

**siRNA TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRME
VE DEĞERLENDİRME ÇALIŞMALARI**

Behiye ŞENEL
Doktora Tezi

**siRNA TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRME
VE DEĞERLENDİRME ÇALIŞMALARI**

Behiye ŞENEL

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2012

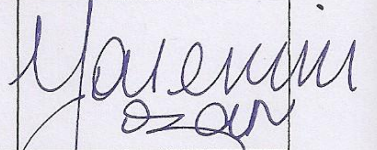
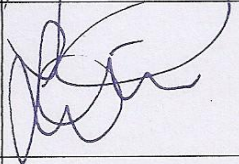
Tez Danışmanı Prof. Dr. Yasemin YAZAN

Yard. Danışman Yard. Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
tarafından desteklenmiştir (Proje No. 09 0345)

Jüri ve Enstitü Onayı

Behiye ŞENEL' in siRNA Taşıyıcı Sistem Geliştirme ve Değerlendirme Çalışmaları başlıklı, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 10.07.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Yasemin YAZAN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Filiz Öner Hacettepe Üniversitesi	
Üye	Prof. Dr. Zerrin İncesu Anadolu Üniversitesi	
Üye	Doç. Dr. Müzeyyen Demirel Anadolu Üniversitesi	
Üye (Yrd. Danışmanı)	Yard.Doç.Dr.Gülay BÜYÜKKÖROĞLU Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Aydın DOĞAN



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı	Behiye ŞENEL
Doğum tarihi ve yeri	1980, Eskişehir
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Medeni durumu	Evli
İletişim adresleri	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fak. Farmasötik Biyoteknoloji ABD.
Tel	0 222 3350580 / 3725
Fax	0 222 3357170
e-posta	behiyek@anadolu.edu.tr

Eğitim Durumu

İlkokul	Osmangazi İlkokulu
Ortaokul	Osmangazi Ortaokulu
Lise	Prof. Dr. Orhan Oğuz Süper Lisesi
Üniversite	Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yabancı dil(ler)	İngilizce

Mesleki Deneyim

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

- Türkiye Kontrollü Salım Sistemleri Derneği
- Türkiye Kozmetik Araştırmacıları Derneği
- Türkiye Tıbbi Genetik Derneği
- Farmasötik Araştırmacılar Derneği
- Avrupa Biyoteknoloji Derneği

Yayınlar

Büyükköroğlu G., Şenel B., ‘Preliminary Study on The Formulation And Evaluation of Cationic SLNs for Gene Delivery’, 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona, Spain, (Poster Bildiri), 7-12 April 2008

Gülay Büyükköroğlu, Behiye Şenel, A. Tansu Koparal, Beklem Bostancıoğlu, Formulation and Evaluation of Various Cationic Solid Lipid Nanoparticles Containing Octadecylamine, 14th International Pharmaceutical Technology Symposium, Antalya, Türkiye, (Poster Bildiri) September 6-10, 2008.

Gülay Büyükköroğlu, Behiye Şenel, Yasemin Yazan, Studies on Cationic Chitosan Nanoparticle Formulations for Gene Delivery, 11th International Conference on Chitin & Chitosan & The 8th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, Taipei, Taiwan, (Poster Bildiri), September 6-9, 2009.

Yasemin Yazan, Gülay Büyükköroğlu, Behiye Şenel, Nanostructure-mediated Drug Delivery, 3rd BBBB-Bosphorus International Conference on Pharmaceutical Sciences, Antalya, Türkiye, October 26-28, 2009.

Bilimsel Etkinlikler

Kontrollü Salım Sistemleri 6. Sempozyumu, İstanbul, 22 Mayıs 2009.

“Nanofarmasötik Gelişmeler ve Uygulamalar” Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Konferans Salonu, Ankara, 20 Kasım, 2009.

Eğitimler

“Hibridoma Teknolojisi ve Antikora Dayalı Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi” TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Gebze, Haziran 2010

ÖNSÖZ

“siRNA Taşıyıcı Sistem Geliştirme ve Değerlendirme Çalışmaları” başlıklı çalışmamızda siRNA’yı taşıyabilecek lipidik ve polimerik sistemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Hazırlanan ön formülasyonlarda parçacık büyüklüğü, zeta potansiyel değeri, sitotoksosite değerleri, siRNA bağlayabilme özellikleri çalışılmıştır. Bu değerler açısından en iyi olan formülasyonlar seçilmiş, kontrol olarak ticari Lipofektamin[®]2000 kullanılarak transfeksiyon denemeleri yapılmıştır. Transfeksiyon sonucunda *Western Blot* yöntemi ile transfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda transfeksiyon yapabilen formülasyonlar geliştirilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda bu formülasyonların *in vivo* çalışmalarının yapılması düşünülmektedir.

Gerek tez çalışmalarım gerekse iş hayatım süresince geniş bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışman hocam Prof. Dr. Yasemin YAZAN’a,

Farmasötik Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı’na ilk geldiğim andan itibaren gece gündüz demeden kendi tecrübelerini benimle paylaşan ve çalışmalarına katkı sağlayan, hayata dair birçok şeyi paylaştığım yardımcı tez danışman hocam Yard. Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU’na,

Çalışmalarında, yakın ilgi gösteren ve yardımlarını esirgemeyen, iyi günümde kötü günümde hep yanımda olan, acı tatlı her anımı paylaşıp sıkıntılarımı hafifleten bölüm hocalarım ve arkadaşlarım, Doç. Dr. Müzeyyen DEMİREL’e, Yard. Doç. Dr. Ebru BAŞARAN’a, Yard. Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ’e, Yard. Doç. Dr. Murat Sami BERKMAN’a, Arş. Grv. Gülsel YURTDAS’a, Uzm. Sefa AVCIER’e ve Ecz. Umay Merve GÜVEN’e,

TEM analizlerimin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan BİBAM’dan Arzu İŞCAN’a,

Sitotoksosite ve transfeksiyon çalışmalarımı yapabilmem için hücre kültürü laboratuvarını kullanmama izin veren ve aynı zamanda manevi olarak çok desteklerini gördüğüm Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı hocaları Yard. Doç. Dr. Sinem ILGIN’a ve Arş. Grv. Dr. Özlem ATLI’ya,

Çalışmamdaki hücreleri temin etmemde yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Miriş DİKMEN’e,

Tez çalışmam süresince bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyen her sorduğum soruya bıkmadan, usanmadan cevaplayan Prof. Dr. Zerrin İNCESU ve Yard. Doç. Dr. Gülşen AKALIN’a,

Öncelikle benim bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın her aşamasında bana maddi manevi destek olan ve yüreklendiren aileme ve tanıştığım ilk andan itibaren beni hep mutlu eden ve varlığıyla bana güç katan sevgili eşim Koray ŞENEL’e

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

siRNA TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRME VE DEĞERLENDİRME ÇALIŞMALARI

ÖZET

KontROLSÜZ hücre çoğalması, kitle veya tümör oluşumu ile karakterize olan kanser günümüzün en önemli sağlık sorunlarından birisidir. KontROLSÜZ gerçekleşen çoğalma, DNA’da meydana gelen mutasyonlar sonucu (onkojen aktivasyonu, tümör süpresör gen inaktivasyonu, vb) hücre apoptozunun gerçekleşmemesi ile ortaya çıkmaktadır.

Memeli hücrelerinde 2001’de Tuschl ve ark. tarafından ilk kez keşfedilen siRNA, bugüne kadar kanser tedavisinde, anjiyogenezin inhibe edilmesinde, çeşitli onkojenlerin inhibisyonu ve hücre-içi sinyal iletim sistem genlerinin inhibisyonu ile tümör gelişiminin durdurulması ve apoptozun indüklenmesinde, radyo veya kemo hassaslığının artırılması çalışmalarında kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında farklı lipidik ve polimerik sistemlerin siRNA teknolojisi için kullanılması hedeflenmiştir. Lipidik yapıdaki sistemler için ‘Katı Lipit Nanopartiküller’ (KLN), polimerik yapı için ise yeni geliştirilmiş ve yine çok fazla çalışılmamış suda çözünebilen kitosan polimerleri kullanılmıştır. Genetik materyal olarak Bcl-2 siRNA’sı seçilmiştir.

KLN hazırlanmasında çeşitli yöntemler kullanılmış (sonikasyon ve yüksek hızda karıştırma ile basit emülsiyon) ve zeta potansiyel, parçacık büyüklüğü, siRNA bağlayabilme özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Bu özellikler açısından en uygun olduğuna karar verilen sonikasyon ile ve yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan birer formülasyon transfeksiyon çalışmaları için kullanılmıştır.. Kitosan çalışmasında ise polimerik formülasyon hazırlamak için farklı moleküler ağırlığa sahip kitosanlar kullanılmıştır. Bu formülasyonlarda da karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra siRNA bağlama ve sitotoksite açısından değerlendirildiğinde en fazla 10 kDa moleküler ağırlıklı kitosanın (K4) transfeksiyon için uygun olduğu saptanmıştır.

A549 ve MCF-7 hücrelerinde yapılan transfeksiyon çalışmaları sonucunda sonikasyon ile hazırlanan formülasyon kontrol olarak kullanılan Lipofektamin®2000’e yakın transfeksiyon etkinliği gösterirken, Kitosan formülasyonu (K4) çok fazla etkinlik gösterememiştir. Transfeksiyon etkinliğinin analizi için yapılan Western Blot çalışmasında 72. saatte Lipofektamin’in Bcl-2 proteini baskılayabildiği tespit edilirken sonikasyon ile hazırlanan formülasyonun kitosan ile hazırlanan formülasyona göre daha çok baskılama özelliği gösterdiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler Katyonik katı lipitler, Kitosan, siRNA, Transfeksiyon, Bcl-2

DEVELOPING and EVALUATING STUDIES on siRNA DELIVERY SYSTEMS

ABSTRACT

Cancer, which is one of today's most important health problem, lead to the formation of mass or tumor which is characterized by uncontrolled cell proliferation. Uncontrolled proliferation was the result of unrealized apoptosis due to mutations in DNA (activation of oncogene, inactivation of tumor supressor genes *etc.*).

siRNA was first discovered in mammalian cells by Tuschl *et al.* in 2001. And since than it is being used for the treatment of many cancer cases for the both inhibition of angiogenesis and various oncogenes and intracellular signal transduction system genes to stop tumor growth and induction of apoptosis and also increasement of the sensitivity of the radio or chemotherapy.

In this study, we aimed to use of different lipidic and polymeric systems for this technology. We formulated “Solid Lipid Nanoparticles” (SLN) and water soluble chitosan polymers which are newly developed and not much studied on as lipidik and polymeric structure respectively Bcl-2 siRNA was choosen as the genetic material.

