzerinde olabilecek değişimi tespit etmek içindir. A549 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, transfeksiyon verimliliği pH 6.9 – 7.6 aralığında değerlendirilmiş ve pH 6.9'daki transfeksiyonun pH 7.6'dakinden daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen verilere göre ortamda bulunan bileşiklerin pH 6.9'da daha pozitif bir yük gösterdiği ve hücrelerin negatif yüzeyi ile daha iyi elektrostatik etkileşim yaptığı anlaşılmıştır (Sato vd., 2001). Bu sebepten dolayı formülasyonların pH'ları transfeksiyon etkinliğinde önemli bir rol oynamaktadır.

A4 formülasyonu için 3 farklı aşamada pH kontrolü yapılmıştır. Bunlar, 1) **A4**'ün çekirdeğini oluşturan **K4**, 2) **K4**'nın DOTAP® ve DSPE-PEG2000 ile kaplaması

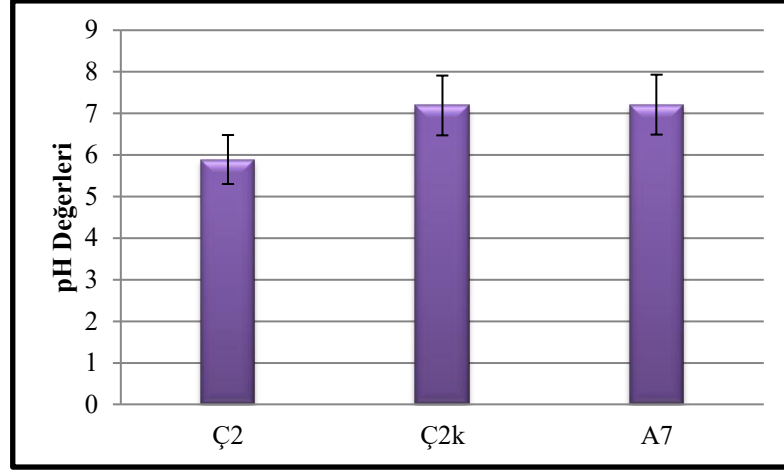
sonrasında elde edilen **K4k** ve 3) **K4k**'ya albümin adsorbsiyonu ile oluşturulan **A4** formülasyonudur. Bu sonuçlara ait değerler Şekil 5.3'de sunulmuştur.



Şekil 5.3. **K4**, **K4k** ve **A4** formülasyonlarının pH değerleri

Formülasyonlarda gözlemlenen pH değerlerine göre **K4**'ün pH'sı 4.8 olarak tespit edilmiştir. **K4k** ve **A4** için saptanan pH değerleri 5.2'ye yakın olduğundan her üç formül için de pH seviyesinin transfeksiyon çalışmaları için uygun bulunmamıştır. PH değerleri düşük bulunması bu formülasyonun içerdiği kitosan oranının fazlalığına bağlanmıştır.

2 mg kitosan ile hazırlanan ve DOTAP[®] katyonik lipitin kullanılmadığı **A7** formülasyonu için de aynı şekilde 3 farklı pH ölçümü yapılmıştır. Bunlar, 1) **A7**'in çekirdeğini oluşturan **Ç2**, 2) **Ç2**'nin DSPE-PEG2000 ile kaplaması sonrasında elde edilen **Ç2k** ve 3) **Ç2k**'ya **Ç2**'nin adsorbsiyonu ile oluşturulan **A7** formülasyonudur. Bu sonuçlara ait değerler Şekil 5.4'de sunulmuştur.



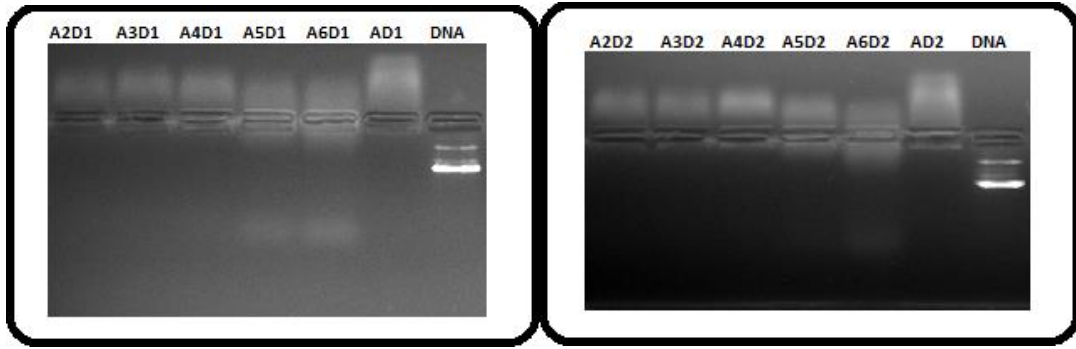
Şekil 5.4. Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonlarının pH değerleri

A7 formülasyonunun farklı aşamalarından alınan veriler doğrultusunda gözlemlenen pH değerleri A4 formülasyonuna göre yüksek bulunmuştur ve pH 7'ye yakın sonuçları içermektedir. Ç2'nin pH değeri 5.9 olarak tespit edilmişken, kaplama işlemi ve albumin adsorbsiyonu sonrasında pH'nın 7.2'ye yükseldiği gözlenmiştir. Bu pH değerlerinin hücre kültürü çalışmalarında besiyeri pH'sında büyük değişiklikler yapmayacağı düşünüldüğünden, bu formülasyonların transfeksiyon çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir.

5.6. Formülasyonlara Albumin Bağlanması

Formülasyonların genetik materyale bağlanma yetisinin araştırılması öncelikli olarak laboratuvarımızda bulunana plazmit DNA ile yapılmıştır. pDNA molekülünün siRNA'dan büyük olması, pDNA'yı bağlayabilen bir formülasyonun siRNA'yı daha etkin bağlayacağı görüşüyle, elimizdeki miktarı çok az olan siRNA'nın ön çalışmalarda harcanmaması için pDNA ile çalışmalar yürütülmüştür. K4 çekirdek formülasyonunun hazırlaması sırasında pDNA eklemiş ve DOTAP® ve DSPE-PEG2000 ile kaplanmıştır. Çekirdek formülasyona pDNA enkapsüle edilmiş ilk formüle AD1 kodu verilmiştir. K4k çekirdek formülasyonuna pDNA'nın adsorbsiyonu ile elde edilen formülasyonlar ise AD2 olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bu formülasyonlara Gp60 patway'ini kullanabilmek için albumin adsorbsiyonu gerçekleştirilmiştir. Albumin in jelde ışıma verdiğinin farkedilmesinden sonra, AD1 ve AD2 formülasyonlarının en fazla adsorbe edebildiği albumin oranı jel görüntüleri ile belirlenmiştir. Bunun için, 500 µL AD1 ve

AD2'den 2 mL'lik mikrotüpe örnekler alınmış üzerine sırasıyla formülasyonların miktarının 1/3, 1/2, 1, 1.5 ve 2 katı oranında albümin çözeltisi (10 mg/mL konsantrasyonunda) eklenmiş ve yatay çalkalayıcı da 100 rpm, 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler jele yüklenerek görüntüler alınmıştır (Şekil 5.5).



Şekil 5.5. *AD1 ve AD2 Formülasyonlarına adsorbe edilen albümin miktarı. Kuyularda 0.5 µg DNA, 50'şer µL formül bulunmaktadır. %1.5'lik agaroz jel, 2 saat 50 volt.*

Tablo 5.3. *Jele yüklenen AD1 ve AD2 Formülasyonları ile albümin çözeltisi oranları.*

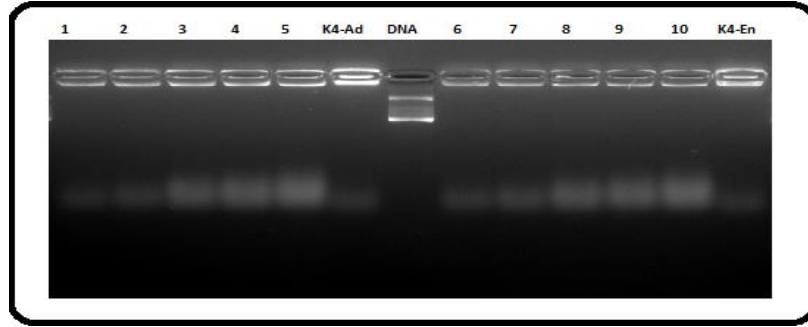
	A2D1	A3D1	A4D1	A5D1	A6D1	DNA
AD1 : Albümin çözeltisi	1:1/3	1:1/2	1:1	1:1.5	1:2	0.5 µg
	A2D2	A3D2	A4D2	A5D2	A6D2	DNA
AD2: Albümin çözeltisi	1:1/3	1:1/2	1:1	1:1.5	1:2	0.5 µg

Yapılan çalışmalar sonucu, hazırlanan formülasyonların pDNA'yı tutma kapasitesi gözlemlenirken, elde edilen veriler doğrultusunda albüminin bir kısmının formülasyon tarafından tutulmadığı gözlenmiştir.

Jel görüntülerinden alınan bilgilere göre çekirdekte bulunan albümin miktarının 1.5 katı albümin adsorbsiyonu gerçekleştirildiğinde (A5D1) kuyunun altında, albüminin bant şeklinde bir parlaması gözlemlenmiştir. Bu sonuç, adsorbsiyon için kullanılan bu oranın formülasyon için fazla olduğunu göstermektedir, bu sebepten çekirdekte bulunan albümin miktarına eşit konsantrasyonda albümin çözeltisi ile adsorbsiyon işlemi gerçekleştirilmesi gerektiği ve A4D1 ve A4D2'deki oranların albümin adsorbsiyonu için uygun miktar olduğu belirlenmiştir.

pDNA enkapsüle ve adsorbe edilmiş K4 formülasyonunun albümin tutma kapasitesi de ayrı bir çalışma olarak değerlendirilmiştir. Buradaki amaç, tasarlanan formülasyonlar için DOTAP® ve DSPE-PEG2000 ile kaplama işlemi yapılmadan

adsorbe edilen albümin miktarının belirlenmesidir. Yapılan çalışmada, yukarıda belirtildiği oranlarda albümin çözeltisi pDNA enkapsüle ve adsorbe edilmiş **K4** formülasyonu ile muamele edilmiş ve jel de yürütülmüştür (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. K4-Adsorbe DNA (**K4-Ad**) ve K4-Enkapsüle DNA (**K4-En**) formülasyonuna adsorbe edilen albümin miktarı. Kuyularda 0,5 µg DNA, 50'şer µL formül bulunmaktadır. %1,5'lik agaroz jel, 2 saat 50 volt.

Tablo 5.4. Jele yüklenen K4-Adsorbe DNA (**K4-Ad**) ve K4-Enkapsüle DNA (**K4-En**) formülasyonuna adsorbe edilen albümin çözeltisi oranları.

	1	2	3	4	5	K4-Ad	DNA
K4-Adsorbe DNA: Albümin çözeltisi	1:1/3	1:1/2	1:1	1:1.5	1:2	1	0.5 µg
	6	7	8	9	10	K4-En	DNA
K4-EnkapsüleDNA: Albümin çözeltisi	1:1/3	1:1/2	1:1	1:1.5	1:2	1	0.5 µg

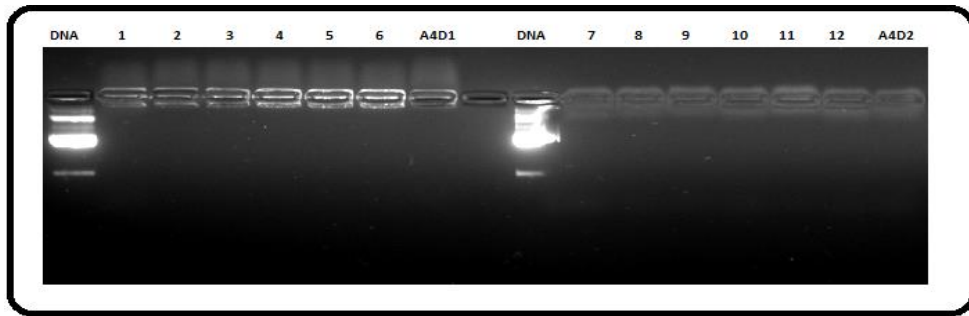
Burda yapılan jel çalışmasında **K4-Ad** ve **K4-En** formülasyonlarına kaplama yapılmadan albümin adsorbe edilmek istendiğinde, çekirdek formülasyonda bulunan albümin miktarının 1/3'ü kadar albümin adsorbsiyonu gerçekleştirilememiştir. En az orana sahip olan bu formülasyonun albüminlerin hepsini tutamadığı gözlenmiş olup, DOTAP® ve DSPE-PEG2000 ile kaplama işleminin formülasyonun albümini tutma kapasitesinde artış sağladığını göstermektedir.

5.7. A4 formülünün pDNA bağlama oranının belirlenmesi

Bu aşamaya kadar tasarlanmak istenen formülasyon için partikül boyutu, zeta potansiyel değerlerinin yanında, formülasyonun dış kısmında gerçekleştirilmek istenen albümin adsorbsiyonu için de ideal oranın belirlenmesi işlemi için jel çalışmaları

yapılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda **K4k** formülasyonuna, çekirdekte bulunan albümine eşit miktarda albümin adsorbsiyonu gerçekleştirip **A4** formülasyonuna ulaşılmıştır.

A4 formülasyonu için; **K4** çekirdeği hazırlandıktan sonra pDNA'nın enkapsüle ve adsorbe edilmesinin daha verimli olduğu jel görüntüleriyle belirlenmiştir. Sonradan inkübasyon işlemi yapılarak dahil edilen pDNA genetik materyali üzerine DOTAP® ve DSPE-PEG2000 ile kaplama yapılması ile elde edilen **K4k** formülasyonunda pDNA tekrardan enkapsüle hale gelmektedir. 50 µL **K4k** formülasyonda 0.5 µg pDNA bulunmaktadır. Bu formülasyonun zeta potansiyeli +35.28 bulunduğundan, üzerine farklı oranlarda pDNA adsorbe edilerek daha fazla pDNA yükleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için, her bir kuyucuk için 50 µL K4k formülasyonu ayrı ayrı mikrotüplere alınmış, üzerine sırasıyla 0.5/3, 0.5/2, 0.5, 1, 1.5 ve 2 µg pDNA ilave edilmiş ve 37 °C'de 30 dak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, 50 µL albümin çözeltisi eklenerek yatay çalkalayıcıda 30 dakika oda ısısında adsorbisyona bırakılmıştır. Örnekler daha sonrasında jele yüklenerek görüntü alınmıştır (**Şekil 5.5**).