A variety of methods (sonication, simple emulsion with high speed mixing) were used for the preparation of SLN and were evaluated for the zeta potential, particle size, cytotoxicity, siRNA binding ability. S5 was the best formulation that was prepared with sonication and also G2 was the best formulation thar was prepared with high speed stirring in terms of the all features and was selected as the most appropriate formulation for transfection studies. In chitosan studies, for the preparation different molecular-weight water soluble chitosans were used the polymeric formulations. And also they were evaluated for characterisation, cytotoxicity, efficacy of siRNA binding. When the results were evaluated, The 10 kDa molecular weight Kitosan (K4) was the best candidate for further transfection studies.

As the results of the transfection stdies, When the S5 formulations have showed closer transfection activitiy compared to Lipofectamin®2000 which was used as a control, K4 showed not much activity in A549 and MCF-7 cells. In the Westen blot sudies which is made for the analysis of the effectiveness of transfection, especially in the 72th hours, the inhibition of Bcl-2 protein was observed with S5 formulations according to K4.

Key Words Cationic solid lipid particles, Chitosan, siRNA, Transfection, Bcl-2

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	3
Gen Terapisi	3
Antisens Teknoloji	4
RNAi Mekanizması	7
RNAi'nin Hücre İçine Taşınmasında Kullanılan Vektörler	9
<i>Viral Vektörler</i>	9
<i>Retrovirüsler</i>	9
<i>Lentivirüsler</i>	10
<i>Adenovirüsler</i>	10
<i>Adeno-iliskli Virüsler</i>	11
<i>Viral Olmayan Vektörler</i>	11
<i>Çıplak siRNA</i>	12
<i>Lipit Bağımlı Taşıma Vektörleri</i>	13
<i>Lipozomlar</i>	13
<i>Nötral lipitler</i>	14
<i>Katyonik lipitler</i>	14
<i>Katı Lipit Nanopartiküller (KLN)</i>	16
<i>Katı Lipit Hazırlama Yöntemleri</i>	17
<i>Yüksek basınçla homojenizasyon yöntemi</i>	17
<i>Sıcak homojenizasyon yöntemi</i>	17
<i>Soğuk homojenizasyon yöntemi</i>	18
<i>Mikroemülsiyon ile KLN hazırlama</i>	18
<i>Çözücü emülsifikasyon-evaporasyon tekniği ile KLN</i>	

<i>hazırlanması</i>	18
<i>Emülsifikasyon-difüzyon ile KLN hazırlama yöntemi</i>	19
<i>Ultrasonikasyon ya da yüksek hızda homojenizasyon ile hazırlama</i>	19
Polimerik Sistemler	19
<i>Polietilenimin (PEI)</i>	19
<i>Polietilen Glikol (PEG)</i>	20
<i>Siklodekstrin İlişkili Polikasyon Sistemler</i>	20
<i>Poli(D,L- Laktit-Ko-Glikolit) (PLGA)</i>	20
<i>Kitosan</i>	21
<i>Polimer Parçacıkların Hazırlanış Yöntemleri</i>	22
<i>İyonotropik jelasyon</i>	22
<i>Koaservasyon</i>	22
<i>Çapraz bağlama</i>	23
<i>Polimerizasyon</i>	23
<i>Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma</i>	23
<i>Püskürterek kurutma</i>	23
<i>Dendrimer</i>	23
Transfeksiyon Yöntemleri	24
Genetik Materyalin Hücre İçerisine Alımı	26
Apoptoz	27
Bcl-2	28
MATERYAL VE YÖNTEMLER	30
Materyal	30
<i>Kullanılan Maddeler</i>	30
<i>Kullanılan Cihazlar</i>	31
YÖNTEMLER	33
Formülasyon Çalışmaları	33
<i>Ön Formülasyon Çalışmaları</i>	33
<i>Katı Lipit Nanopartikül Hazırlama Çalışmaları</i>	33
<i>Yüksek Hızda Karıştırma Tekniği ile KLN Hazırlanması</i>	35
<i>Sonikasyon Tekniği ile KLN Hazırlanması</i>	35
<i>KLN'lere oktadesilamin ile pozitif yük kazandırılması</i>	36
<i>Kitosan Parçacıklarını Hazırlama Çalışmaları</i>	36

Karakterizasyon Çalışmaları	37
<i>Parçacık Boyutu ve Dağılımı</i>	37
<i>Zeta Potansiyel</i>	37
<i>Ph Değeri</i>	37
<i>Morfolojik İnceleme</i>	37
Hücre Kültürü	37
Sitotoksite	38
Genetik Materyali (siRNA) Formülasyona Yükleme	39
<i>Adsorbsiyon</i>	39
<i>Ekstraksiyon I yöntemi</i>	40
<i>Enkapsülasyon</i>	40
<i>Ekstraksiyon II yöntemi</i>	41
Jel Retardasyon Çalışmaları	41
<i>Agaroz Jel Elektroforez İşlemi</i>	41
Serum İçindeki Kararlılık	42
Transfeksiyon Çalışmaları	42
Transfekte Edilmiş Hücrelerin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi	43
Transfeksiyon Yapılmış Hücrelerden Protein İzolasyonu	43
<i>Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi</i>	44
<i>Micro BCA protein testinin uygulanması</i>	44
SDS-PAGE Jel Elektroforez (Sodyum Dodesil Sülfat	
Poliakrilamit Jel Elektroforezi)	45
<i>SDS-Page Yöntemi</i>	45
<i>Kullanılan çözeltiler</i>	45
<i>SDS için protein örnekleri ve işaretleyici hazırlanması</i>	46
<i>SDS-PAGE'in uygulanması</i>	47
<i>Brillant Blue ile jelin boyanması</i>	47
Western Blot'lama	48
<i>Western Blot Yöntemi</i>	48
<i>Kullanılan çözeltiler</i>	49
<i>Western Blot uygulaması</i>	49
İstatistiksel Analiz	50
BULGULAR ve TARTIŞMA	51
Katı Lipitler ile Yapılan Formülasyon Çalışmaları	51

Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı	51
<i>Yüksek Hızda Hazırlanan KLN'lerin Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı</i>	52
<i>Sonikasyon ile Hazırlanan KLN'lerin Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı</i>	54
Zeta Potansiyel Değeri	57
<i>Yüksek Hızda Karıştırma ile Hazırlanan KLN'lerin Zeta Potansiyeli</i>	57
<i>Sonikasyon ile Hazırlanan KLN'lerin Zeta Potansiyeli</i>	59
Kitosan ile Yapılan Formülasyon Çalışmaları	60
Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı	61
Zeta Potansiyel Değeri	62
Formülasyonların pH Değeri	63
Formülasyonların TEM Görüntüsü	65
Formülasyonların Sitotoksitesi	66
<i>Lipectamin® 2000 'in Sitotoksitesi</i>	67
<i>Yüksek Hızda Karıştırma Tekniği ile Hazırlanan KLN'lerin Sitotoksitesi</i>	69
<i>Sonikasyon Tekniği ile Hazırlanan KLN'lerin Sitotoksitesi</i>	74
<i>Kitosan Formülasyonlarının Sitotoksitesi</i>	78
KLN'lere siRNA Bağlanması	84
<i>Yüksek Hızda Karıştırma Tekniği ile Hazırlanan KLN'ye siRNA Bağlanması</i>	84
<i>Sonikasyon Tekniği ile Hazırlanan KLN'ye siRNA Bağlanması</i>	84
<i>Kitosan Formülasyonlarına siRNA Bağlanması</i>	85
KLN Formülasyonlarında Ekstraksiyon Çalışmaları	89
Kitosan Formülasyonunda Ekstraksiyon Çalışması	91
G2, S5 ve K4'ün Serumdaki Kararlılığı	91
Formülasyonların Transfeksiyon Çalışması	93
G2, S5, K4/siRNA Bileşimlerinin Parçacık Büyüklüğü	93
G2, S5, K4/siRNA Bileşimlerinin Zeta Potansiyeli	95
G2, S5, K4/siRNA Bileşimlerinin Transfeksiyonu	96
<i>S5'in Transfeksiyonu</i>	98
<i>G2'nin Transfeksiyonu</i>	102
<i>K4'ün Transfeksiyonu</i>	103
Transfeksiyonun Hücreler Üzerinde Sayısal Olarak Değerlendirilmesi	107

Transfeksiyon Yapılan Hücrelerden Protein Elde Edilmesi	109
<i>Protein Miktar Tayini</i>	109
SDS ve <i>Western Blot</i> Çalışması	110
SONUÇ ve ÖNERİLER	116
KAYNAKLAR	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA
Şekil 1 <i>Ex vivo</i> gen terapisi	3
Şekil 2 <i>In vivo</i> gen terapisi	4
Şekil 3 RNAz-H ile mRNA'nın kırılması	5
Şekil 4 Ribonükleotitlerin kimyasal modifikasyonu	6
Şekil 5 İkinci tip antisens moleküller	6
Şekil 6 Ribozimler aracılığıyla mRNA kırılması	7
Şekil 7 miRNA ve siRNA yolakları	8
Şekil 8 DNA/siRNA aktarımında yaygın olarak kullanılan viral olmayan vektörlerin şematik gösterimi	12
Şekil 9 Lipozom çeşitleri	13
Şekil 10 Katyonik lipidlerin yapısı	15
Şekil 11 Kitosanın kimyasal yapısı	21
Şekil 12 Kitooligosakkaritlerin kimyasal yapısı	22
Şekil 13 Dendrimer yapısı	23
Şekil 14 Gen taşıyıcı sistemlerin hücre içine alım yolları	26
Şekil 15 Apoptoz yolakları	28
Şekil 16 MTT yöntemi	39
Şekil 17 SDS elektroforez	45
Şekil 18 <i>Western Blotlama</i>	48
Şekil 19 <i>Western Blotlama</i> protokolü	48
Şekil 20 Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLN'lerin ortalama parçacık büyüklüğü	53
Şekil 21 Sonikasyon ile hazırlanan KLN'lerin lipid oranı ve farklı sonikasyon süreleri için parçacık büyüklüğü	55
Şekil 22 S5 formülasyonunun diyaliz-filtrasyon ve filtrasyon-diyaliz sonrası ortalama parçacık büyüklüğü	56
Şekil 23 Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLN'lerin zeta potansiyeli	58
Şekil 24 Sonikasyon ile hazırlanan KLN'lerin lipid oranı ve farklı sonikasyon süreleri için zeta potansiyeli	59

Şekil 25	S5 formülasyonunun diyaliz-filtrasyon ve filtrasyon-diyaliz sonrası zeta potansiyeli	60
Şekil 26	Kitosan formülasyonlarının parçacık büyüklüğü dağılımı	61
Şekil 27	Kitosan formülasyonlarının zeta potansiyeli	62
Şekil 28	Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLN'lerin pH değeri	63
Şekil 29	Sonikasyon ile hazırlanan KLN'lerin pH değeri	64
Şekil 30	Kitosan formülasyonlarının pH değeri	64
Şekil 31	S5'in TEM görüntüsü (87000 X büyütme)	65
Şekil 32	G2'nin TEM görüntüsü (87000 X büyütme)	65
Şekil 33	K4'ün TEM görüntüsü (87000 X büyütme)	66
Şekil 34	Lipofectamin®2000'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi	68
Şekil 35	Lipofectamin®2000'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi	68
Şekil 36	G2'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi	70
Şekil 37	G2'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi	70
Şekil 38	G3'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi	71
Şekil 39	G3'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi	71
Şekil 40	P4'ün 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi	72
Şekil 41	P4'ün 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi	72
Şekil 42	G2, G3 ve P4'ün 24. saatteki hücre canlılığı oranları	73
Şekil 43	G2, G3 ve P4'ün 48. saatteki hücre canlılığı oranları	74
Şekil 44	S5'in diyaliz öncesi 24 saatlik sitotoksitesi	75
Şekil 45	S5'in diyaliz öncesi 48 saatlik sitotoksitesi	75
Şekil 46	S5'in diyaliz-filtre sonrası 24 saatlik sitotoksitesi	76
Şekil 47	S5'in diyaliz-filtre sonrası 48 saatlik sitotoksitesi	76
Şekil 48	S5'in diyaliz sonrası 72 saatlik sitotoksitesi	77
Şekil 49	K1'in 24 saatlik sitotoksitesi	79
Şekil 50	K1'in 48 saatlik sitotoksitesi	79
Şekil 51	K2'nin 24 saatlik sitotoksitesi	80
Şekil 52	K2'nin 48 saatlik sitotoksitesi	80
Şekil 53	K3'ün 24 saatlik sitotoksitesi	81

Şekil 54	K3'ün 48 saatlik sitotoksitesi	81
Şekil 55	K4'ün 24 saatlik sitotoksitesi	82
Şekil 56	K4'ün 48 saatlik sitotoksitesi	82
Şekil 57	K4'ün 72 saatlik sitotoksitesi	83
Şekil 58	G2'ye siRNA bağlanması	84
Şekil 59	1 dak, 2 dak, 3 dak ve 4 dak sonikasyon uygulanmasının siRNA üzerine etkisi	85
Şekil 60	K1'in siRNA bağlanması	86
Şekil 61	K2'nin siRNA bağlanması	86
Şekil 62	K3'ün siRNA bağlanması	86
Şekil 63	K4'ün siRNA bağlanması	87
Şekil 64	K3 ve K1 için farklı oranlarda siRNA bağlanması	88
Şekil 65	K2 için farklı oranlarda siRNA bağlanması	88
Şekil 66	G2'nin ekstraksiyon sonrası	90
Şekil 67	S5'in ekstraksiyon sonrası	90
Şekil 68	K4'ün ekstraksiyon sonrası	91
Şekil 69	G2'nin serumda bekletilmesinden ve ekstraksiyondan sonrası	92
Şekil 70	S5 ve K4'ün serumda bekletilmesinden ve ekstraksiyondan sonrası	92
Şekil 71	siRNA/formülasyon oranı ve ortalama parçacık büyüklüğü	94
Şekil 72	siRNA/formülasyonların zeta potansiyeli	95
Şekil 73	A549 hücrelerinde Lipofectamin® 2000'in 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	96
Şekil 74	A549 hücrelerinde Lipofectamin® 2000'in 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	97
Şekil 75	MCF-7 hücrelerinde Lipofectamin® 2000'in 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	97
Şekil 76	MCF-7 hücrelerinde Lipofectamin® 2000'in 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	97
Şekil 77	S5'in A549 hücrelerinde 24 saatlik invert mikroskop görüntüsü (40 X büyütme)	98
Şekil 78	S5'in A549 hücrelerinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	98

Şekil 79	S5'in A549 hücrelerinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	99
Şekil 80	S5'in A549 hücrelerinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (40 X büyütme)	99
Şekil 81	S5'in A549 hücrelerinde 48 saatlik invert mikroskop görüntüsü (10 X büyütme)	99
Şekil 82	S5'in A549 hücrelerinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	100
Şekil 83	S5'in A549 hücrelerinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	100
Şekil 84	S5'in MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	100
Şekil 85	S5'in MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	101
Şekil 86	S5'in MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	101
Şekil 87	S5'in MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	101
Şekil 88	G2'nin A549 hücrelerinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	102
Şekil 89	G2'nin A549 hücrelerinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	102
Şekil 90	K4'ün A549 hücrelerindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	103
Şekil 91	K4'ün A549 hücrelerindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	103
Şekil 92	K4'ün A549 hücrelerindeki 48 saatlik invert mikroskop görüntüsü (40 X büyütme)	104
Şekil 93	K4'ün A549 hücrelerindeki 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	104
Şekil 94	K4'ün A549 hücrelerindeki 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	104
Şekil 95	K4'ün MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik invert mikroskop görüntüsü (20 X büyütme)	105

Şekil 96	K4'ün MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	105
Şekil 97	K4'ün MCF-7 hücrelerinin 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	105
Şekil 98	K4'ün MCF-7 hücrelerinin 48 saatlik invert mikroskop görüntüsü (20 X büyütme)	106
Şekil 99	K4'ün MCF-7 hücrelerindeki 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)	106
Şekil 100	K4'ün MCF-7 hücrelerindeki 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)	106
Şekil 101	MCF-7 hücrelerinin Floresan/aydınlık filtrede görüntüsü (20 X büyütme)	107
Şekil 102	A549 hücrelerinin Floresan/aydınlık filtrede görüntüsü (40 X büyütme)	108
Şekil 103	Formülasyonların A549 hücresinde 24 ve 48 saatlik hücre sayımı yüzdesi	108
Şekil 104	Formülasyonların MCF-7 hücresinde 24 ve 48 saatlik hücre sayımı yüzdesi	108
Şekil 105	BSA proteinlerinin standart eğrisi	109
Şekil 106	Proteinlerin molekül ağırlığını gösteren 3 renkli bant	112
Şekil 107	A549 hücresinden 24 ve 48 saat sonunda elde edilen proteinlerin SDS jel ve <i>Western Blot</i> sonucu PVDF membrandaki görüntüsü	113
Şekil 108	A549 hücresinden 48 ve 72 saat sonunda elde edilen proteinlerin SDS jel ve <i>Western Blot</i> sonucu PVDF membrandaki görüntü	113
Şekil 109	MCF-7 hücresinden 24 ve 48 saat sonunda elde edilen proteinlerin SDS jel ve <i>Western Blot</i> sonucu PVDF membrandaki görüntü	114
Şekil 110	MCF-7 hücresinden 48 ve 72 saat sonunda elde edilen proteinlerin SDS jel ve <i>Western Blot</i> sonucu PVDF membrandaki görüntü	114

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 Transfeksiyon tipleri	25
Çizelge 2 Hazırlanan tüm formülasyonların adlandırılması, formülasyon bileşimi ve yükleme şekli	34
Çizelge 3 Yüksek hızda karıştırma ve basit emülsiyon ile hazırlanan formülasyon	35
Çizelge 4 Sonikasyon ile hazırlanan formülasyon	35
Çizelge 5 Yüksek hızda karıştırma ve basit emülsiyon tekniği ile hazırlanan formülasyonda kullanılan oktadesilamin oranı	36
Çizelge 6 Kitosan ile hazırlanan formülasyon	37
Çizelge 7 KLN ve kitosan formülasyonlarının genetik materyal adsorbsiyonu	39
Çizelge 8 Transfeksiyonu çalışılan formülasyon oranı	43
Çizelge 9 BSA standardının hazırlanması	44
Çizelge 10 Yüksek hızda emülsifikasyon tekniği ile hazırlanan KLN'lerin ortalama parçacık büyüklüğü ve polidisperseite indisi	53
Çizelge 11 Sonikasyon ile hazırlanan KLN'lerin lipit oranı ve farklı sonikasyon süreleri için parçacık büyüklüğü ve polidisperseite indisi	55
Çizelge 12 S5 formülasyonunun diyaliz-filtrasyon ve filtrasyon-diyaliz sonrası ortalama parçacık büyüklüğü	56
Çizelge 13 Yüksek hızda emülsifikasyon tekniği ile hazırlanan KLN'lerin zeta potansiyeli	57
Çizelge 14 Sonikasyon ile hazırlanan KLN'lerin lipit oranı ve farklı sonikasyon süreleri için zeta potansiyeli	59
Çizelge 15 S5 formülasyonunun diyaliz-filtrasyon ve filtrasyon-diyaliz sonrası zeta potansiyeli	60
Çizelge 16 Kitosan formülasyonlarının parçacık büyüklüğü	61

Çizelge 17	Kitosan formülasyonlarının zeta potansiyeli	62
Çizelge 18	Lipofectamin®2000'in sitotoksosite çalışmasında kullanılan formülasyon miktarı	67
Çizelge 19	G2, G3 ve P4'ün sitotoksosite çalışmasında kullanılan formülasyon miktarı	69
Çizelge 20	S5'in sitotoksosite çalışmasında kullanılan formülasyon miktarı	74
Çizelge 21	Sitotoksosite testi için kullanılan kitosan formülasyonlarının miktarı	78
Çizelge 22	siRNA/G2 formülasyonu	84
Çizelge 23	siRNA bağlama yetisi için çalışılan siRNA/formülasyon oranı	86
Çizelge 24	K1, K2 ve K3'ün siRNA bağlama yetisi için çalışılan siRNA/formülasyon oranı	87
Çizelge 25	G2 formülasyonuna uygulanan ekstraksiyon işleminde kullanılan miktarlar ve jeldeki kuyu numaraları	90
Çizelge 26	siRNA/formülasyon oranı ve ortalama parçacık büyüklüğü	94
Çizelge 27	siRNA/formülasyonların zeta potansiyeli	95
Çizelge 28	Formülasyonlar için hesaplanan protein konsantrasyonu	110