Şekil 5.7. A4D1 ve A4D2 formülasyonun **K4k çekirdeğine** farklı miktarlarda DNA yüklenmesi jel görüntüleri. Kuyularda 50'şer µL formül bulunmaktadır. %1,5'luk agaroz jel, 2 saat 50 volt.

Tablo 5.5. Jele yüklenen A4D1 ve A4D2 formülasyonlarına adsorbe edilen DNA oranları

	1	2	3	4	5	6	A4D1	DNA
A4D1 µL: pDNA µg	50: 0.5/3	50: 0.5/2	50:0.5	50:1	50:1.5	50:2	50	1 µg
	7	8	9	10	11	12	A4D2	DNA
A4D2 µL: pDNA µg	50: 0.5/3	50: 0.5/2	50:0.5	50:1	50:1.5	50:2	50	1 µg

K4-En ve **K4-Ad** çekirdeğinde bulunan DNA miktarının 4 katına kadar **K4k** kısmında pDNA inkübasyonunu gerçekleştirebilmiştir. En yüksek miktarda genetik materyal içeren **A4D1** ve **A4D2** formülasyonlarının 50 µL'sinde çekirdek kısımda 0.5 µg, dış kısımda 2 µg olacak şekilde toplam 2.5 µg DNA miktarı içermektedir.

Bu formülasyonun yüksek oranda pDNA tutması ancak düşük oranlarda toksik özellik göstermesi nedeniyle formülasyondaki DOTAP'ı uzaklaştırılması ile A7 formülasyonun geliştirilmesine gerek duyulmuştur. Bu formülasyonda, kitosan miktarında azalmaya gidilmiş ve kaplama işlemi sadece DSPE-PEG2000 yapılmıştır.

5.8. A7 formülasyonuna siRNA Bağlama ve Jelde Görüntüleme Çalışmaları

pDNA, siRNA molekülünden daha büyük bir moleküldür ve hazırlanan A4 formülasyonunun DNA'ya bağlanma oranının yeterli olduğu yapılan jel elektroforez çalışmaları sonucunda gözlemlendiğinden siRNA'yı da bağlayacak kapasitede olduğu kanatı oluşmuştur. Bu aşamadan sonra, çalışmanın asıl amacı genetik material olarak siRNA'nın kullanılması kısmına geçilmiştir. Ancak, A4 formülasyonunun toksik özellik göstermesi nedeniyle A7 formülasyonu ile çalışmalara devam edilmiştir.

A7 formülasyonu bölüm 4.3.2.'de anlatıldığı gibi 3 farklı aşamada elde edildiğinden (Ç2 ► Ç2k ► Ç2 =A7) , formülün her şaması için araştırmalar yapılmıştır.

Tablo 5.6. Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonlarının partikül boyutu, polidispersite indisi ve zeta potansiyel değerleri (SH:Standart Hata, n=3)

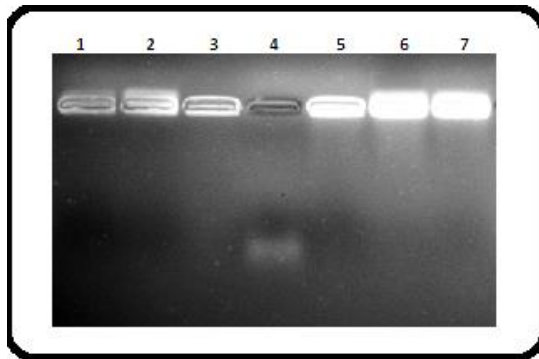
	Ort. Partikül Boyutu (nm) ± SH	PDI ± SH	Zeta Potansiyel (mV) ± SH
Ç2	148.90± 8.98	0.288 ± 0.01	+24.9 ± 0.45
Ç2k	236.7 ± 18.25	0.381 ± 0.08	-19.4 ± 0.98
A7	227.5 ± 13.04	0.359 ± 0.02	-18.3 ± 0.43

A7 formülasyonunun 1 mL'si için 40 µg siRNA kullanılmıştır. Ç2 formülasyonu hazırlandıktan sonra yeteri kadar siRNA eklenmiş ve genetik materyal ile formülasyonun elektrostatik olarak etkileşmesi için 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonrasında bu formülasyon DSPE-PEG2000 ile kaplanmış ve üzerine yeniden Ç2 formülasyonu eklenerek inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

A7 formülasyonunun çekidek kısmını oluşturan Ç2'nin partikül boyutu 148.90± 8.98 olarak tespit edilmiştir. Beklenildiği gibi partikül boyutu en düşüktür. Partiküllerin dağılımı da 0.288 olarak bulunmuş ve oldukça düzgün dağılımlı monodispers bir yapı olarak karşımıza çıkmaktadır. Ç2'nin DSPE-PEG2000 ile kaplanmış hali olan Ç2k'nın

partikül boyutu ve dağılımı 236.7 ± 18.25 ve 0.381 ± 0.08 olarak bulunmuştur. Kaplama işlemi sonrasında Ç2'ye göre partikül boyutu ve dağılımında artma gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin, misel yapıyı oluşturan DSPE-PEG2000'nin vezikül oluşturma sırasında Ç2 partiküllerinin bir kaçını bir araya getirerek yüzeyini kaplamış olduğu düşünülmektedir. Zeta potansiyelinin -19.4 ± 0.98 bulunması, $+24.9 \pm 0.45$ 'den dramatik bir düşüş göstermesi ve ölçüm sırasında tek pik elde edilmesi DSPE-PEG2000'nin Ç2 partiküllerinin tamamen kaplayabildiğini işaret etmektedir. SEM görüntüleri de, homojen dağılan partiküllerin varlığını göstermiş olduğundan DSPE-PEG2000'nin formülasyon içinde ayrı bir partiküler yapıya bürünmediğini işaret etmektedir.

Ç2k'nın yüzeyine Ç2'nin 1:1 oranında adsorbsiyonu ile elde edilen A7 formülasyonunun partikül boyutu ve dağılımı sırasıyla 227.5 ± 13.04 ve 0.359 ± 0.02 bulunmuştur. Bu değerler Ç2'ye göre yüksek ancak Ç2k'ya oranla düşük bulunmuştur. Bu sonuç da, pozitif yüklü Ç2 ile negatif yüklü Ç2k'nın elektrostatik olarak sıkıca bağlandığını işaret etmektedir. Bu bağlama Şekil 5.8.'deki jel görüntüsünde de, Ç2'nin serbest halde jelde yürüyerek ışıma vermemesi ile de kanıtlanmıştır. A7 formülasyonunun negatif zeta potansiyele sahip olması, pozitif yüklü Ç2'nin Ç2k yüzeyinde bulunan PEG uzantıları arasına gömüldüğünü işaret etmektedir. Elde edilen partiküler yapının katmanlarının birbirleri içerisine sıkıca sarıldığı, Ç2'ye yüklenmiş siRNA'nın jel elektroforezi sırasında akıma kapılarak jel içerisinde hareket etmesi ile kanıtlanmıştır.



Şekil 5.8. A7 formülasyonlarına siRNA'nın bağlanma kapasitesi. Kuyularda 0,2 µg siRNA olacak şekilde 5 µL formülasyon konmuştur. %2,5 agaroz jel, 1 saat 50 volt. A7 formülasyonunun 1 mL'sinde 40 µg siRNA vardır.

Tablo 5.7. *Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonları ile Ç2'ye siRNA yüklendikten sonraki formülasyonların Jele yüklemesi.*

1	2	3	4	5	6	7
Ç2	Ç2k	A7	siRNA (0.2 µg)	Ç2-siRNA	Ç2k-siRNA	A7-siRNA

Hazırlanan tüm formülasyonlar 5 µL'sinde 0.2 µg siRNA içerecek şekilde hazırlanmış ve jele yüklenmiştir. Genetik materyal bulundurmeyen formüllerin de kısmen ışıma gösterdiği ama siRNA bulunduran formülasyonların ışımalarının çok daha parlak olduğu görülmektedir.

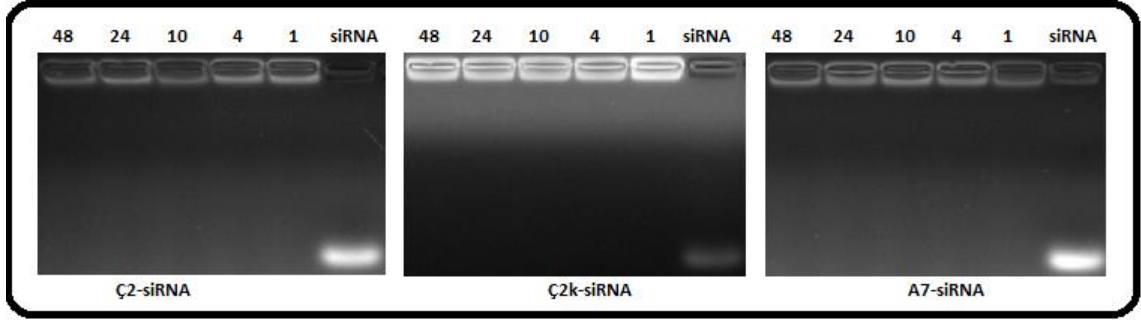
Ayrıca genetik materyal taşıyan formülasyonların, siRNA'yı 1 saatlik elektrik akımına karşı bırakmadığı görülmektedir. Bu, formülasyonun siRNA'yı etkin bir şekilde tutabildiğinin ve kararlı bir yapı oluşturduğunun göstergesidir.

5.8.1. Serum İçinde Kararlılık Çalışması

Transfeksiyon çalışmaları esnasında hücre yoğunluğu ve serumsuz/antibiyotiksiz besiyeri kullanımı dikkat edilmesi gereken durumlardır. Formülasyonların genetik materyal ile inkübasyonunun serumsuz/antibiyotiksiz besiyerinde yapılmasının sebebi serumun genetik materyal ile nanopartikül arasındaki elektrostatik etkileşimi inhibe edebilme ihtimalidir (Şenel, 2012). Bu çalışmada transfeksiyon çalışmasında ana formül olarak seçilen A7 fomülasyonu kullanılacağından serum kararlılığı çalışması siRNA yüklenmiş A7 formülasyonu üzerinde gerçekleştirilmiştir.

A7 formülasyonunun üç aşamasında bulunan partiküler yapılar için jel görüntüleri alınmıştır. Bunun için siRNA yüklenmiş ve **Ç2-siRNA** **Ç2k-siRNA** ve **A7-siRNA** olarak adlandırılmış formülasyonlarının serum varlığında siRNA'yı ne kadar koruduğu belirlenmiştir.

Formülasyonlar, 5 µL'sinde 0.2 µg siRNA içerecek şekilde hazırlanmış ve %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 37 °C'de 1, 4, 10, 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örnekler jele yüklenmiş ve görüntülenmiştir (**Şekil 5.9**).



Şekil 5.9. *Ç2-siRNA, Ç2k-siRNA ve A7-siRNA formülasyonlarının serumla inkübasyonu. %1,5 agaroz jel 1 saat 50 volt.*

Tüm formülasyonlar; genetik materyali belirtilen süreler içerisinde serum varlığından etkilenmeyeceği şekilde koruyabildiğini kuyucuklarda vermiş olduğu belirgin ışınlar sonucunda belirlenmiştir. **Ç2**'ye siRNA'nın adsorbsiyonu söz konusu olmasına rağmen genetik materyalin serum degradasyonundan korunduğu gözlemlenmiştir.

5.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmanın bu kısmında hazırlanan formülasyonların sitotoksitesi MTT (Metitiazol-tetrazolum) yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu yöntem hücre büyümesi veya ölümünü değerlendirerek ilaç duyarlılığını test etmek için kullanılan hücre kültürü çalışmasıdır (Van Meerloo vd., 2011).

Tasarlanan formülasyonların hücreler üzerinde toksik etki göstermemesi önemli bir parametredir. Sitotoksite çalışmasında hedeflenen hücre ölümünün, hücresel apoptozu azaltıcı yönde etki eden STAT3 geninin baskılanması ile gerçekleşmesi istenmektedir. Hücre ölümlerinde beklenen bu etkinin kesin olduğunu söyleyebilmek için taşıyıcı sistemimizin toksik etki göstermemesi belirleyici parametre olarak kabul edilmektedir. Formülasyonlar için belirlenen toksik özellikler, transfeksiyon çalışmalarının yapılması için de belirleyici parametre olmaktadır.

Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, zeta potansiyel, pH değerleri ve jel görüntülerinden elde edilen veriler doğrultusunda **A4** formülasyonu ve **A7** formülünün farklı aşamalarını oluşturan **K4**, **K4k** ve **Ç2**, **Ç2k** formülleri üzerinde sitotoksite çalışmaları yapılmıştır. Uygulanan formülasyonların miktarları çizelgelerde belirtilmiş

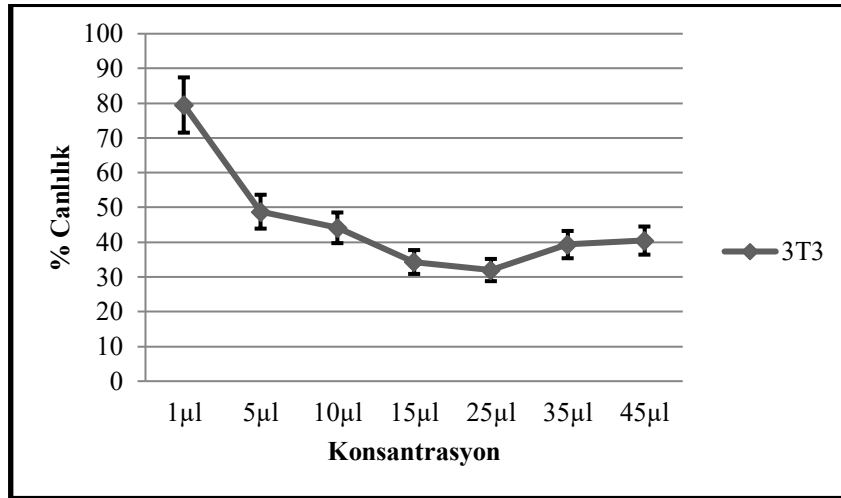
olup, 3T3 sağlıklı fare fibroblast ve A549 insan akciğer kanser hücreleri üzerinde 48 saatlik çalışmalar şeklinde uygulanmıştır.

5.9.1. A4 formülasyonunun sitotoksosite değerleri

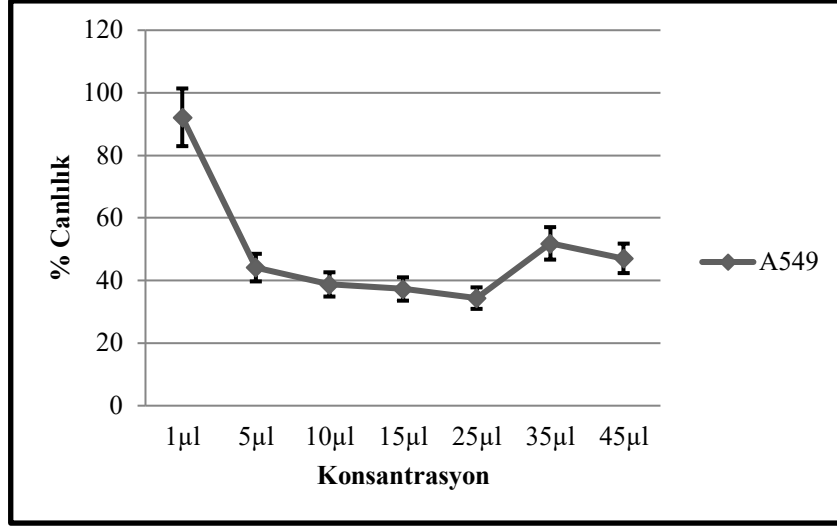
A4 formülasyonu için yapılan sitotoksosite çalışmasında çekirdek formül olan **K4** ve kaplama işlemi yapıldıktan sonra albümin adsorbsiyonu yapılan **A4** formülasyonları çalışılmıştır. **K4** ve **A4** formülasyonlarıyla 48 saatlik muamele edilen 3T3 ve A549 hücrelerin MTT test sonuçları **Şekil 5.10- Şekil 5.15**'da verilmiştir.

Tablo 5.8. Formülasyonlarının sitotoksosite çalışmasında kullanılan miktarları

Formülasyon (μ L)	1	5	10	15	25	35	45
Besiyeri (μ L)	ym 100	ym 100	ym 100	ym 100	ym 100	ym 100	ym 100

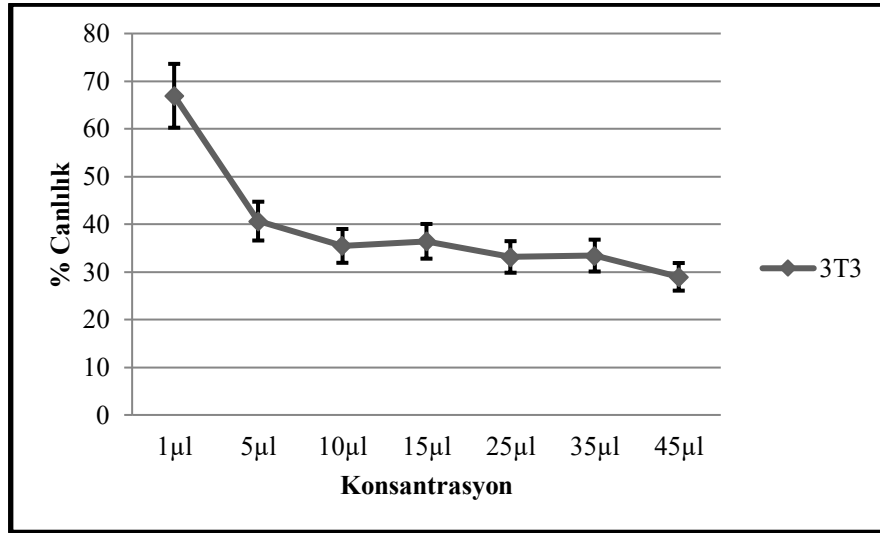


Şekil 5.10. K4 formülasyonunun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 4,80 μ L/kuyu) (n=3)

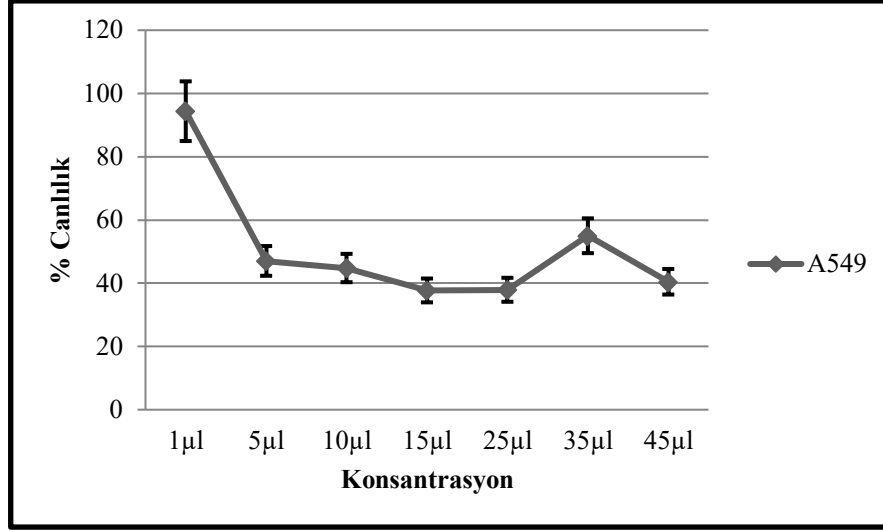


Şekil 5.11. K4 formülasyonunun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 4,55µL/kuyu) ($n=3$)

K4 formülasyonu için IC_{50} değeri 3T3 hücrelerinde 4.80 µL/kuyu ve A549 için 4.55 µL/kuyu olacak şekilde tespit edilmiştir. K4 formülasyonunun 1µL/kuyu konsantrasyonu için 3T3 hücrelerinde %79 ve A549 hücrelerinde %94 hücre canlılığı göstermiştir. Yaklaşık 4.5µL'den itibaren %50 hücre canlılığının altına düşmektedir.

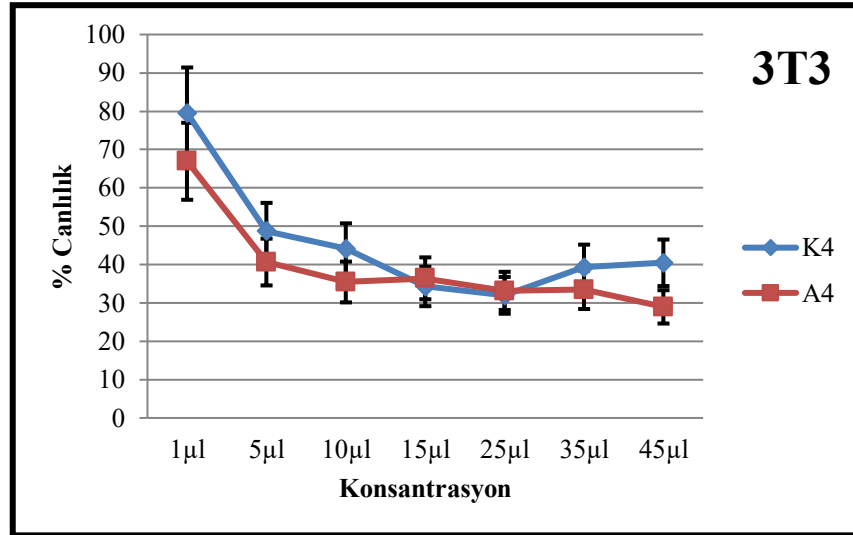


Şekil 5.12. A4 formülasyonu'nun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 4,12µL/kuyu) ($n=3$)

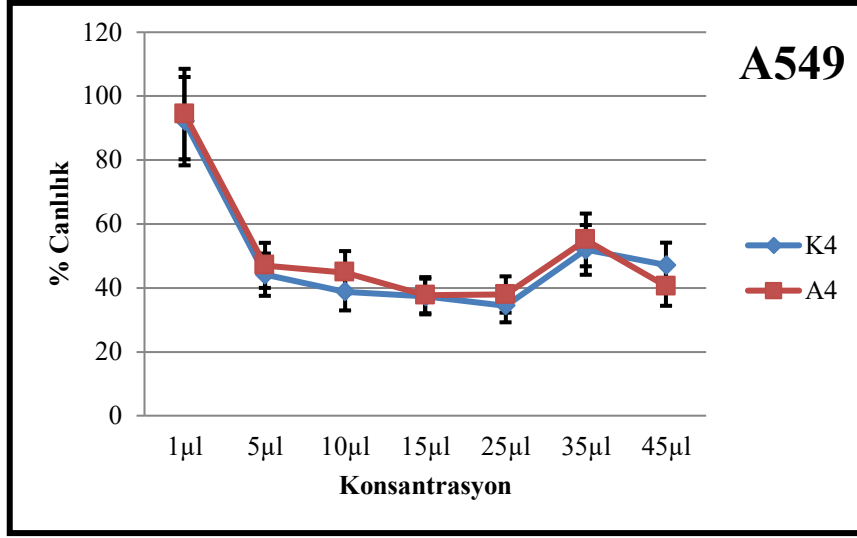


Şekil 5.13. A4 formülasyonu'nun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 4,64µL/kuyu) ($n=3$)

A4 formülasyonu için IC_{50} değeri 3T3 hücrelerinde 4.12 µL/kuyu ve A549 için 4.64 µL/kuyu olacak şekilde tespit edilmiştir. A4 formülasyonunun 1µL/kuyu konsantrasyonu için 3T3 hücrelerinde %95 ve A549 hücrelerinde %116 hücre canlılığı göstermiştir. Yaklaşık 4µL'den itibaren %50 hücre canlılığının altına düşmektedir.



Şekil 5.14. K4 ve A4 formülasyonlarının 3T3 hücrelerindeki hücre canlılığı



Şekil 5.15. K4 ve A4 formülasyonlarının A549 hücrelerindeki hücre canlılığı

K4 ve A4 formülasyonları baz alınarak hem 3T3 hem A549 hücrelerinde yapılan sitotoksosite çalışmalarında, formülasyonlar için 5 µL değerine yaklaşıldığında hücre canlılığı %50'nin altına düşmektedir. Toksik etkinin gözlemlenmesinin sebebinin formülasyon pH'sı olduğu düşünülmektedir. Konsantrasyon arttıkça besiyeri pH'sında düşme gerçekleşecektir.

Partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel değerleri bakımından uygun görülen A4 formülasyonu, sitotoksosite sonuçları doğrultusunda transfeksiyon çalışmaları için uygun görülmemiştir.

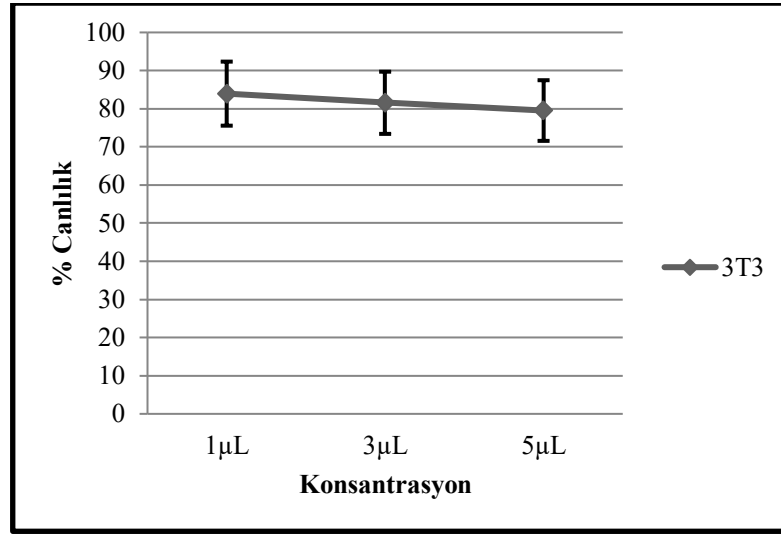
5.9.2. A7 formülasyonunun sitotoksosite değerleri

A7 formülasyonu için yapılan sitotoksosite çalışmasında çekirdek formül olan Ç2, DSPE-PEG2000 ile kaplanmış formül Ç2k ve Ç2k'ya Ç2'nin adsorbsiyonu ile elde edilen A7 formülasyonları çalışılmıştır.