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	: Amonyum persülfat
Bcl-2	: B-hücre lenfoma 2 (apoptoz düzenleyici gen)
BSA	: Bovin serum albümin
CCD	: <i>Charged-coupled device</i>
dak	: Dakika
Dc-Chol	: N,N-dimetil-N-etilkarboksamidokolesterol
DKM	: Diklorometan
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOGS	: Dioktadesilamidoglisil spermin
DOPE	: Dioleilfosfatidiletanolamin
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
DPPES	: Dipalmitoil fosfatidil etanolamido spermin
ECL	: Kemüleminasansı arttırılmış (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
EMA	: European Medicines Agency
FBS	: <i>Fetal Bovin serum</i>
FITC	: Floressein izotiyosiyanat
Gelucire® 50/13	: Yağ asitlerinin gliserol esterleri
HCl	: Hidroklorik asit
HRP	: <i>Horse radish peroksidase</i>
IC50	: % 50 inhibisyon konsantrasyonu
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
KLN	: Katı lipit nanoparçacık
Lipofectamin® 2000	: Piyasa ürünü katyonik lipozom
mA	: Miliamper

miRNA	: MikroRNA
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-(4, 5-Dimetil-2-tiyazolil-2, 5-difenil -2H tetrazolyum bromür
mV	: Milivolt
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
N/P	: Amin/fosfat oranı
Ort.	: Ortalama
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i> (Fosfat sodyum klorür tamponu)
pDNA	: Plazmit DNA
PEG	: Polietilen glikol
PEI	: Polietilenimin
PI	: Polidisperslik indisi
PLGA	: Polilaktik ko-glikolik asit
PMSF	: Fenil metan sülfonil florür
Precirol[®] ATO5	: Gliseril palmito-stearat
PVA	: Polivinil alkol
PVDF	: Polivinilidin Diflorür
RISC	: <i>RNA-Induced Silencing Complex</i> (RNA ilişkili susturma kompleksi)
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA intereferans
SDS	: Sodyum dodesil sülfat (Sodyum lauril sülfat)
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SH	: Standart hata
siRNA	: <i>Small interfering RNA</i> (Küçük susturucu RNA)
Span[®] 85	: Sorbitan trioleat
TBE	: Tris-borik asit EDTA

TE	: Tris/EDTA
TEM	: <i>Transmission Electron Microscopy</i> (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
TEMED	: Tetrametiletilediamin
TPP	: Tripolifosfat pentabazik
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
V	: Volt
µg	: mikrogram
µL	: mikrolitre
µS	: mikrosimens (elektrik iletkenliği)

Çalışmalarda kullanılan formülasyonların kısaltmaları

G0	: Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve oktadesilamin içermeyen Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
G1	: Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,0125 g/g oktadesilamin içeren Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
G2	: Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,125 g/g oktadesilamin içeren Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
G3	: Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,25 g/g oktadesilamin içeren Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
G4	: Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,5 g/g oktadesilamin içeren Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
G5	: Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,5 g/g oktadesilamin içeren Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu



- P0** : Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve oktadesilamin içermeyen Precirol® ATO5'in % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- P1** : Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,0125 g/g oktadesilamin içeren Precirol® ATO5'in % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- P2** : Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,125 g/g oktadesilamin içeren Precirol® ATO5'in % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- P3** : Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,25 g/g oktadesilamin içeren Precirol® ATO5'in % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- P4** : Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,5 g/g oktadesilamin içeren Precirol® ATO5'in % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- P5** : Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan ve % 0,5 g/g oktadesilamin içeren Precirol® ATO5'in % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- S1** : Sonikasyon ile hazırlanan ve oktadesilamin içermeyen Gelucire® 50/13 % 2'lik katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- S2** : Sonikasyon ile hazırlanan ve % 0,25 g/g oktadesilamin içeren Gelucire® 50/13'ün % 2'lik katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- S3** : Sonikasyon ile hazırlanan ve oktadesilamin içermeyen Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- S4** : Sonikasyon ile hazırlanan ve % 0,125 g/g oktadesilamin içeren Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- S5** : Sonikasyon ile hazırlanan ve % 0,25 g/g oktadesilamin içeren Gelucire® 50/13'ün % 4'lük katı lipit nanoparçacık formülasyonu
- K1** : 1K moleküler ağırlıklı polimerik Kitosan nanoparçacık formülasyonu
- K2** : 1K-3K moleküler ağırlıklı polimerik Kitosan nanoparçacık formülasyonu
- K3** : 3K-5K moleküler ağırlıklı polimerik Kitosan nanoparçacık formülasyonu
- K4** : 10K moleküler ağırlıklı polimerik Kitosan nanoparçacık formülasyonu

GİRİŞ

Son yıllardaki moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler nedeniyle genetik ve infeksiyon hastalıkları ile kanserin tedavisi ve önlenmesinde gen tedavisi çalışmaları umut vaatetmektedir (Stephens, 2003).

Günümüze kadar olan süreçte kanser ve viral hastalıkların tedavisinde kullanılan geleneksel ilaç kullanımı artık yerini gen terapiye bırakmaktadır. Bu tedavi şekli onarılmış genlerin hastaya verilmesini veya hasta genlerin onarılmasını amaçlamaktadır. Bu amaçla, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanlarındaki çalışmaların geliştirdiği pek çok teknoloji kullanılmaktadır. Bunlar arasında 'Antisens Teknolojisi' olarak adlandırılan teknoloji son yıllarda öne çıkmıştır.

Antisens teknolojisi, insan, hayvan ve bitkilerdeki hastalıkların keşfi ve daha spesifik tedavisinin yanında fonksiyonel genomik çalışmalar için oldukça donanımlı bir tekniktir. Bu yöntemde transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması söz konusudur. Antisens RNA molekülleri veya diğer bir deyişle RNAi (RNA interferans) gen susturma işlemini çift iplikçikli RNA'nın çekirdekten sitoplazmaya geçmesinin ardından homologu olan mesajcı RNA'ya bağlanıp yıkılmasına neden olarak gerçekleştirmektedir. Böylece oluşacak proteinin üretilmesi yani transkripsiyon ve translasyonun engellenmesi sağlanmaktadır. Bu teknolojiye yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğundaki siRNA (*small interference RNA*; küçük susturucu RNA) büyük rol oynamaktadır. siRNA, infeksiyon, solunum, nöral, otoimmün ve kanser gibi genetik kökeni olan hastalıkların oluşumunda etkin olan proteinlerin üretimini durdurmak için çekirdek ve protein üretim bölgeleri arasında genetik bilginin iletimini bloke etmektedir (Zhang ve ark., 2007).

Antisens teknolojisinde kullanılan siRNA'lar, sentetik olarak, plazmitlere klonlanarak hücrelere aktarımı ile veya virüsler içerisinde üretilmektedir (Takabatake ve ark., 2007). Bunların dışında kimyasal olarak modifiye siRNA'lar da son yıllarda çokça kullanılmaktadır (Gary ve ark., 2007).

siRNA memeli hücrelerine çeşitli uygulama yöntemleri ile verilmiştir; elektroporasyon, çekirdek veya sitoplazmaya enjeksiyon yöntemiyle hücrelere tek başına siRNA (Li ve ark., 2006) veya siRNA üreten plazmit ve virüsler ile gönderilebilmiştir (Takabatake ve ark., 2007).

Günümüzde sistemik kullanım için siRNA taşınması tartışmalı bir konudur. Yapılan gen terapi çalışmalarına göre siRNA'nın etkili olabilmesi için hedef hücre sitoplazmasına ulaşmasındaki ve susturmayı indüklemesindeki engeller henüz aşılanamıştır. Sistemik uygulamada çıplak siRNA'nın hücrenin lipid membranlarına penetre olamaması sonucu hücre içine alınmasının zayıf olması, serum içerisindeki endonükleazlarla çabuk parçalanmaya uğraması ve kısa yarı ömrü (~1 saat) nedeniyle gen susturma etkisi çok düşük oranda gerçekleşmiştir (Reischl ve Zimmer, 2009). siRNA'nın etkinliğini arttırmaya yönelik olarak şeker-fosfat omurgasında kimyasal modifikasyon [kilitli nükleik asitler (LNA), metil fosfonasyon, 2'floro-4'tio modifikasyonları, vb] yapılarak çift iplikli siRNA'nın serum içerisindeki kararlılığı arttırılmıştır. Enkapsüle edilmiş çıplak siRNA ile modifiye edilmiş siRNA'nın serum içindeki kararlılığı karşılaştırıldığında enkapsüle edilen siRNA'nın serum degradasyonuna daha

dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Gary ve ark., 2007). Bu nedenle siRNA'nın *in vivo* veya *in vitro* olarak hedef hücrelere aktarılması için viral (adenovirüs, retrovirüs, adeno-ilşkili virüs, vb) (Li ve ark., 2006; Gortbayuk ve ark., 2007) veya non-viral vektörler (katyonik lipit, lipozom, polimer) kullanılmıştır (Sioud ve Sørensen, 2003; Kataoka ve ark., 2005; Li ve ark., 2006).

Viral vektörlerin non-viral vektörlere göre daha yüksek transfeksiyon etki gösterdiği birçok hücrede kanıtlanmıştır, ancak viral vektörlerin mutasyon, rekombinasyon veya onkojenik etki yaratma olasılığı ve maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle non-viral vektörler üzerindeki çalışmalar artmıştır (Zhang ve ark., 2007).

Non-viral vektörler düşük immün cevap gösteren, sentez kolaylığı olan ve sınırsız büyüklükte gen materyali taşıyabilen sistemlerdir (Zhang ve ark., 2007). En çok araştırılan non-viral vektörlerin başında lipozomlar ve nanopartiküler sistemler gelmektedir. Bunlar genetik materyalin basit enkapsülasyonunu mümkün kılan, çoğunluğu katyonik özellik taşıyan ve hücre içine genetik materyalin taşınmasını sağlayabilen polimerik, lipidik ve peptit-protein yapılarıdır (Katas ve Alpar, 2006; Zhang ve ark., 2007).

Yapılan bu çalışmada siRNA'yı taşıyabilecek, biyolojik ortamda enzimatik degradasyona karşı koruyabilecek, hücre içerisine kolay aktarabilecek, toksik özelliği az olan, biyoparçalanabilir ve biyouyumlu lipidik ve polimerik yapıda taşıyıcı sistemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Oluşturulan sistemlerin kanser hücreleri ile etkileşiminin sağlanması ve antiapoptotik protein olan Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun baskılanması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda hazırlanan sistemlerin kanser oluşum aşaması, kötü prognoz önlenmesi ve kemoterapiye hassasiyetin artırılarak kanser hücrelerinin ölümlülüğünün sağlanması alanlarındaki bilimsel çalışmalara katkı sağlanacağı düşünülmüştür.