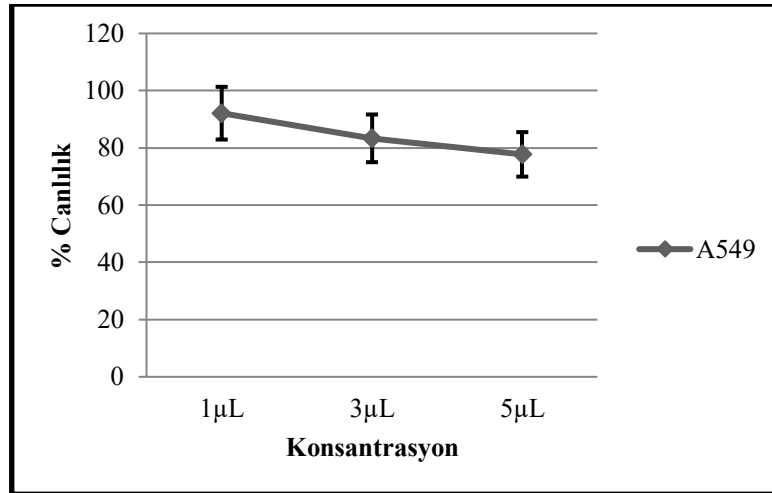
Tablo 5.9. Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonlarının sitotoksosite çalışmasında kullanılan miktarları

Formülasyon (µL)	1	3	5
Besiyeri (µL)	ym 100	ym 100	ym 100

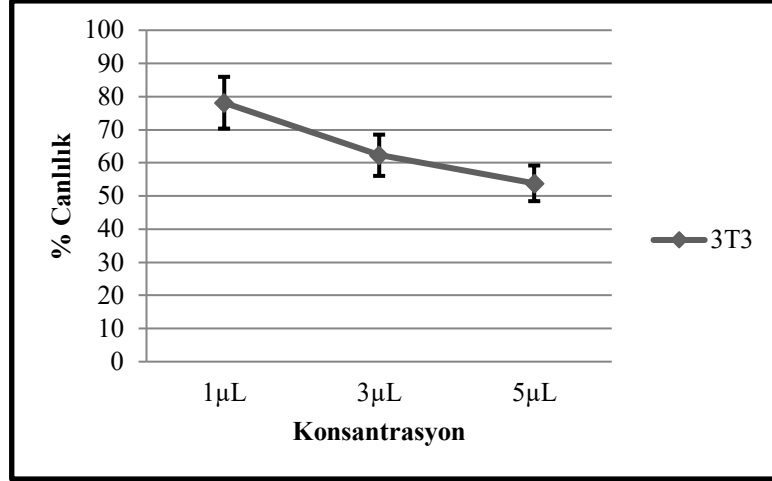
A4 formülasyonunda gözlemlenen yüksek toksik değerler sonucunda A7 formülasyonu için ilk etapta düşük konsantrasyonlar için çalışma yapılmıştır. Yapılan siştotoksisite sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda A7 formülasyonu için daha iyi sonuçlar alınmasına karşın konsantrasyonlarda yükselmeye gidilmemiştir. Ç2, Ç2k ve A7 Formülasyonları ile 48 saat muamele edilmiş 3T3 ve A549 hücrelerinin MTT test sonuçları Şekil 5.16-Şekil 5.21’de verilmiştir.



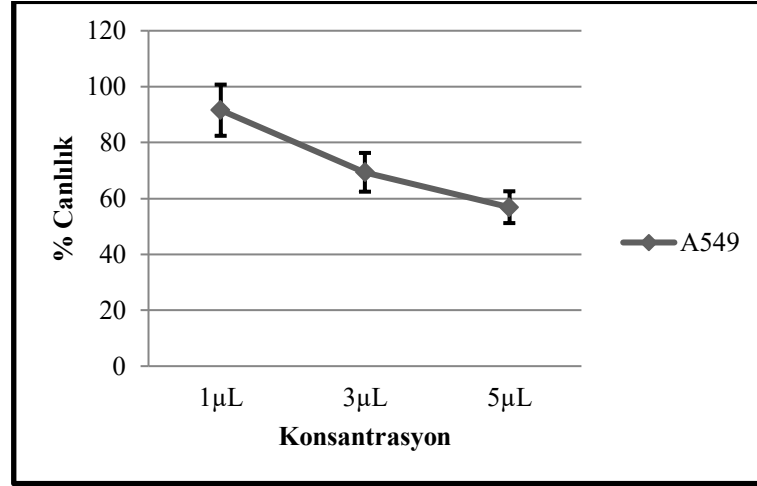
Şekil 5.16. Ç2 formülasyonu’nun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 5+µL/kuyu) (n=3)



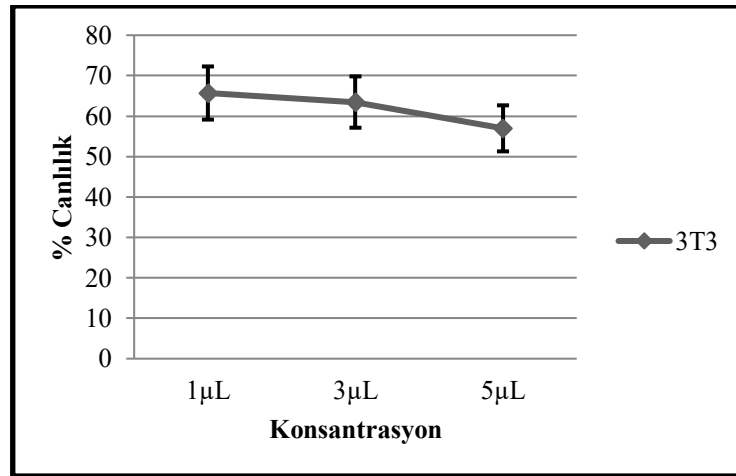
Şekil 5.17. Ç2 formülasyonu’nun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 5+µL/kuyu) (n=3)



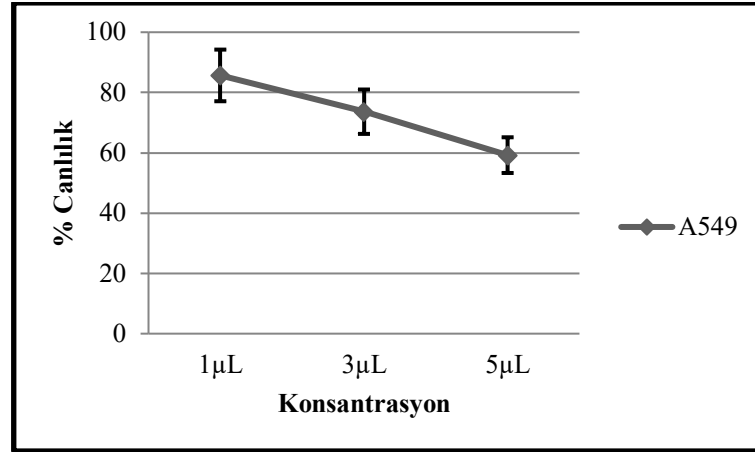
Şekil 5.18. Ç2k formülasyonu'nun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 5+µL/kuyu) (n=3)



Şekil 5.19. Ç2k formülasyonu'nun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 5+µL/kuyu) (n=3)



Şekil 5.20. A7 formülasyonu'nun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 5+µL/kuyu) (n=3)



Şekil 5.21. A7 formülasyonu'nun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : $5 \mu\text{L}/\text{kuyu}$) ($n=3$)

Ç2, Ç2k ve A7 formüllerinin sitotoksite sonuçlarından elde edilen verilere göre tüm formüller hem 3T3 hem A549 hücrelerinde $5 \mu\text{L}$ 'de bile A4 formülasyonlarına göre daha az toksik etki göstermektedir. Hücre canlılıkları 3 formülasyonun 3 konsantrasyonu için de %50'nin üzerinde sonuç vermiştir.

A7 formülasyonlarının analizi yapılan konsantrasyonlarda yüksek bir toksik etki göstermemesi nedeniyle siRNA yüklemesi yapıp genetik materyalin hücre canlılığı üzerindeki etkisi analiz edilmek için etkin maddeli formüllerin sitotoksite çalışmaları yapılmıştır.

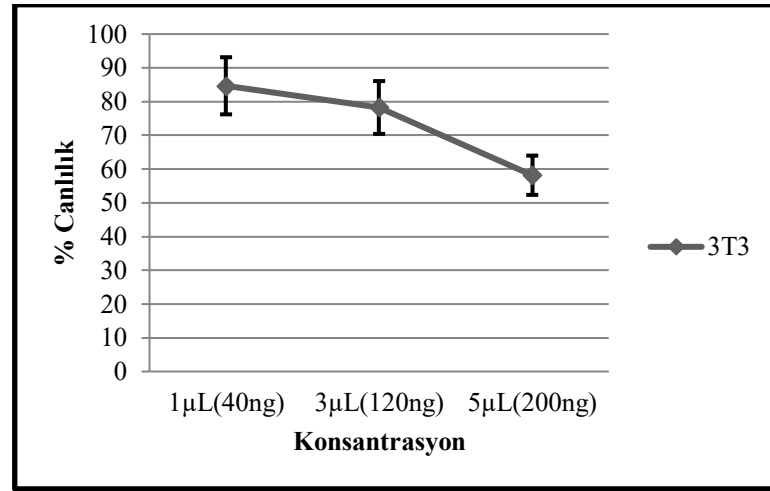
5.9.3. A7 formülasyonunun siRNA'lı sitotoksite değerleri

Ç2, Ç2k ve A7 formülasyonlarının toksik etkilerinin az olması nedeniyle bu formüllere siRNA yüklemesi yapıp elde edilen Ç2-siRNA, Ç2k-siRNA ve A7-siRNA formüllerinin sitotoksitesileri incelenmiştir. Burada amaç, taşınan siRNA'nın hücre canlılığına etkisinin belirlenmesidir.

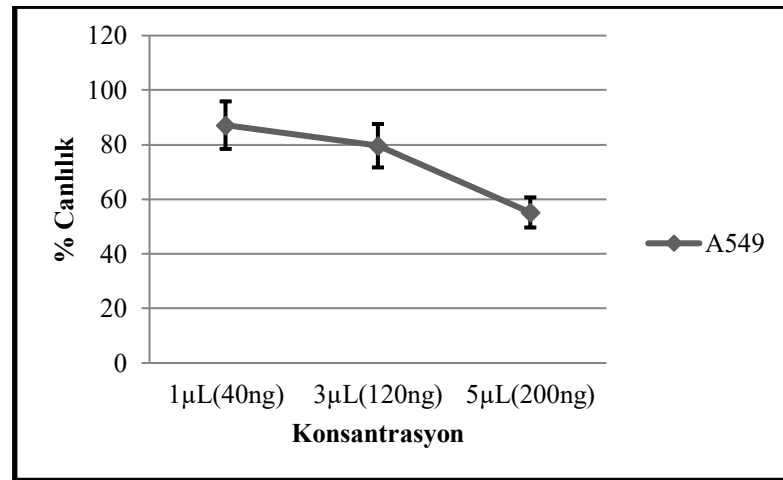
Tablo 5.10. Ç2-siRNA, Ç2k-siRNA ve A7-siRNA formülasyonlarının ve kuyu başına uygulanan siRNA'nın sitotoksite çalışmasında kullanılan miktarları.

Formülasyon (μL)	1	3	5
siRNA (μg)	0.04	0.12	0.2
Besiyeri (μL)	ym 100	ym 100	ym 100

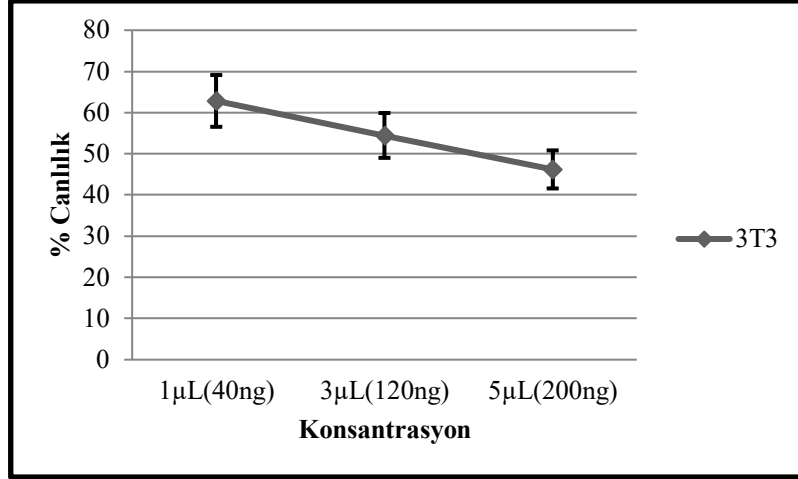
A7 formülasyonu için yapılan sitotoksosite çalışmasının ardından toksik etkinin az gözlemlenmesi sonucu genetik materyal yüklenmesi 5 μL 'de 200 nanogram (40 $\mu\text{g/mL}$) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu oran jel çalışmalarında formülasyonun genetik materyali tutabildiği bir oran olarak gösterilmiştir. A7 formülasyonuna genetik materyal yüklenmiş şekilde sitotoksosite çalışması yapılırken diğer yandan formülasyona ilave edilmemiş çıplak siRNA için de sitotoksosite uygulaması yapılmıştır. 3T3 ve A549 hücrelerinin çıplak siRNA ile 48 saatlik muamelelerinin MTT test sonuçları **Şekil 5.22** ve **Şekil 5.23**'de verilmiştir. **Ç2-siRNA**, **Ç2k-siRNA** ve **A7-siRNA** formüllerinin 48 saatlik MTT test sonuçları ise **Şekil 5.25-Şekil 5.29**'da verilmiştir.