Bu çalışma kapsamında lipidik yapıda (Katı Lipit Nanopartikül- KLN) ve polimerik (kitosan) yapıda iki farklı sistem hazırlanması planlanmıştır.

Çalışmanın amacı:

- Katı lipit mikro- ve nanopartikül ve polimerik mikro- ve nanopartiküler sistemlerin hazırlanması,
- Sistemlere katyonik özellik kazandırılması veya var olan katyonik özelliğin artırılması,
- siRNA dizisinin hazırlanan sistemlere adsorpsiyon ve enkapsülasyon yetilerinin araştırılması,
- Sistemlerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi,
- Sistemlerin hastalıklı hücreler üzerindeki etkinliğinin araştırılmasıdır.

KAYNAK BİLGİSİ

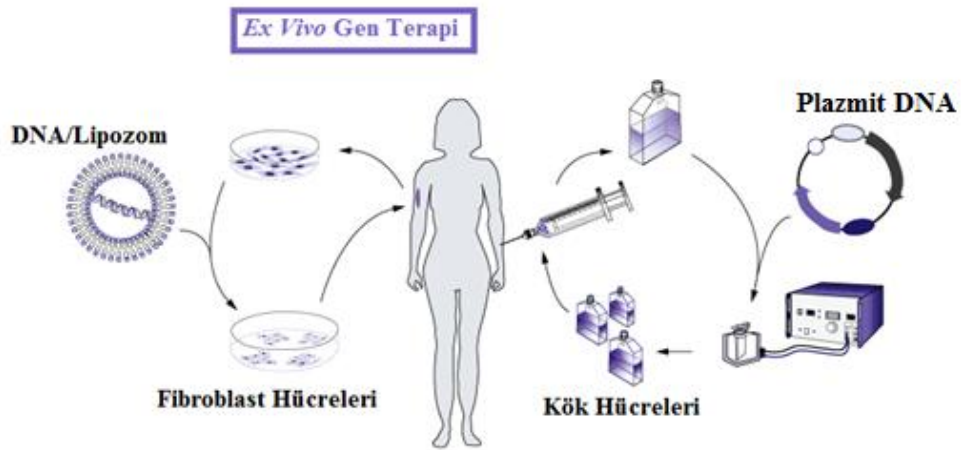
Gen Terapisi

Gen terapisi, terapötik etki oluşturmak için spesifik hücelere genetik materyalin transfer edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Zhao ve ark., 2009).

Modern tıptaki devrim olarak ilan edilen gen terapisi ile birçok kalıtsal veya sonradan kazanılan hastalıklarda hasarlı genlerin değiştirilmesi, kayıp genlerin yerine konulması veya istenmeyen gen ifadelerinin susturulması sonucu hastalık tedavisi son yıllarda yoğun çalışmalara yol açmıştır (Wonga ve ark.,2007; Mao ve ark., 2010).

1970’lerin başında ‘moleküler biyoloji’deki *Rekombinant DNA Teknolojisi* alanında yaşanan gelişmeler ile gen terapisine giden yolda ilk adımlar atılmış ve 1990 yılında Dr. W. French Anderson, Michael Blaese ve ark. tarafından adenoazin deaminaz eksikliği bulunan iki hastada retrovirüs ilişkili ilk gen tedavisi uygulanmıştır (Candotti ve Blaese, 1998). Uzun süren aşılama süreci sonunda bir hastada olumlu sonuçlar elde edilirken diğer hastada düşük transdüksiyon etkinliği elde edilmiştir.

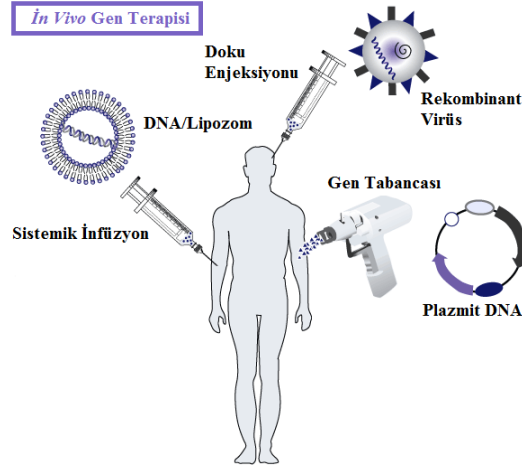
Gen tedavisi uygulamaları hedef doku bakımından somatik ve *germline* gen tedavisi olarak veya hastaya uygulama şekli açısından *ex vivo* ve *in vivo* gen tedavisi olarak ayrılmaktadır. *Ex vivo* gen tedavisinde etkilenmiş dokudan hücreler alınır ve bu hücelere laboratuvar ortamında genetik olarak düzgün olan gen transferi yapılır. Bu hücrelerin üremesi sağlandıktan sonra düzgün yapıdaki hücreler seçilerek hastaya tekrar aşılama veya transplantasyon yapılır. Hastanın kendi hücrelerinin kullanımı ile aşılama veya transplantasyon sonrası immünolojik etki görülmemektedir (Arora ve Kanta, 2007). Kemik iliği, deri ve karaciğer hücreleri bu tedavide kullanılan hedef dokular arasındadır (**Şekil 1**).



Şekil 1. *Ex vivo* gen terapisi (<http-1>)

In vivo gen tedavisinde (**Şekil 2**) ise iyileştirici genin vektörler (taşıyıcı sistemler) yardımıyla hasta hücreler dışına tam çıkarılmadan vücut içerisinde hastanın hücrelerine direkt aktarımı gerçekleştirilmeye çalışılır. Hedef hücreler arasında

kök hücre kaynakları (kemik iliği, fetus), deri, kas, karaciğer, akciğer, sinir, vb dokular bulunmaktadır (Jogdand, 2008).



Şekil 2. *In vivo* gen terapisi (<http-1>)

Bilinen gen terapi yöntemlerinin çoğu bir hücrenin fenotipini değiştirmek için fonksiyon kazandırılmasına odaklıdır. Son zamanlarda ise kullanılan biyoteknolojik genetik moleküller ile hücredeki nükleik asit fonksiyonunun inhibe edilmesine dayalı tedavi yöntemlerine ilgi artmıştır (Strachan ve Read, 1999).

Gen ekspresyonunun inhibisyonunu amaçlayan teknolojiler genellikle antisens moleküllerin kullanımı ile translasyonda kesinti yaparak veya mRNA'nın parçalanmasını sağlayarak genomik diziyi bozan çeşitli karmaşık genetik manipülasyonları içermektedir (Strachan ve Read, 1999; Caplen, 2004).

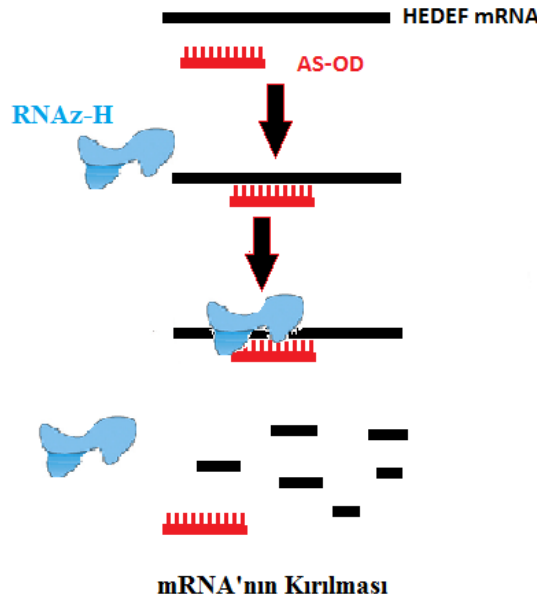
Bitkilerde ve mantarlarda post-transkripsiyonel gen susturulması (PTGS) ve memelilerdeki RNA interferans olarak bilinen yolların belirlenmesi ve karakterizasyonu gen ekspresyon azalmasına dayalı teknolojilerin geliştirilmesinde önemli yer oluşturmaktadır (Caplen, 2004).

Antisens Teknolojisi

İlk kez 1978'de Stephenson and Zamecnik tarafından hücre kültüründe viral replikasyonu durdurmak için kullanılan antisens oligonükleotit gen susturma kavramı daha sonra gen ekspresyonunu inhibe etmek amacıyla hedef mRNA'lardaki sekanslara komplementer oligodeoksinükleotitleri tanımlamak için kullanılmıştır. 18-25 nükleotit uzunluğundaki bu oligodeoksinükleotitler kendilerine komplementer mRNA dizilerine Watson-Crick baz çiftleşmesi kuralına göre hibridize olarak amaçlanan spesifik, kısa, tek sarmal DNA veya RNA dizileri kullanımıyla protein sentezini önler (Dallas ve Vlassov, 2006). Antisens oligonükleotitler, protein translasyonuna etki ederek hastalığa neden olan genlerin ekspresyonunu engelleyen yapılar olarak bilinir. Bu yapılar onkogenleri kontrol altına alabilmekte ve virüs DNA'sının çevrilmesini engelleyebilecek özelliktedir.

Sitomegalovirüs replikasyonunu antisens mekanizma ile inhibe eden fosforatyonat oligonükleotit olan *Vitraven*[®], 1998’de antisens teknoloji ile sitomegalovirüs retinitli AIDS hastalarında intravitreal enjeksiyonla uygulanan ilk ilaçtır (Holmlund, 2003; Aboul-Fadl, 2005).

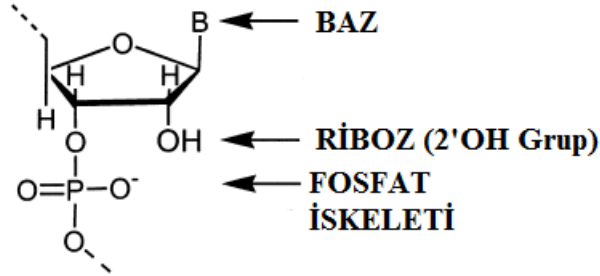
Antisens oligonükleotitler üç tipe ayrılmaktadır. Hepsinin de gen inhibisyonundaki ilk aşamaları benzerdir ve hücre içerisinde hedef RNA’ları bularak hibridize olurlar. Üç tipten ilki RNAz-H’ı aktive edenlerdir. Fosfodiester ve fosforatyonat grubu içeren bu oligonükleotitler hedeflerine bağlandıktan sonra hücrede RNAz-H enzimi tarafından tanınır. Böylece kompleksteki RNA iplikçliğini spesifik olarak keser ve sonuçta hedef mRNA kırılmış olur (**Şekil 3**). 1960’da Eckstein ve ark. tarafından ilk keşfedilen oligonükleotitlerdir ve ilk kez Matsukura ve ark. tarafından HIV replikasyonunun engellenmesinde kullanılmıştır (Kurreck, 2003). Bu gruptaki oligonükleotitler nükleazlara karşı dayanıklı olmaları ve serumda 9-10 saatlik yarı ömürleri ile üstünlük göstermelerine karşın belirli proteinlere bağlanabilmeleri ve hücre toksisitesine yol açmaları nedeniyle sakınca taşırlar (Kurreck, 2003).



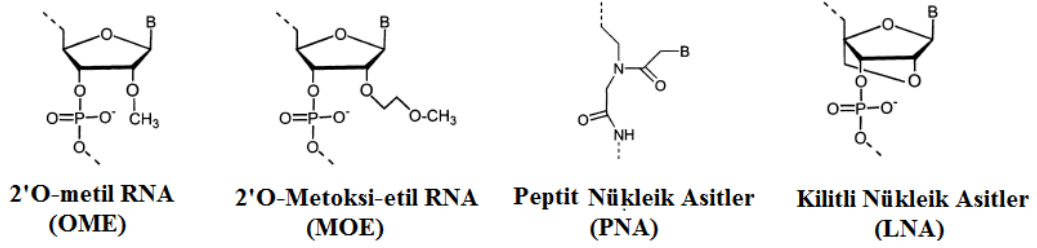
Şekil 3. RNAz-H ile mRNA’nın kırılması

İkinci tip modifiye oligonükleotitler, RNAz-H’ı aktive etmeden hedef RNA ile oluşturulan kompleksin yapısal engellenmesi ile translasyonu inhibe eder ve bazı modifiye nükleik asit çeşitlerini içerir. Bu tipte RNA’nın 2’(OH)-hidroksil grubu olan riboz modifiye edilmektedir (**Şekil 4**). Bu sınıf oligonükleotitler arasında 2’-O-metil (OMe) RNA, 2’-O-metoksi-etil (MOE) RNA, 2’-O-alil, kilitli nükleik asit (LNA) ve peptit nükleik asit (PNA) bulunmaktadır (**Şekil 5**) (Dias ve Stein, 2002; Kurreck, 2003). Bu mekanizmanın etkinliği, ilk kez, hücre içi adezyon molekülü 1’in (ICAM 1) 5’ ucu bölgesine hedeflendirilmiş 2’-O-metoksi-etil (MOE) RNA ile gösterilmiştir (Baker ve ark., 1997). *Alicaforsen*[®] Crohn hastalığı olarak bilinen

ileum iltihabı için 2009'da EMEA tarafından olumlu görüş almış bu tip antisens oligonükleottittir (http-2).



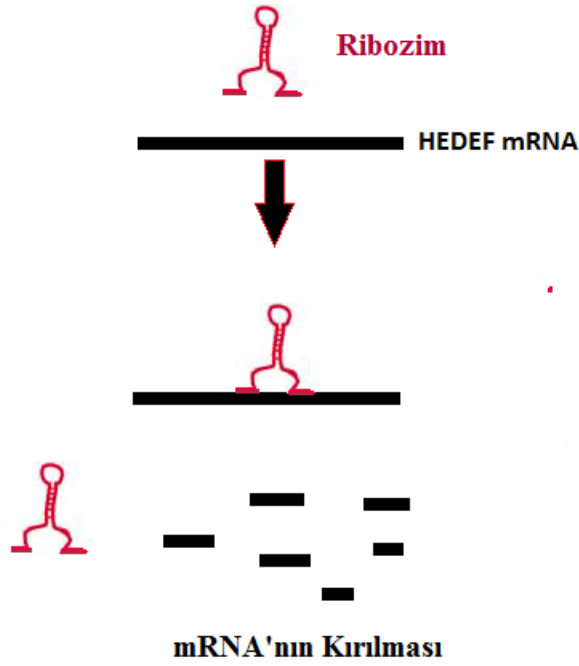
Şekil 4. Ribonükleotitlerin kimyasal modifikasyonu (Kurreck, 2003)



Şekil 5. İkinci tip antisens moleküller (Kurreck, 2003)

(B: Adenin, Guanin, Sitozin veya Timin bazlarından herhangi birini ifade etmektedir.)

Üçüncü sınıf modifiye oligonükleotit olan ribozimler aktif RNA enzimleridir (Reischl ve Zimmer, 2009). Bunlar hidroliz veya trans-esterifikasyon aracılığı ile RNA üzerindeki fosfodiester bağlarını kırarak hedefi parçalar (Şekil 6) (Kurreck, 2003; Dallas ve Vlassov, 2006). *Angiozyme*[®] vasküler endotelial büyüme faktörü 1 (VEGF 1) ilk ribozim ilaçtır. Böbrek kanserinde denenmiş ancak klinik çalışmaları devam etmemiştir (Weng ve ark., 2005).



Şekil 6. Ribozimler aracılığıyla mRNA kırılması

Antisens oligonükleotit çalışmaları son yıllarda gen susturma mekanizması için son derecede etkili yöntem olan RNA interferansın (RNAi) keşfedilmesine yol açmıştır (Dallas ve Vlassov, 2006; Gewirtz, 2007).

RNAi Mekanizması

RNAi (RNA interferans), çift iplikli RNA indüksiyonlu transkripsiyon sonrası diziye özgü gen susturma sürecidir. Bu süreç ilk kez 1998'de Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello isimli iki doktor tarafından *Caenorhabditis elegans* nematodunda gösterilmiş ve bu buluş 2006'da 'Fizyoloji veya Tıp' dalında Nobel Ödülü kazanmalarına yol açmıştır (Ross ve ark. 2007).

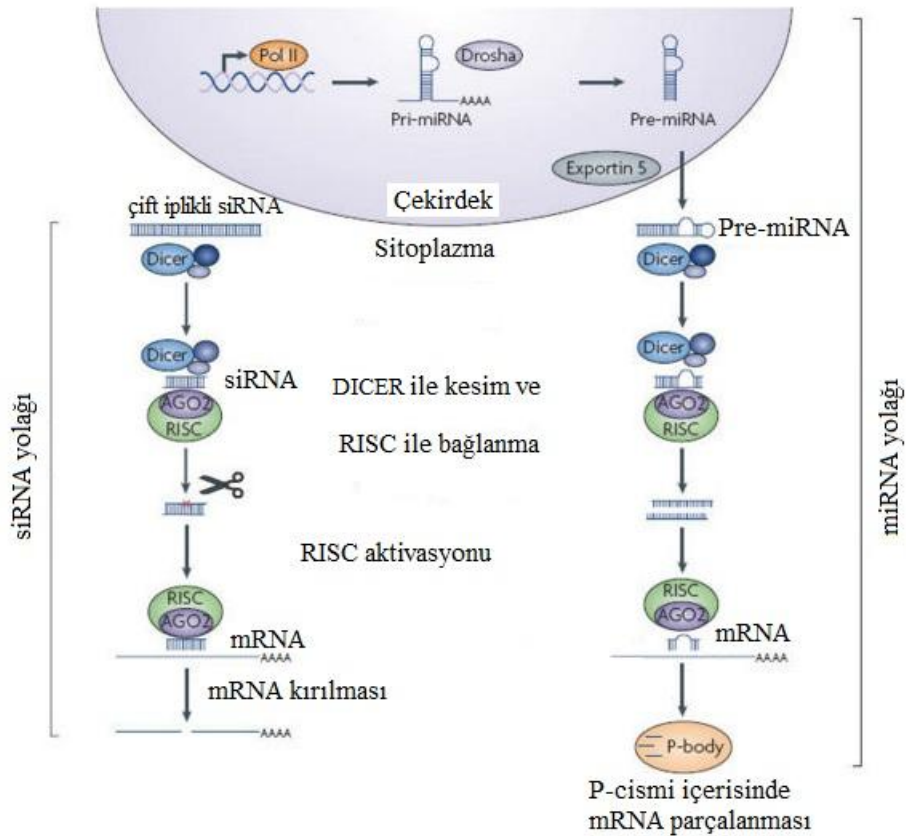
Memeli hücrelerinde ilk kez 2001'de Elbashir ve ark.'nın (2001) keşfettiği siRNA bugüne kadar kanser tedavisi, anjiyogenezin inhibe edilmesi, çeşitli onkogenlerin inhibisyonu, hücre-içi sinyal iletim sistem genlerinin inhibisyonu ile tümör gelişiminin durdurulması, apoptozun indüklenmesi ve radyo veya kemo hassaslığının arttırılması çalışmalarında kullanılmıştır (Tseng, 2009).

Normal veya mutant genler ile normal olmayan ekspresyonlar, sinyal yollarındaki değişimler, hücrel çoğalma ve apoptoz gibi patolojik durumlarla ortaya çıkmaktadır. RNAi ile transkripsiyon sonrasında gen düzenlemeleri olumlu veya olumsuz yönde kontrol edilmektedir. Ayrıca gen fonksiyonlarının *in vitro* olarak analizinde de kullanılmaktadır (Iorns, 2007; Martin ve Caplen, 2007). Yapılan çalışmalarda RNAi'nin transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinde olduğu gibi mikroorganizma enfeksiyonuna karşı cevap geliştirmede de önemli role sahip olduğu bulunmuştur (McManus ve Sharp, 2002; Carthew ve Sontheimer, 2009).

Günümüzde RNAi ile yapılan çalışmalarda öne çıkanlar gen susturucu molekül olarak bilinen 21-23 nükleotitlik siRNA ve miRNA'dır (Tang, 2005; Templeton, 2009). Protein kodlamayan bu küçük RNA'lar gen ifadesinin negatif düzenleyicisi

olarak görev yaparak gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptoz gibi önemli biyolojik süreçlerde rol alır (Leung ve Whittaker, 2005; Stefani ve Slack, 2008). Protein kodlamayan iki tür RNA'nın sentez ve olgunlaşma süreçleri ortak aşamalardan geçer ancak aralarında bazı farklılıklar vardır (Tang, 2005; Templeton, 2009). siRNA'lar ökaryotik organizmalarda ve memelilerde bulunurken, miRNA'lar yalnızca memelilerde bulunmaktadır (Ashihara, 2010). siRNA'lar sentetik endojen moleküllerdir ve hedef dizileri ile mükemmel eşleşme gösterir, ancak miRNA'lar genom kaynaklıdır ve tam eşleşme yapamayan endojen moleküllerdir. Bir diğer fark ise siRNA'ların türemesi uzun çift iplikli RNA'dan iken miRNA'ların türemesinin saç tokası şeklinde kıvrılıp eşleşmiş genomdan kodlanan pri-miRNA'dan olmasıdır (Ross ve ark. 2007; Carthew ve Sontheimer, 2009).