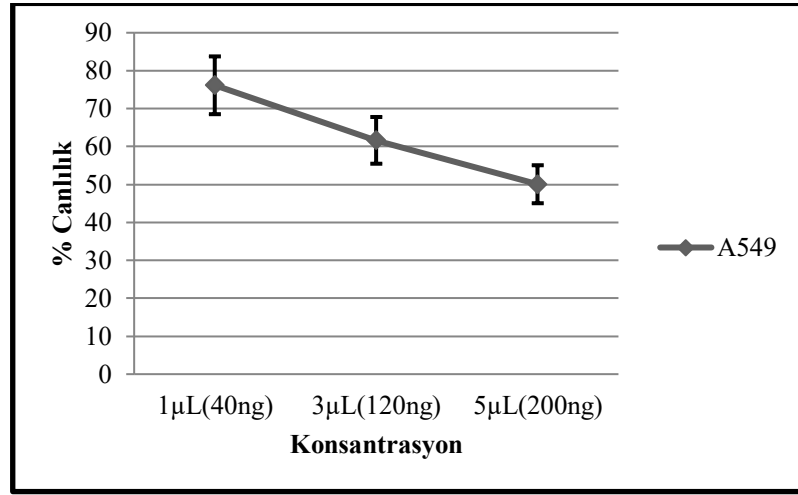
Şekil 5.22. Çıplak siRNA'nın 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesisi (IC_{50} : 200+ng/kuyu) ($n=3$)



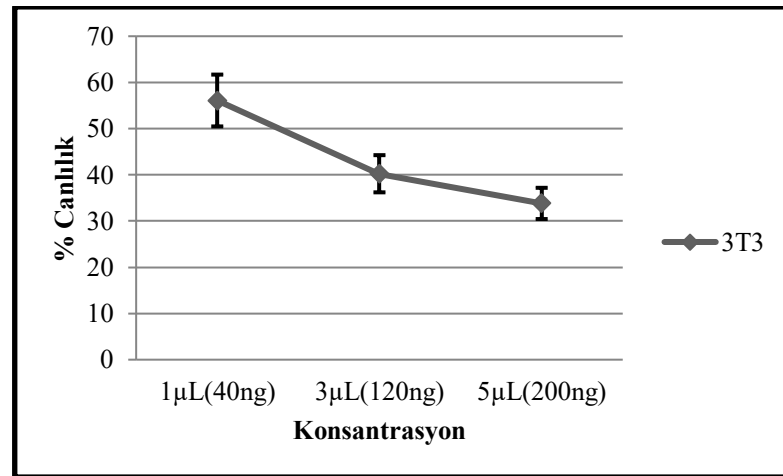
Şekil 5.23. Çıplak siRNA'nın A549 hücrelerindeki sitotoksitesisi (IC_{50} : 200+ng/kuyu) ($n=3$)



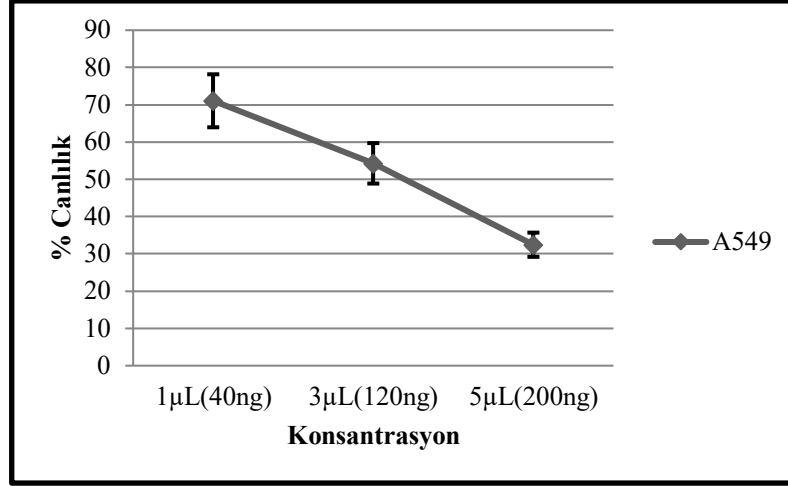
Şekil 5.24. Ç2-siRNA formülasyonunun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 3.87 µL/kuyu) (n=3)



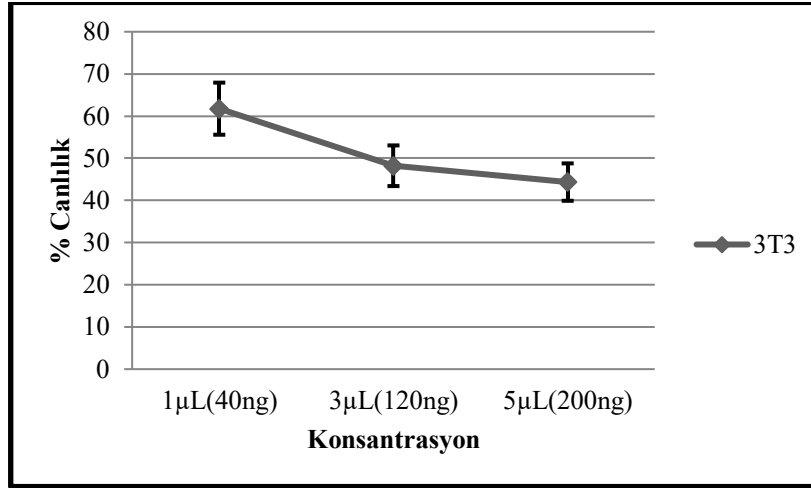
Şekil 5.25. Ç2-siRNA formülasyonunun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 5 µL/kuyu) (n=3)



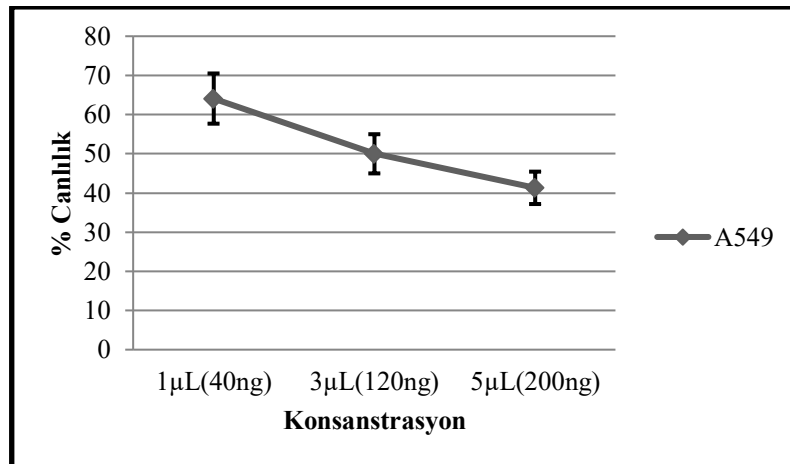
Şekil 5.26. Ç2k-siRNA formülasyonunun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 1.79 µL/kuyu) (n=3)



Şekil 5.27. Ç2k-siRNA formülasyonunun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 3.22µL/kuyu) ($n=3$)



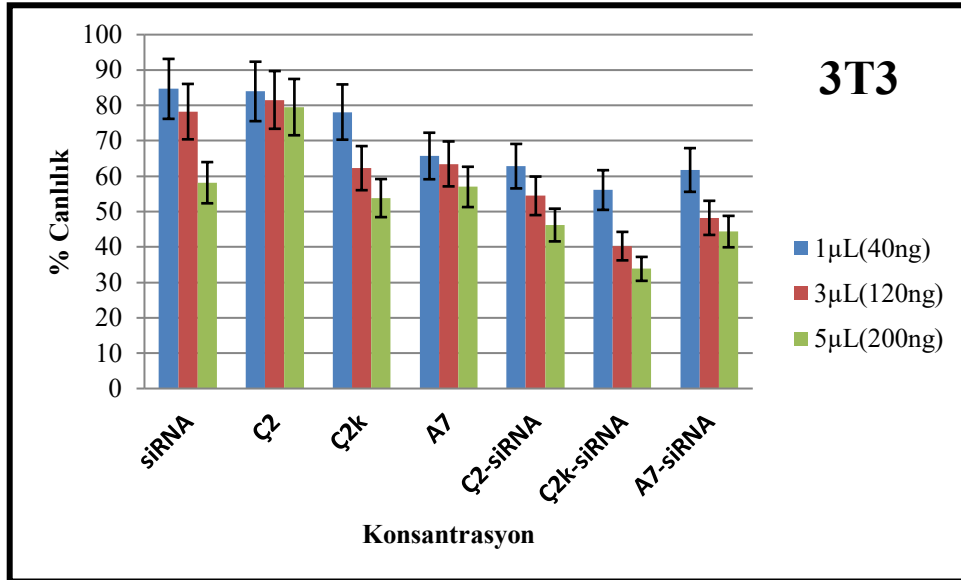
Şekil 5.28. A7-siRNA formülasyonunun 3T3 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 2.90µL/kuyu) ($n=3$)



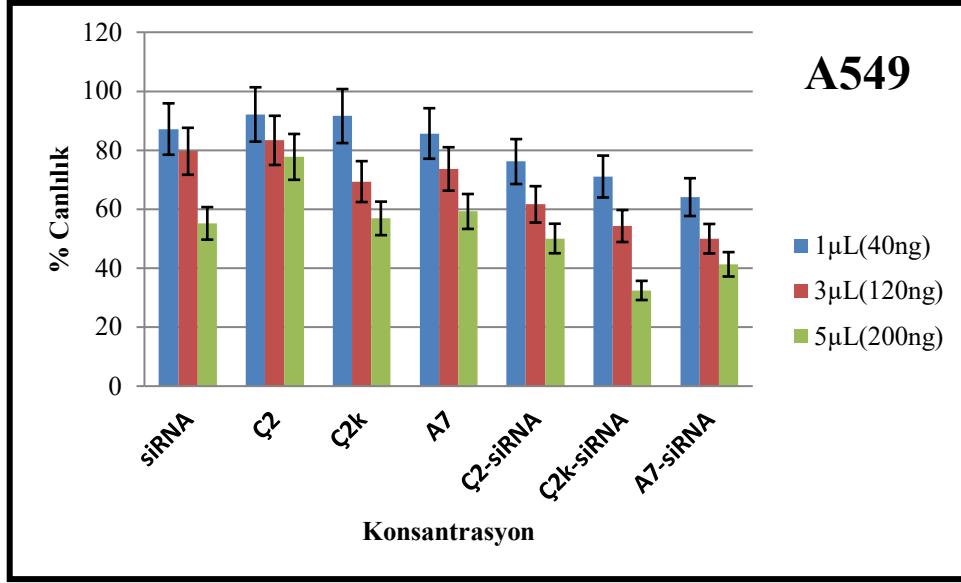
Şekil 5.29. A7-siRNA formülasyonunun A549 hücrelerindeki sitotoksitesi (IC_{50} : 2.96µL/kuyu) ($n=3$)

Çıplak siRNA için yapılan sitotoksosite çalışmasında genetik materyalin tek başına etkin bir toksisite oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin hücrelere giriş yapamaması olarak düşünülmektedir. Bu kısımla ilgili veriler transfeksiyon çalışmaları kısmında gösterilmiştir.

siRNA yüklü **A7-siRNA** formüllerinin, formüllerine **A7** göre toksik etkiyi daha fazla gösterdiği ve 5 µL'nin altında farklı konsantrasyonlarda IC₅₀ değerine ulaşıldığı tespit edilmiştir. Bu miktarlar 3T3 hücrelerinde **Ç2-siRNA** için; 3.87 µL/kuyu, **Ç2k-siRNA** için; 1.79 µL/kuyu, **A7-siRNA** için; 2.90 µL/kuyu; A549 hücrelerinde **Ç2-siRNA** için 5µL/kuyu, **Ç2k-siRNA** için 3.22µL/kuyu ve **A7-siRNA** için 2.96 µL/kuyu olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5.30. **Çıplak siRNA** ve **A7** formülasyonlarının 3T3 hücrelerindeki sitotoksosite değerleri (n=3)



Şekil 5.31. Çıplak siRNA ve A7 formülasyonlarının A549 hücrelerindeki sitotoksikite değerleri (n=3)

Yapılan MTT testi sonuçlarına göre A7 formülasyonunun genetik materyal yüklenmesi sonrasında gösterdiği toksik etkinin arttığı gözlemlenmiştir. Sadece siRNA'nın toksik etkisinin, siRNA yüklü formülasyonlara göre daha az olmasıyla birlikte formülasyonların genetik materyalin hücrelere ulaşmasında katkısı olduğu tahmin edilmektedir. Sonuçların doğruluğunu sağlamak için formülasyonlara transfeksiyon çalışması yapılarak devam edilmiştir.

5.9.4. A7 formülasyonlarının hücrelere transfeksiyonu

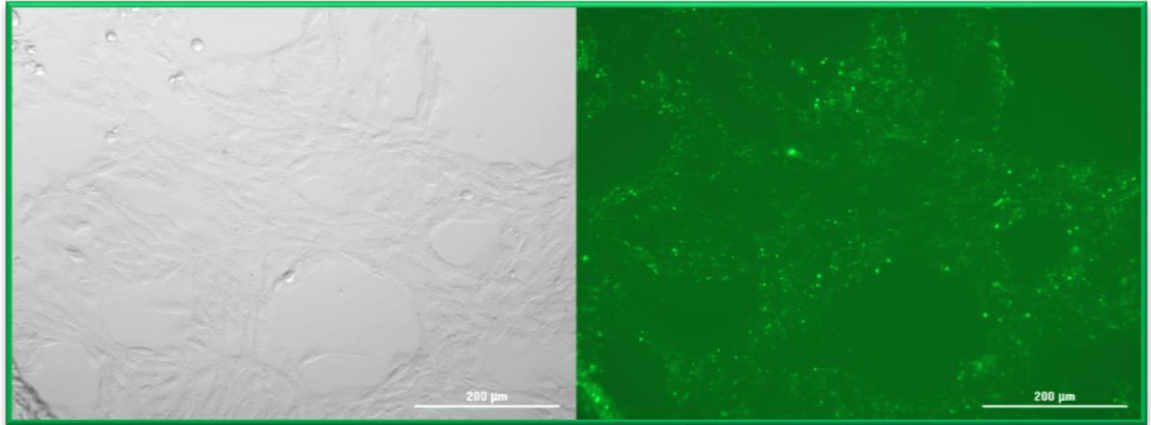
Lipit bazlı transfeksiyon ajanlarının transfeksiyon verimliliği; hücre alım, endozomal kaçış gibi birçok biyolojik engel tarafından sınırlandırıldığı kabul edilmektedir. Bu sebepten 1993 yılında piyasaya çıkmış olan Lipofectamine ajanları, bu güne kadar 50.000'den fazla referans ile birlikte en çok kullanılan transfeksiyon ajanı olmuştur. Transfeksiyon yapılması zor hücreler de dahil olmak üzere birçok hücre tipinde hem DNA hem siRNA/miRNA için yüksek transfeksiyon etkinliği göstererek transfeksiyon ajanları içerisinde "altın standart" olarak kabul edilir ve kullanılırlar (Cardelli vd., 2016).

Bu çalışmada Lipofectamine® 2000 kontrol olarak kullanılmış ve hazırlanan formülasyonlar ile karşılaştırılıp, formülasyonların verimliliği değerlendirilmiştir.