RNAi'ye yol açan siRNA'nın sentezlenme mekanizması çift iplikli RNA'nın RNA polimeraz III enzimi (DICER) ile kırılması ile başlamaktadır. Oluşan siRNA Ago2 ve RNA ile indüklenen susturum bileşimine [RNA-induced silencing complex (RISC)] bağlanır. RISC, yapısında yalnızca antisens iplikçisini bulunduran RNA ve RNA bağlayan proteinlerce zengin bir bileşimdir ve bu aşamada siRNA seçiciliğinden yapının içindeki Ago2 proteini sorumludur. RISC hedef mRNA'ya bağlandığında Ago2 anlamlı iplikçiyi ayırarak fosfodiester bağlarını kırar. Anlamlı iplikçik savunmasız şekilde kaldığı için siRNA ile eşleşme bölgelerinden endonükleaz ile kesilerek hızlıca parçalanır (Şekil 7) (Ross ve ark. 2007; Carthew ve Sontheimer, 2009; Templeton, 2009; Ashihara, 2010).



Şekil 7. miRNA ve siRNA yolları (Kataoka ve ark., 2005)

miRNA sentezi endojen olarak primer miRNA'nın (pri-miRNA) RNA polimeraz II tarafından genomdan kodlanmasıyla başlar. Daha sonra bu yapının RNA polimeraz III enzimi ile zincirdeki kuyruk kısmı koparılır ve prekürsör miRNA (pre-miRNA) oluşur. Pre-miRNA Ekspresin 5 molekülü yardımıyla çekirdek zarından sitoplazmaya geçer ve miRNA'yı RISC/Ago2 kompleksine götürecektir olan DICER'e bağlanır. DICER enzimi pre-miRNA'nın baştaki halka bölgesini koparır. RISC/Ago2 kompleksine kısmen bağlanan miRNA iplikçisi mRNA'daki 3'UTR (3' transkripsiyonu olmayan bölge) ile etkileşir ve transkripsiyon başlangıç faktörlerinin mRNA'ya bağlanmasını engeller. miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması aynı zamanda P-cisimciği denilen bir yapı içerisinde de hedef mRNA'nın parçalanmasına neden olur (**Şekil 7**) (Liu ve ark., 2005; Ross ve ark. 2007; Carthew ve Sontheimer, 2009; Templeton, 2009).

RNAi'nin Hücre İçine Taşınmasında Kullanılan Vektörler

Son dönemlerde RNAi teknolojisi ile yapılan gen tedavi çalışmalarından elde edilen sonuçlar daha önce yapılmış gen tedavi çalışmaları ile karşılaştırıldığında daha başarılı bulunmuştur. siRNA'nın etkinliğinin kanıtlanması ile hücre içine en kolay ve güvenli yoldan aktarılması için farklı taşıyıcı sistemlerin (vektörlerin) geliştirilmesi yönünde çalışmalar artmıştır (Wilson, 2005).

Gen aktarım sisteminde kullanılan vektörler, viral ve viral olmayan sistemler olarak iki kısma ayrılmaktadır (Groves, 2006).

Viral Vektörler

Viral vektörler gen tedavisi araştırmalarında kullanılan ilk vektör grubudur ve birçok virüs genomlarını memeli hücrelerine etkin şekilde aktarma yeteneğine sahiptir. Retrovirüs, adenovirüs, lentivirüs ve adeno-ilişkili virüsler viral sistemler olarak etkin şekilde kullanılmalarına rağmen klinik uygulamalarında bazı sorunlar bulunmaktadır (Grimm ve Kay, 2007; Merten ve al-Rubeai, 2011).

Gen aktarımı hedeflenen birçok hücre tipi düşünüldüğünde, viral olmayan lipit taşıma sistemlerinin her zaman etkin transfeksiyon sağlayamaması nedeniyle RNAi dizisinin viral vektörler ile taşınması lipit transfeksiyonuna güçlü alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Viral taşıma, transfeksiyonun güç olduğu primer veya bölünmeyen hücre tiplerinde en uygun sistemlerdir (Reischl ve Zimmer, 2009).

Retrovirüsler

RNA genomlarının DNA kopyasını ters transkriptaz enzimleri ile sentezleyerek konakçı hücrenin DNA'sına entegre olan retrovirüsler viral vektörlerin prototipleridir. 7-11 kb'lık diploid RNA genomuna sahip düzensiz küresel virüslerdir. Retrovirüsler en fazla 9 kb'lık yabancı genetik materyali taşıyabilecek kapasitededir (Groves, 2006).

En fazla kullanılan retroviral vektör mürin lösemi virüs (MLV) kökenlidir (Templeton, 2009). İnsan gen tedavisinde ilk kez adenosin deaminaz (ADA) eksikliğini düzeltmek için uygulanmıştır. Hastadan elde edilen beyaz kan hücreleri, ADA ve neomisin işaretleyici, gen eksprese eden MLV ilişkili vektör ile *ex vivo* olarak enfekte edilmiştir (Candotti ve Blaese, 1998).

Ling ve ark. (2007) hemotopoetik neoplazif lösemilerde aşırı eksprese olan embriyonik gelişim geni [*Embryonic Development Associated Gene (EDAG)*] için

kullandıkları siRNA'nın EDAG ekspresyonunu belirgin bir şekilde susturduğunu HEL (*Human Erythroleukemia*) hücrelerinde göstermişlerdir. Retrovirüs ilişkili siRNA ile EDAG ekspresyonunun susturulması sonucu tümör büyümesi ve hücre çoğalması etkin olarak inhibe edilmiştir.

Retrovirüslerle gen tedavisinde gerçek başarının sağlanabilmesi için sayısız sorunun çözülmesi gerekmektedir. Retrovirüs kullanımının en önemli sakıncası *in vivo* gen ifadesinin zayıf olmasıdır. Ayrıca düşük viral titrasyon elde edildiği için gen ifadesinin tedavi edici düzeye ulaşmasında sorun çıkmaktadır. Retrovirüsler hücre membranından geçemedikleri için yalnızca bölünen hücrelere entegre olabildiğinden kök hücrelerdeki kullanımları kısıtlanmaktadır. Retrovirüsler konakçıda immün tepkiye yol açmamakla birlikte, immün sistem tarafından hızla yıkılmaları nedeniyle *in vivo* gen transferinde sakınca oluşturmaktadır (Groves, 2006; Templeton, 2009).

Lentivirüsler

Gen tedavisinde kullanılan lentivirüs vektörlerin birçoğu insan immünodefans virüsü [*Human Immunodeficiency Virus (HIV)*] ile ilişkilidir. HIV vektörlerinin MLV ilişkili vektörlere göre üstünlüğü bölünmeyen hücrelere de enfekte olabilmeleri ve genleri *in vivo* olarak aktarabilmeleridir (Kafri ve ark., 1997; Merten ve al-Rubeai, 2011). HIV vektörleri aynı zamanda genleri karaciğer ve kas hücrelerine enjeksiyon bölgesinde enflamasyon olmaksızın doğrudan taşıyabilirler (Kafri ve ark., 1997).

Lentivirüs ilişkili RNAi insan hepatoma hücrelerinde EZH2 ekspresyonunu inhibe etmek için kullanılmıştır (Chen ve ark., 2007). Yapılan çalışmada hepatosellüler karsinoma hücrelerindeki EZH2'nin baskılanması ile tümör büyüme oranının azaldığı *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir.

İlk klinik çalışması 2002 yılında denenen lentivirüs vektörler gen tedavisinde MLV'lere göre daha çok ilgi görmektedir ancak klinik çalışmalar güvenlik ve etik konularında endişeleri arttırmaktadır (Merten ve al-Rubeai, 2011). Vektör üretimi süresince lentivirüs replikasyon bileşeninin oluşma olasılığı, hasta genomunda vektörün endojen retrovirüslerle bloke edilebilmesi, kansere neden olan insersiyonel mutagenез, hastalarda virüslerin yayılması gibi dezavantajlar bu virüslerin kullanımını sınırlandırmaktadır (Groves, 2006; Templeton, 2009).

Adenovirüsler

Adenovirüsler kılıfsız, çift sarmal DNA virüsleri olup genomları 36 kb'dır. Hücre yüzey reseptörüne yüksek afiniteyle bağlanabilme ve 7.5 kb'a kadar genetik materyal taşıyabilme özelliğine sahiptir (Merten ve al-Rubeai, 2011). Viral vektörler arasında en yüksek titrasyon oluşturabilen gruptur.

Adenoviral vektörlerin ilk gen transferi çalışması kistik fibroz tedavisinde akciğer dokusuna afiniteleri nedeniyle gerçekleşmiştir (Griesenbach ve ark. 2010). Genetik materyali bölünmeyen hücrelere taşıma yetenekleri nedeniyle ailesel hiperkolesterolemide ve nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklarda kullanılmaları amacıyla çalışmalar sürdürülmektedir. Bunun yanı sıra kanser hücreleri gibi epitelyal hücreleri kolayca enfekte edebilme yeteneğinden dolayı kanser tedavilerinin çoğunluğunda (yaklaşık % 25'i) adenovirüs vektörleri kullanılmaktadır (Templeton, 2009; Merten ve al-Rubeai, 2011).

Tandem tipi siRNA barındıran adenoviral vektör kullanan Uchida ve ark. (2004) antiapoptotik gen olan survivin'in ekspresyonu üzerine çalışmışlar ve çalışma sonucunda adenovirüs/siRNA'nın intratümöral enjeksiyonunun U251 glioma hücrelerinde tümör büyümesini baskıladığını rapor etmişlerdir.

Adenovirüslerin genetik materyalleri konakçı hücre genomuna entegre olmazlar; DNA molekülü konakçı hücrede serbest kalır ve burada diğer genler gibi kopyalanır. Kopyalanan genler hücre bölünmeye gittiği zaman diğer hücrelere geçemediklerinden adenovirüs uygulaması tekrarlamayı gerektirir (NIH Report, 2002).

Adenoviral vektörlere ait en önemli kısıtlama immünojeniteleri nedeniyle konakçıda non-spesifik enflamasyon ve spesifik hücresel cevap oluşturmalarıdır. Aynı zamanda toksik tepkilere de yol açabilirler. Bu sorunları çözmek üzere vektör üretme çalışmaları sorumlu E2 geni çıkarılarak yapılmaktadır (Ghosh ve ark., 2006).