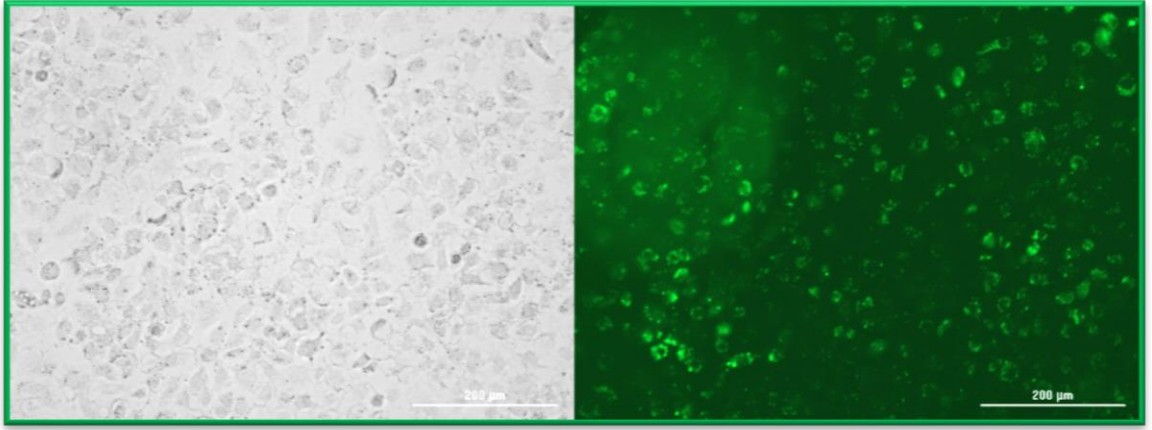
Transfeksiyon için hücrenin kuyudaki yoğunluğu oldukça önemlidir. Düşük yoğunluktaki ortamda transfeksiyon verimliliği daha yüksel olduğu için çalışmalarda %50-70 yoğunlukta hücre miktarı olacak şekilde ekim yapılmıştır (Yang ve Huang, 1997).

Transfeksiyon çalışmaları 48 saatlik olacak şekilde 3T3 ve A549 hücrelerinde 10X büyütmeyle incelenmiştir. Transfeksiyonun görüntülenebilmesi için bu çalışmada formülasyonlara STAT3 siRNA'sı yerine FITC konjugeli siRNA yüklenmiştir. Formülasyonlar uygulandıktan 48 saat sonrasında hücrelerin görüntüleri normal ışık altında ve yeşil floresan ışık altında alınmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen veriler Lipofectamine® 2000 için **Şekil 5.32** ve **Şekil 5.33**'da, **Ç2-siRNA** için **Şekil 5.34** ve **Şekil 5.35**'da, **Ç2k-siRNA** için **Şekil 5.36** ve **Şekil 5.37**'te, **A7-siRNA** için **Şekil 5.38** ve **Şekil 5.39**'de gösterilmiştir.

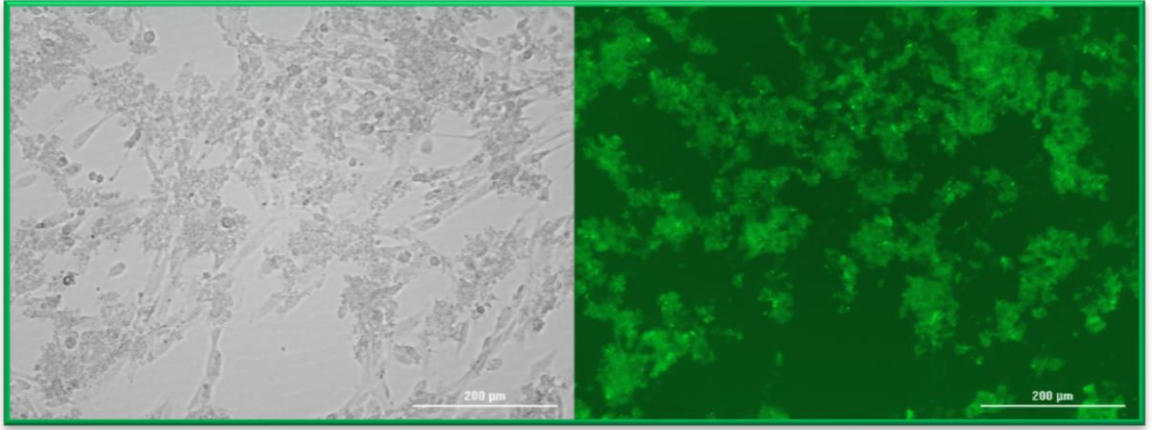
Lipofectamine® 2000 ve **A7** formülasyonlarının hücrelere uygulanmış halinin yanında ayrıca **çıplak** FITC konjugeli siRNA'nın besiyeri içerisinde 3T3 ve A549 hücreleri üzerine uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çıplak siRNA ile yapılan çalışmalar **Şekil 5.40**, **Şekil 5.41**'de gösterilmiştir.



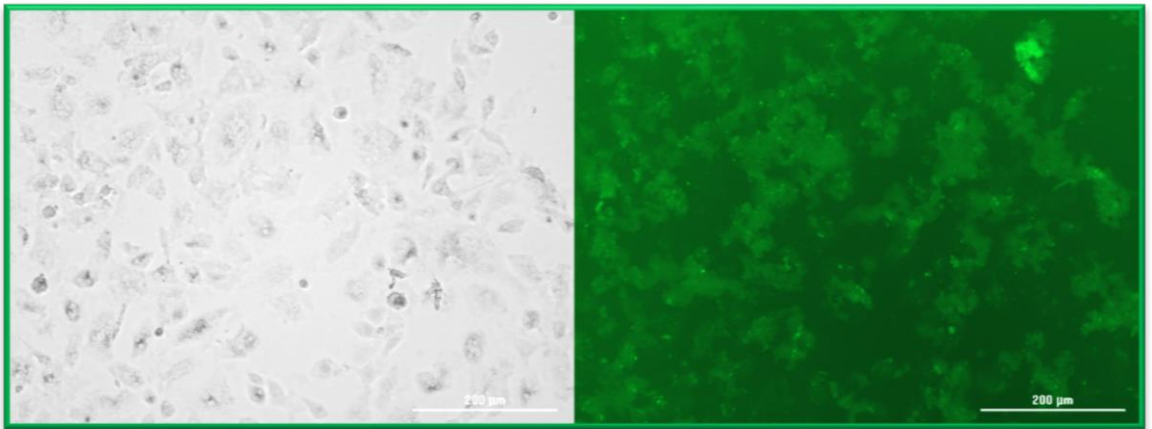
Şekil 5.32. 3T3 hücrelerinde Lipofectamine® 2000'in transfeksiyon görüntüsü



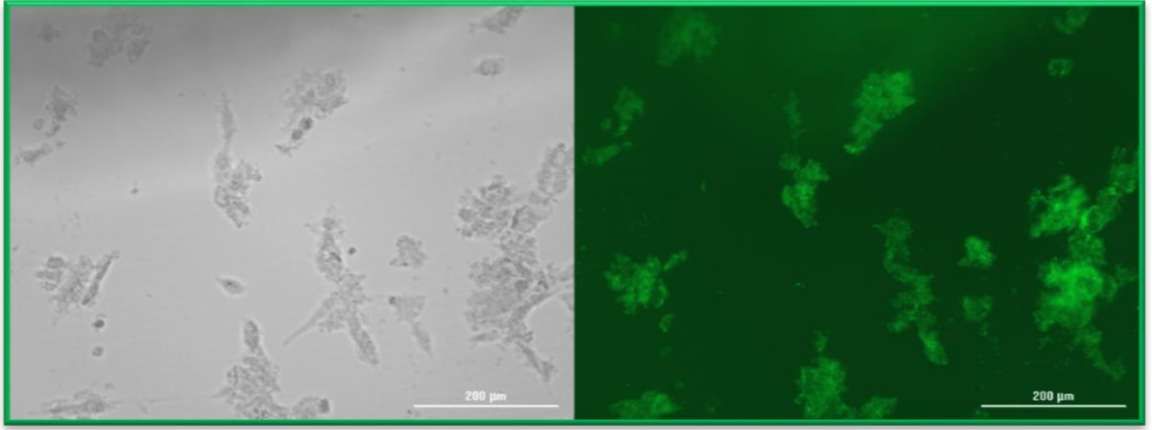
Şekil 5.33. A549 hücrelerinde Lipofectamine® 2000'in transfeksiyon görüntüsü



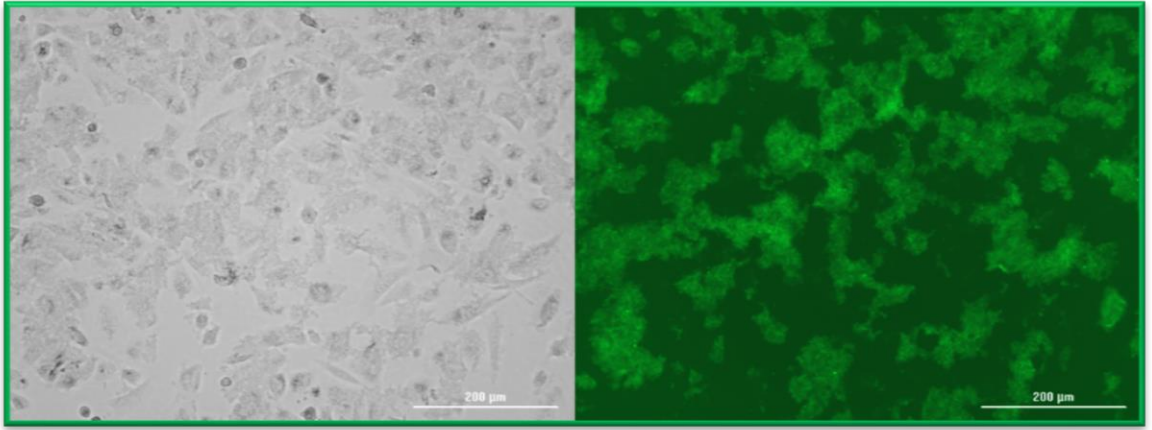
Şekil 5.34. 3T3 hücrelerinde Ç2-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü



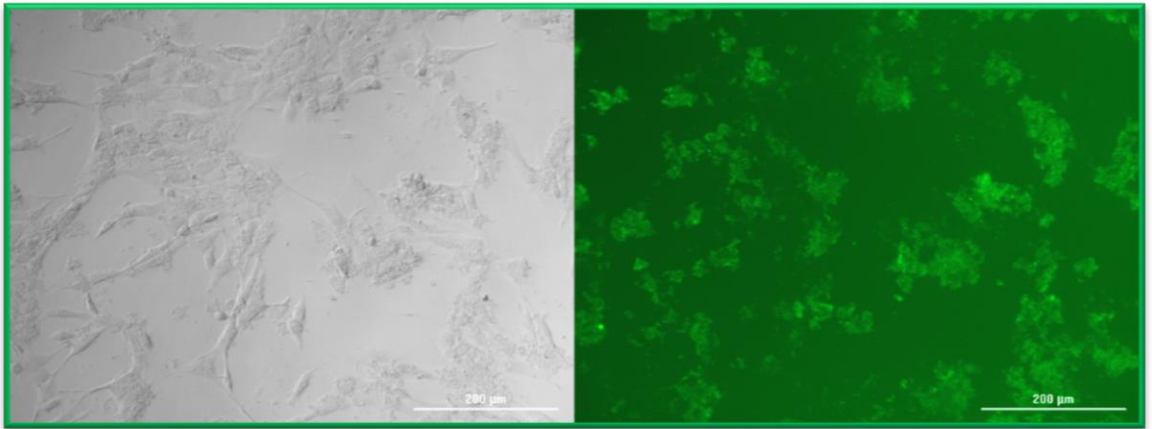
Şekil 5.35. A549 hücrelerinde Ç2-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü



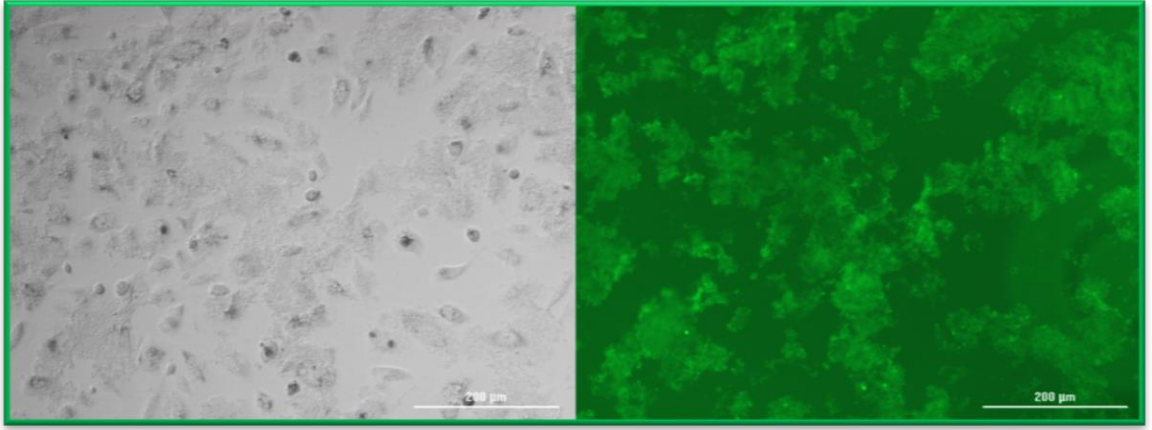
Şekil 5.36. 3T3 hücrelerinde Ç2k-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü



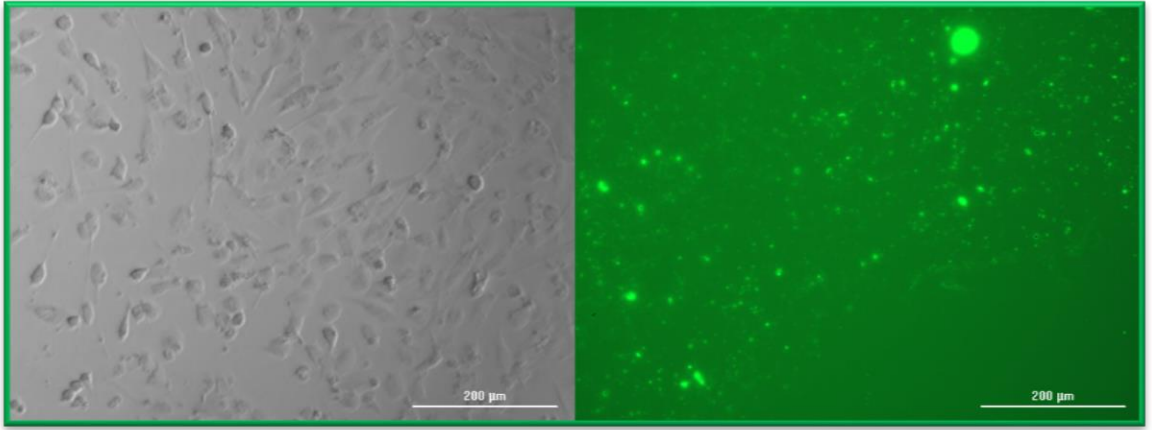
Şekil 5.37. A549 hücrelerinde Ç2k-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü



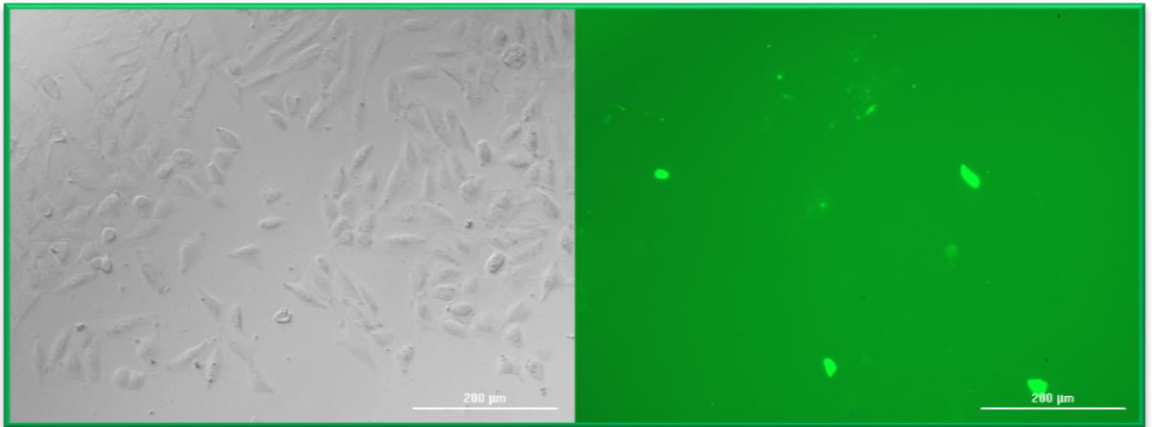
Şekil 5.38. 3T3 hücrelerinde A7-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü



Şekil 5.39. A549 hücrelerinde A7-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü



Şekil 5.40. 3T3 hücrelerinde çıplak FITC-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü



Şekil 5.41. A549 hücrelerinde çıplak FITC-siRNA'nın transfeksiyon görüntüsü

Yapılan transfeksiyon çalışmalarına bakıldığında; Lipofectamine® 2000 ile yapılan transfeksiyon işlemleri hücrelerin anatomik yapısını gösterecek şekilde daha iyi görüntüler elde edilirken, formülasyonların hücrelerin şeklini göstermediğini ama hücrelerin bulunduğu bölgelerde yoğunlaştığı görülmektedir. Bu durumun hücre yüzeyinde ve çevresinde hücreler tarafından salgılanan SPARC proteininin albümine bağlanması sonucu formülasyonların hücre yüzeyine toplanması olarak tanımlanmıştır.

Bu sonuç formüllerin hücelere yaklaşabildiğine işaret etmektedir ve transfeksiyon için 48 saat'den fazla çalışma yapılması gerektiğine işaret etmektedir.

Çıplak uygulanan FITC-siRNA'nın hücreler tarafından alınmasının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (**şekil 5.40-5.41**).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında DNA ve siRNA yüklü albümin nanopartikül taşıyıcı sistemleri tasarlanmış ve adsorbsiyon/enkapsülasyon, sitotoksosite ve transfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir. Albümin nanopartiküllerinin genetik materyal taşıyabilecek özellikte hazırlanabilmesi için farklı katyonik ajanlar kullanılarak formülasyonlar denenmiştir. Formülasyon hazırlama sırasında ki her bir aşamada öncelikle, partikül boyutu ve yüzey yükü değerlendirilmesi yapılmış ve en uygun formülasyonlar olarak **A4** ve **A7** formülasyonları seçilmiştir.

Desolvasyon ve film kaplama yöntemlerinden faydalanarak hazırlanan formülasyonlarda ortalama partikül boyutu 200 ile 400 nm aralığında olup tüm formülasyonlar için partikül boyutları mikronaltı boyutta elde edilmiştir. Sitotoksosite aşamasına geçebilmiş olan **A4** formülasyonunun partikül boyutu 200 nm iken **A7** formülasyonunun partikül boyutu 230 nm olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar formülasyonların inhaler uygulama için uygun partikül boyutlara sahip olduğunu göstermektedir.

Yüzey yüklerinde değerlendirildiğinde, genetik materyalin bağlanması için pozitif özellik kazandırılmış formülasyonlar ve bunların DSPE-PEG2000 ile kaplanmasıyla negatif yüzey yüke sahip formülasyonlar elde edilmiştir. **A4** formülasyonu için +35 mV zeta potansiyel değeri bulunmasına rağmen **A7** formülasyonu -18 mV zeta potansiyele sahip özellik göstermiştir. Katyonik özellikteki partiküllerin hücre yüzeyine tutunmaları nedeniyle taşıdığı genetik materyalin hücreye aktarımının daha yüksek olanlarda olduğu bilinmektedir. Ancak, tekrarlanan lokal pulmoner uygulama için katyonik nanopartiküllerin çoğunlukla beyaz kan hücreleri üzerindeki geçici bir sistemik toksisite ile yan etkilere neden olduğu bilindiğinden, (Beck-Broichsitter vd., 2011), **A7** formülasyonunun yüzey yükünün negatif olması nedeniyle inhaler uygulamasının akciğer kanserinin tedavisi için uygun olabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Her iki formülasyona da genetik materyal formülasyon çekirdek aşamasındayken adsorbe edilmiş ve kaplama işlemi yapılarak enkapsüle forma geçmiştir. **A4** formülasyonunda kaplama işlemi sonrasında tekrar genetik materyal adsorbe edilebilme imkanı olmuştur, **A7** formülasyonu için sadece enkapsüle etme imkanı sağlanmıştır.

Formülasyonlarda transfeksiyon çalışmasına geçmeden önce sitotoksosite çalışması yapılmış olup uygun konsantrasyonlar belirlenmeye çalışılmış olup, **A4** formülasyonu için 5 µL ve üstü toksisite göstermiştir.

A7 formülasyonu için 3 farklı aşamada yapılan sitotoksosite çalışmalarında hücre canlılığının yeterli seviyede olması ve genetik materyal yüklenmiş halinin ise IC₅₀ değerinin altına düşmesi ve transfeksiyon çalışmalarında gözlemlenen veriler doğrultusunda, **A7** formülasyonu siRNA taşınmasında kullanılabilecek potansiyel bir taşıyıcı sistem olarak geliştirilebileceği düşünülmektedir. Transfeksiyon çalışmaları sonucunda, partiküllerin genetik materyali hücre yüzeyine toplanmak suretiyle ulaştırdığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, STAT3 siRNA'nın albümin taşıyıcı sistemle taşınabilirliği, hücrelere ulaştırılabilirliği ve hücreler üzerinde etkinliği bu çalışma ile gösterilmiştir. Hazırlanan formülasyonların in vivo koşullarda göstereceği etkinliğin belirlenmesi için gelecekte bu sistemlerin hayvan deneylerinde kullanılması uygun niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Aigner A. (2006). Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of Biotechnology*, 124 (1):12-25.
- Albertine, K. H. (2016). V. C. Broaddus, R. J. Mason, J. D. Ernst, S. C. Lazarus, J. F. Murray, J. A. Nadel, A. S. Slutsky, M. B. Gotway, (Editörler). Anatomy of the Lungs. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)*, 1, 3-21.e5
- Andrade, F., Rafael, D., Videira, M., Ferreira, D., Sosnik, A., & Sarmiento, B. (2013). Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14), 1816-1827.
- Attama, A., A. (2011). SLN, NLC, LDC: State of the art in drug and active delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 5(3), 178-187.
- Balazs, D. A., & Godbey, W. T. (2011). Liposomes for use in gene delivery. *Journal of Drug Delivery*, 2011.
- Beck-Broichsitter, M., Ruppert, C., Schmehl, T., Guenther, A., Betz, T., Bakowsky, U., Seeger, W., Kissel, T., Gessler, T. (2011). Biophysical investigation of pulmonary surfactant surface properties upon contact with polymeric nanoparticles in vitro. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(3), 341-350.
- Bhushan, B., Khanadeev, V., Khlebtsov, B., Khlebtsov, N., & Gopinath, P. (2017). Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Advances in Colloid and Interface Science*, 246, 13-39.
- Bivas-Benita, M., Romeijn, S., Junginger, H. E., & Borchard, G. (2004). PLGA–PEI nanoparticles for gene delivery to pulmonary epithelium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(1), 1-6.
- Bodak, M., Cirera-Salinas, D., Luitz, J., & Ciaudo, C. (2017). The role of RNA interference in stem cell biology: Beyond the mutant phenotypes. *Journal of Molecular Biology*, 429(10), 1532-1543.
- Booker, R. (2005). Do patients think that dry powder inhalers can be used interchangeably?. *International Journal of Clinical Practice*, 59, 30-32.

- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7297-7301.
- Boye, J. I., Alli, I., & Ismail, A. A. (1996). Interactions involved in the gelation of bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 996-1004.
- Büyükköroğlu, G. (2005). Farmasötik Biyoteknolojide Gen Tedavisi Amaçlı Plazmit DNA Bağlanabilecek Katyonik Katı Lipit Nano Ve Mikropartiküllerin Hazırlanması Ve Tanınması Çalışmaları, Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E., & Yazan, Y. (2016). Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 109, 174-183.
- Cardarelli, F., Digiacomo, L., Marchini, C., Amici, A., Salomone, F., Fiume, G., ... & Caracciolo, G. (2016). The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Scientific Reports*, 6, 25879.
- Carrillo, C., Sánchez-Hernández, N., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Suñé-Negre, J. M., Ticó, J. R., ... & Miñarro, M. (2013). DNA delivery via cationic solid lipid nanoparticles (SLNs). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 157-165.
- Carter, M., Shieh, J. (2015). Cell Culture Techniques. *Guide to research techniques in neuroscience (Second Edition)*. 295-310
- Cryan, S. A., Sivadas, N., & Garcia-Contreras, L. (2007). In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(11), 1133-1151.
- Çalış, S., Pehlivan S. (2014). A. Z. Gürsoy (Editör). Dendrimerler. *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*. 41-49.

- Dal-Maso, A. D., Dellacasagrande, J., Legendre, F., Tiraby, G., Blonski, C., & Hoffmann, P. (2008). Synthesis and evaluation of new phosphonolipid compounds for gene delivery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(8), 1758-1766.
- Das, J., Das, S., Paul, A., Samadder, A., Bhattacharyya, S. S., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2014). Assessment of drug delivery and anticancer potentials of nanoparticles-loaded siRNA targeting STAT3 in lung cancer, in vitro and in vivo. *Toxicology Letters*, 225(3), 454-466.
- David, S., Pitard, B., Benoît, J. P., & Passirani, C. (2010). Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. *Pharmacological Research*, 62(2), 100-114.
- Dolatabadi, J. E. N., Valizadeh, H., & Hamishehkar, H. (2015). Solid lipid nanoparticles as efficient drug and gene delivery systems: recent breakthroughs. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(2), 151.
- Durzyńska, J., Przysiecka, Ł., Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Warowicka, A., Musidlak, O. & Goździcka-Józefiak, A. (2015). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354(1), 32-42.
- Dutta, J., Tripathi, S., & Dutta, P. K. (2012). Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*, 18(1), 3-34.
- Dutta, P., Sabri, N., Li, J., & Li, W. X. (2014). Role of STAT3 in lung cancer. *Jak-Stat*, 3(4).
- El-Sherbiny, I. M., El-Baz, N. M., & Yacoub, M. H. (2015). Inhaled nano-and microparticles for drug delivery. *Global Cardiology Science and Practice*, 2015(1), 2.
- Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 168-182.
- Farrell, R. E. (2017). RNA Methodologies (Fifth Edition) Laboratory Guide for Isolation and Characterization. *RNA Interference and RNA Editing*, 11, 345-376.

- Felice, B., Prabhakaran, M. P., Rodriguez, A. P., & Ramakrishna, S. (2014). Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science and Engineering: C*, 41, 178-195.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806.
- Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsässer, H. P., & Kissel, T. (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*, 16(8), 1273-1279.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24(7), 1121-1131.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Godbey, W. T., Wu, K. K., & Mikos, A. G. (1999). Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly (ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, 45(3), 268-275.
- Gopinath, P., Kumar, S. U., Matai, I., Bhushan, B., Malwal, D., Sachdev, A., Dubey, P. (2015). T. S. Subramanian, K. Narayanan, P. Parasuraman, P. Ramasamy (Editörler). Solid Lipid Nanoparticles (SLN). *Cancer Nanotheranostics*, 65-93.
- Green, M. R., Manikhas, G. M., Orlov, S., Afanasyev, B., Makhson, A. M., Bhar, P., & Hawkins, M. J. (2006). Abraxane®, a novel Cremophor®-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 17(8), 1263-1268.
- Groneberg, D. A., Witt, C., Wagner, U., Chung, K. F., & Fischer, A. (2003). Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respiratory Medicine*, 97(4), 382-387.

- Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2017). Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. in *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* 67-108. Elsevier.
- Guo, X., & Huang, L. (2011). Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. *Accounts of Chemical Research*, 45(7), 971-979.
- Gupta, S., Singh, R. P., Rabadia, N., Patel, G., & Panchal, H. (2011). Antisense technology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 9(2), 38-45.
- Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50.
- Herbst, R. S., Heymach, J. V., & Lippman, S. M. (2008). Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(13), 1367–1380.
- Heyder, J., Gebhart, J., Rudolf, G., Schiller, C. F., & Stahlhofen, W. (1986). Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0.005–15 μm . *Journal of Aerosol Science*, 17(5), 811-825.
- Hirose, M., Tachibana, A., & Tanabe, T. (2010). Recombinant human serum albumin hydrogel as a novel drug delivery vehicle. *Materials Science and Engineering: C*, 30(5), 664-669.
- Hirsch-Lerner, D., Zhang, M., Eliyahu, H., Ferrari, M. E., Wheeler, C. J., & Barenholz, Y. (2005). Effect of “helper lipid” on lipoplex electrostatics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1714(2), 71-84.
- Höck, J., & Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9(2), 210.
- Hutvagner, G. (2005). Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Letters*, 579(26), 5850-5857.
- Hyun, E. J., Hasan, M. N., Kang, S. H., Cho, S., & Lee, Y. K. (2019). Oral siRNA delivery using dual transporting systems to efficiently treat colorectal liver metastasis. *International Journal of Pharmaceutics*, 555, 250-258.

- Iwao, Y. (2016). M, Otagiri, & V. T. G., Chuang, (Editörler). Albumin Nanoparticles. *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical Applications. Springer.* 91-100.
- Jaronczyk, K., Carmichael, J. B., & Hobman, T. C. (2005). Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others?. *Biochemical Journal*, 387(3), 561-571.
- Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y., & He, N. (2014). Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*, 4(3), 240.
- Kamran, M. Z., Patil, P., & Gude, R. P. (2013). Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *BioMed Research International*, 2013.
- Karagüzel, A., Kalay, E., & Celep, F. (2007). RNA interferans (RNAi): gen sessizleştirilmesi ve tedavi edici uygulamaları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33(1), 41-44.
- Kher, G., Trehan, S., & Misra, A. (2011). Ambikanandan M. (Editör). Antisense oligonucleotides and rna interference. in *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics*. 325-386.
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173-3178.
- Kim, T., & Hyeon, T. (2013). Applications of inorganic nanoparticles as therapeutic agents. *Nanotechnology*, 25(1), 012001.
- Kim, W. J., & Kim, S. W. (2009). Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharmaceutical Research*, 26(3), 657-666.
- Koç, B. T., Oğuzoğlu T. Ç. (2015). Antiviral RNA İnterferenz (RNAi) ve Yeni Bir Gen Düzenleme Metodu CRISPR/Cas Mekanizması ile Karşılaştırılması. *Animal Health, Production and Hygiene*, 4(2), 429-434.
- Kratz, F. (2008). Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 171-183.
- Kundu, P. P., & Sharma, V. (2008). Synthetic polymeric vectors in gene therapy. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 12(5-6), 89-102.

- Lam, J. K. W., Liang, W., & Chan, H. K. (2012). Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(1), 1-15.
- Landen, C. N., Chavez-Reyes, A., Bucana, C., Schmandt, R., Deavers, M. T., Lopez-Berestein, G., & Sood, A. K. (2005). Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Research*, 65(15), 6910-6918.
- Larsen, M. T., Kuhlmann, M., Hvam, M. L., & Howard, K. A. (2016). Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Molecular and Cellular Therapies*, 4(1), 3.
- Layek, B., & Singh, J. (2017). Chitosan for DNA and gene therapy. In *Chitosan Based Biomaterials Volume 2* (pp. 209-244). Woodhead Publishing.
- Le, B. T., Raguraman, P., Kosbar, T. R., Fletcher, S., Wilton, S. D., & Veedu, R. N. (2018). Antisense oligonucleotides targeting angiogenic factors as potential cancer therapeutics. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 142-157.
- Lee, J. M., Yoon, T. J., & Cho, Y. S. (2013). Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. *Biomed Research International*, 2013.
- Lee, J. Y., Bae, K. H., Kim, J. S., Nam, Y. S., & Park, T. G. (2011). Intracellular delivery of paclitaxel using oil-free, shell cross-linked HSA–multi-armed PEG nanocapsules. *Biomaterials*, 32(33), 8635-8644.
- Lee, S. H., Heng, D., Ng, W. K., Chan, H. K., & Tan, R. B. (2011). Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 403(1-2), 192-200.
- Li, C. X., Parker, A., Menocal, E., Xiang, S., Borodyansky, L., & Fruehauf, J. H. (2006). Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*, 5(18), 2103-2109.
- Li, Y., Lin, Z., Xu, T., Wang, C., Zhao, M., Xiao, M., ... & Zhu, B. (2017). Delivery of VP1 siRNA to inhibit the EV71 virus using functionalized silver nanoparticles through ROS-mediated signaling pathways. *RSC Advances*, 7(3), 1453-1463.
- Loira-Pastoriza, C., Todoroff, J., & Vanbever, R. (2014). Delivery strategies for sustained drug release in the lungs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 75, 81-91.
- Ma, H., & Chen, G. (2005). Gene transfer technique. *Nature and Science*, 3(1), 25-31.

- Marsh, D., Bartucci, R., & Sportelli, L. (2003). Lipid membranes with grafted polymers: physicochemical aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1615(1-2), 33-59.
- Mendez, C. M., McClain, C. J., & Marsano, L. S. (2005). Albumin therapy in clinical practice. *Nutrition in Clinical Practice*, 20(3), 314-320.
- Merkel, O. M., Rubinstein, I., & Kissel, T. (2014). siRNA delivery to the lung: what's new?. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 75, 112-128.
- Merten, O. W., & Gaillet, B. (2016). Viral vectors for gene therapy and gene modification approaches. *Biochemical Engineering Journal*, (108), 98-115.
- Miele, E., Spinelli, G. P., Miele, E., Tomao, F., & Tomao, S. (2009). Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 4, 99.
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, And Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, 83, 5, 584-594.
- Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., & Benoit, J. P. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*, 29(24-25), 3477-3496.
- Müller, R. H., Radtke, M., & Wissing, S. A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, S131-S155.
- Nahar, K., Gupta, N., Gauvin, R., Absar, S., Patel, B., Gupta, V., ... & Ahsan, F. (2013). In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particle deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(5), 805-818.
- Nance, M. E., Duan, D. (2018). Gene Therapy: Use of Viruses as Vectors. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 1-9.
- Neu, M., Fischer, D., & Kissel, T. (2005). Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly (ethylene imine) and its derivatives. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 7(8), 992-1009.

- Nidhin, M., Indumathy, R., Sreeram, K. J., & Nair, B. U. (2008). Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. *Bulletin of Materials Science*, 31(1), 93-96.
- Nimmano, N., Somavarapu, S., & Taylor, K. M. (2018). Aerosol characterisation of nebulised liposomes co-loaded with erlotinib and genistein using an abbreviated cascade impactor method. *International Journal of Pharmaceutics*, 542(1-2), 8-17.
- Nitta, S., & Numata, K. (2013). Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 1629-1654
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823-839.
- Öner, F. (2012). A. Z. Gürsoy (Editör). Süspansiyonlar: Zeta Potansiyel. *Farmasötik Teknoloji – Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*. 257-272.
- Patil, Y., & Panyam, J. (2009). Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *International Journal of Pharmaceutics*, 367(1-2), 195-203.
- Pedroso de Lima, M. C., Simoes, S., Pires, P., Faneca, H., & Düzgüneş, N. (2001). Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), 277-294.
- Pei, J., Zhang, Y., Luo, Q., Zheng, W., Li, W., Zeng, X., ... & Quan, J. (2019). STAT3 inhibition enhances CDN-induced STING signaling and antitumor immunity. *Cancer Letters*, 450, 110-122.
- Peters Jr, T. (1995). The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. Academic press, 9-75
- Qi, J., Yao, P., He, F., Yu, C., & Huang, C. (2010). Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core-doxorubicin loading and delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 393(1-2), 177-185.

- Radaic, A., Paula, E. D., & Jesus, M. B. D. (2015). Factorial design and development of solid lipid nanoparticles (SLN) for gene delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(2), 1793-1800.
- Rao, N. M. (2010). Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(3), 245-252.
- Razei, L., Safavi, M., S., Shojaosadati, S., A. (2019). S. S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. Kumar, M. S. Thomas, (Editörler). Protein Nanocarriers for Targeted Drug Delivery. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*. 199-218
- Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., and Minor, L. (2016). In vitro cell based assays: cell viability assays, In: Assay Guidance Manual. Sittampalam, G.S., Coussens, N.P. Brimacombe K. et al (Eds.) *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*. Amerika: Bethesda.
- Romano, N., & Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6(22), 3343-3353.
- Romero, G., & Moya, S. E. (2012). Synthesis of organic nanoparticles. In *Frontiers of Nanoscience* (Vol. 4, pp. 115-141). Elsevier.
- Ryu, W. S. (2017). Chapter 19 - Virus Vectors. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*, 263-275.
- Sakurai, Y., Hada, T., Kato, A., Hagino, Y., Mizumura, W., & Harashima, H. (2018). Effective Therapy Using a Liposomal siRNA that Targets the Tumor Vasculature in a Model Murine Breast Cancer with Lung Metastasis. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 11, 102-108.
- Salim, M., Minamikawa, H., Sugimura, A., & Hashim, R. (2014). Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics. *MedChemComm*, 5(11), 1602-1618.
- Santos-Rebelo, A., Garcia, C., Eleutério, C., Bastos, A., Castro Coelho, S., Coelho, M., Molpeceres, j., Viana, A., S., Ascensão, L., Pinto, J., F., Gaspar, M., Rijo, P. &

- Reis, C., P., (2018). Development of Parvifloron D-Loaded Smart Nanoparticles to Target Pancreatic Cancer. *Pharmaceutics*, 10(4), 216.
- Sato, T., Ishii, T., & Okahata, Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22(15), 2075-2080.
- Shim, G., Choi, H. W., Lee, S., Choi, J., Yu, Y. H., Park, D. E., ... & Oh, Y. K. (2013). Enhanced intrapulmonary delivery of anticancer siRNA for lung cancer therapy using cationic ethylphosphocholine-based nanolipoplexes. *Molecular Therapy*, 21(4), 816-824.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., & Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305(5689), 1434-1437.
- Song, W. J., Du, J. Z., Sun, T. M., Zhang, P. Z., & Wang, J. (2010). Gold nanoparticles capped with polyethyleneimine for enhanced siRNA delivery. *Small*, 6(2), 239-246.
- Sou, T., Meeusen, E. N., de Veer, M., Morton, D. A., Kaminskas, L. M., & McIntosh, M. P. (2011). New developments in dry powder pulmonary vaccine delivery. *Trends in Biotechnology*, 29(4), 191-198.
- Şenel, B. (2012). *siRNA Taşıyıcı Sistem Geliştirme ve Değerlendirme Çalışmaları*. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Şenel, B., Büyükköroğlu, G., & Yazan, Y. (2015). Solid lipid and chitosan particulate systems for delivery of siRNA. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(11), 698-705.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., ... & Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 3801-3804.
- Taratula, O., Garbuzenko, O. B., Kirkpatrick, P., Pandya, I., Savla, R., Pozharov, V. P., He, H. & Minko, T. (2009). Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 140(3), 284-293.

- Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S., & Iyer, A. (2017). siRNA delivery strategies: a comprehensive review of recent developments. *Nanomaterials*, 7(4), 77.
- Thapa, B., & Narain, R. (2016). Mechanism, current challenges and new approaches for non viral gene delivery. *In Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy* 1-27.
- Uddin, S. N. (2007). Cationic lipids used in non-viral gene delivery systems. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2(3), 058-067.
- Uprichard, S. L. (2005). The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Letters*, 579(26), 5996-6007.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *in Cancer Cell Culture* (pp. 237-245). Humana Press.
- Vo, T. S., Ngo, D. H., Kang, K. H., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2015). The beneficial properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(1), 129-138.
- Von Storp, B., Engel, A., Boeker, A., Ploeger, M., & Langer, K. (2012). Albumin nanoparticles with predictable size by desolvation procedure. *Journal of Microencapsulation*, 29(2), 138-146.
- Wadhwa, R., Kaul, S. C., Miyagishi, M., & Taira, K. (2004). Know-how of RNA interference and its applications in research and therapy. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(1), 71-84.
- Wang, J. J., Zeng, Z. W., Xiao, R. Z., Xie, T., Zhou, G. L., Zhan, X. R., & Wang, S. L. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 765.
- Weibel, E. R. (1979). Morphometry of the human lung: the state of the art after two decades. *Bulletin Europeen de Physiopathologie Respiratoire*, 15(5), 999-1013.
- Williams, J. G. (1999). Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(9), 333-334.
- Wong, S. L., & Sukkar, M. B. (2016). The SPARC protein: an overview of its role in lung cancer and pulmonary fibrosis and its potential role in chronic airways disease. *British Journal of Pharmacology*, 174(1), 3-14.

- Xu, R., Fisher, M., & Juliano, R. L. (2011). Targeted albumin-based nanoparticles for delivery of amphipathic drugs. *Bioconjugate Chemistry*, 22(5), 870-878.
- Yang, J. P., & Huang, L. (1997). Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA. *Gene Therapy*, 4(9), 950.
- Yang, X. Z., Dou, S., Sun, T. M., Mao, C. Q., Wang, H. X., & Wang, J. (2011). Systemic delivery of siRNA with cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 203-211.
- Ye, J., Pei, X., Cui, H., Yu, Z., Lee, H., Wang, J., ... & Yang, V. C. (2018). Cellular uptake mechanism and comparative in vitro cytotoxicity studies of monomeric LMWP-siRNA conjugate. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 63, 103-111.
- Young, S. W. S., Stenzel, M., & Jia-Lin, Y. (2016). Nanoparticle-siRNA: a potential cancer therapy?. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 98, 159-169.
- Yu, H., & Jove, R. (2004). The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 97.
- Yu, H., Kortylewski, M., & Pardoll, D. (2007). Tumour immunology: Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 7(1), 41.
- Yu, Y. H., Kim, E., Park, D. E., Shim, G., Lee, S., Kim, Y. B., ... & Oh, Y. K. (2012). Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(2), 268-273.
- Zheng, M., Librizzi, D., Kılıç, A., Liu, Y., Renz, H., Merkel, O. M., & Kissel, T. (2012). Enhancing in vivo circulation and siRNA delivery with biodegradable polyethylenimine – graft – polycaprolactone - block-poly (ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials*, 33(27), 6551-6558.
- Zuo, J., Jiang, Y., Zhang, E., Chen, Y., Liang, Z., Zhu, J., ... & Wang, W. (2019). Synergistic effects of 7-O-geranylquercetin and siRNAs on the treatment of human breast cancer. *Life Sciences*, 227, 145-152.
- http-1: <https://www.hindawi.com/journals/jaa/2011/782187/fig1/>
(Erişim Tarihi : 22/12/2018)

http-2: https://openwetware.org/wiki/Griffin:siRNA_transfection
(Erişim Tarihi : 06/02/2019)

http-3: http://www.mdpi.com/ijms/ijms-14-01629/article_deploy/html/images/ijms-14-01629f1-1024.png
(Erişim Tarihi : 13/03/2019)