Adeno-ilişkili Virüsler

Adeno-ilişkili virüsler insanlarda patojenik olmayan parvovirüslerdir. Gen tedavisinde sıkça kullanılan en küçük virüstür. Küçük olduğu için normalde bile çoğalmak için yardımcı virüs genomuna gereksinim duyar ve dolayısıyla taşıyabileceği genetik materyal küçüktür (4kb). Bölünmeyen hücrelere genomu entegre edebilmektedir. İnsanlarda herhangi bir hastalıkla ilişkili değildir (Templeton, 2009).

2007'de Gortbayuk ve ark. (2007) alel bağımlı otozomal dominant *retinitis pigmentosa*'da adeno-ilişkili virüs taşıyıcılı siRNA ile rodopsin ekspresyonunun inhibe edildiğini *in vivo* olarak göstermiştir.

Adeno-ilişkili virüs vektörler ciddi enflamatuvar cevap oluşturmadığı için diğer vektörlere göre daha güvenilirdir. Ayrıca sahip olduğu farklı serotipler nedeniyle *in vivo* olarak çeşitli doku ve hücrelere toksik etki göstermeksizin uyum sağlayabilme ve ekspresyon yapabilme özelliğine sahiptir (Groves, 2006). Adeno-ilişkili vektörlerin yukarıda söz edilen avantajlarına karşın, zaman içinde ekspresyonun düşmesi, vektörleri nötralize edici antikorların varlığı, büyük ölçekte üretilme ve ambalaj haline getirilme güçlüğü ve konakçı hücre genomu ile rastgele birleşmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Aalbers ve ark., 2011).

Viral Olmayan Vektörler

Viral vektörler ile çalışmalarda büyük gelişmeler olmasına rağmen bugüne kadar gen tedavisinde çok az başarı sağlanabilmiştir. Viral vektörlerin klinik kullanımında kısa süreli transgen ekspresyonu ve konakçı hücrede yetersizlik ve toksisite gibi önemli problemler görülmüştür. Adenovirüs vektörlerin doğrudan hepatik arter içine enjeksiyonu 1999'da bir hastanın ölümüne neden olmuştur (Hunter, 2006). Ayrıca bu vektörlerin intravasküler koagülasyona, akut solunum hastalıklarına ve çoklu organ iflaslarına neden olduğu enflamatuvar sitokin profil analizi ile gösterilmiştir (Itakaa ve Kataoka, 2009). Yukarıdaki bulguların sonucu olarak gen aktarımı için viral olmayan vektörlere ihtiyaç ortaya çıkmıştır.

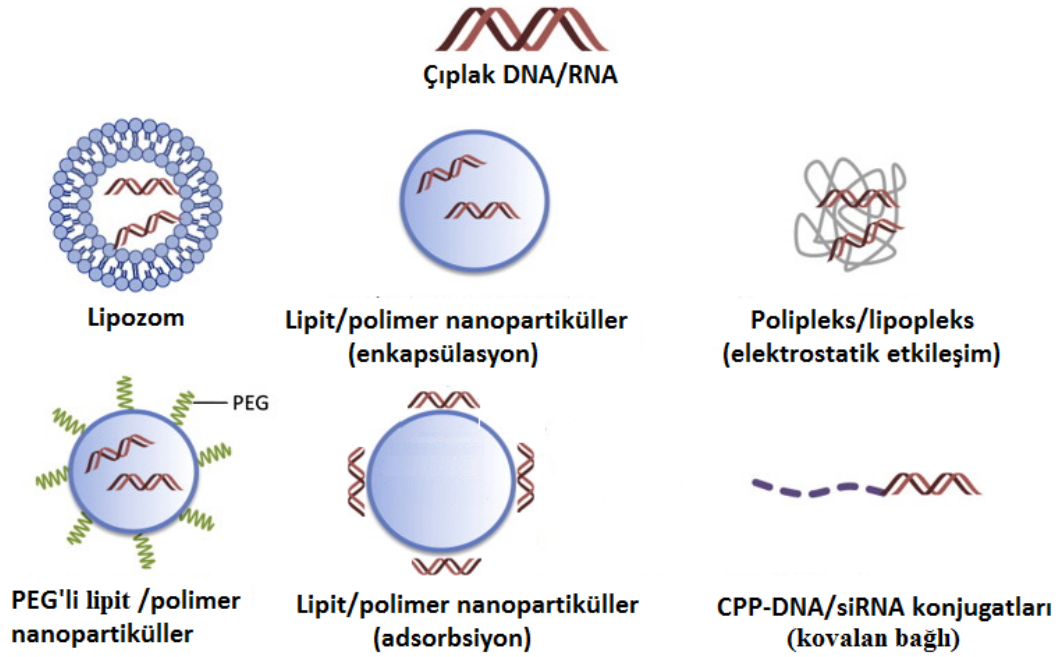
Viral olmayan vektörler kolay sentez edilebilme, hücre/dokuya hedeflendirilebilme, düşük immün cevap ve sınırsız büyüklükte plazmit

taşıyabilme gibi öne çıkan özellikleriyle son yıllarda viral vektörlere tercih edilmektedir (Zhao ve ark., 2009; Wang ve ark., 2012).

En çok araştırılan viral olmayan vektörler, genetik materyalin basit enkapsülasyonu ile genetik materyali hücre içine taşıyabilen çoğu katyonik özellikte polimerik, lipidik ve peptit-protein yapıda taşıyıcı sistemlerdir (Zhang ve ark., 2007; Katas ve Alpar, 2006; Wang ve ark., 2012; Lam ve ark., 2012).

Viral olmayan sistemlerin genellikle katyonik özellikte olmasının nedeni negatif yüklü genetik materyal ile elektrostatik olarak etkileşmesidir. Etkileşimden sonra ortaya çıkan partikülün pozitif net yükü negatif yüklü hücre membranı ile güçlü etkileşim sağlar ve endositoz yolu ile hücre içerisine geçişi kolaylaştırır (Uddin, 2007).

DNA/siRNA aktarımında yaygın olarak kullanılan viral olmayan vektörler **Şekil 8**'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 8. DNA/siRNA aktarımında yaygın olarak kullanılan viral olmayan vektörlerin şematik gösterimi (Lam ve ark., 2012)

Çıplak siRNA

Çıplak siRNA veya formüle edilmemiş siRNA terimi herhangi bir vektör ajanı kullanmaksızın siRNA aktarımını ifade etmektedir. Bu aktarımda siRNA'nın tuz şeklinde veya % 5'lik dekstroza gibi basit ekşiyanlarla uygulanması söz konudur (Lam ve ark., 2012). Herhangi bir modifikasyon yapılmamış siRNA nükleazlara karşı çok hassastır ve plazmadaki yarı ömürleri yalnızca birkaç dakikadır (Templeton, 2009). Bu nedenle serumdaki kararlılığı, seçiciliği ve belli oranda gücü arttırmak ve ayrıca immün cevabı ve yanlış eşleşmeleri azaltmak için

siRNA'lar kimyasal olarak modifiye edilmektedir (Watts ve ark., 2008). Modifikasyonlar arasında başlıcaları şeker yapısındaki değişimler, fosfat bağlantı modifikasyonları ve baz modifikasyonlarıdır (Watts ve ark., 2008; Lam ve ark., 2012).

siRNA'nın gen susturma etkisi çıplak şekilde sistemik uygulaması ile genellikle başarısız olmuştur (Ge ve ark., 2004; Urban-Klein ve ark., 2005). Ancak modifiye edilmemiş siRNA'nın akciğere lokal uygulamasında bazen beklenenden yüksek başarılar da elde edilmiştir (Fulton ve ark., 2009; Rosas-Taraco ve ark., 2009; Gutbier ve ark., 2010).

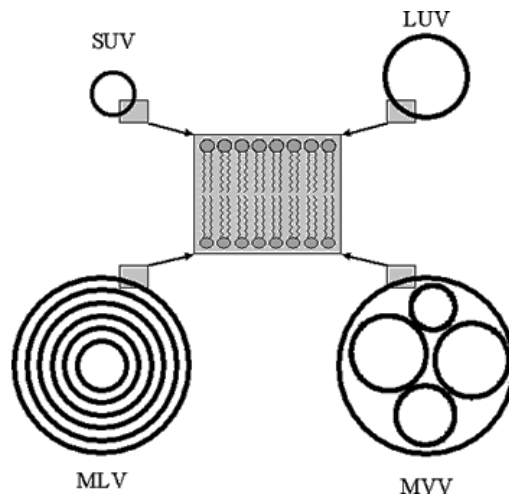
Enkapsüle edilmiş çıplak siRNA'nın kararlılığı ile çıplak siRNA'nın serum içindeki kararlılığı karşılaştırıldığında enkapsüle edilen siRNA'nın serum degradasyonuna daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Gary ve ark., 2007). Bu nedenle siRNA'nın *in vivo* veya *in vitro* olarak hedef hücelere aktarılması için viral (adenovirüs, retrovirüs, adeno-ilişkili virüs, vb) (Li ve ark., 2006; Gortbayuk ve ark., 2007) veya non-viral vektörler (katyonik lipit, lipozom, polimer) kullanılmıştır (Sioud ve Sørensen, 2003; Kataoka ve ark., 2005; Li ve ark., 2006).

Lipit Bağımlı Taşıyıcı Vektörler

Lipozomlar

Lipozomlar toksik olmayan, doğal/sentetik fosfolipit ve kolesterolden üretilen, küçük küresel şekilli yapay veziküllerdir. Terapötik molekül veya gen içeren bir çekirdeği çevreleyen lipit kabuktan oluşan submikron ölçekteki veziküllerin hücre membranı ve lipit tabakalardan sorunsuz geçebilme özellikleri nedeniyle gen tedavi aracı olarak kullanım çalışmaları oldukça yaygındır (Gortbayuk ve ark., 2007; Sahoo ve ark., 2007).

Katman sayılarına ve büyüklüklerine bağlı olarak, çok katlı veziküller (MLV), büyük tek katlı veziküller (LUV), küçük tek katlı veziküller (SUV) ve çok veziküllü veziküller (MVV) olarak adlandırılırlar (**Şekil 9**) (Gürsoy, 2002; Vergaro ve ark., 2011).



Şekil 9. Lipozom çeşitleri (<http-3>)

Yüksek molekül ağırlığındaki nükleik asitler ilk kez 1970'lerin sonunda nötral lipitler içerisine hapsedilmiştir. Daha sonra 1987'de hücre içerisine plazmit DNA'nın gönderilmesinde ilk kez 'lipopleks' olarak adlandırılan katyonik lipozomlar kullanılmıştır (Felgner ve ark., 1987; Dass, 2004). Nükleik asitlerin katyonik lipozomlar içerisine enkapsülasyonu nükleik asitler ile lipit katmanlar arasındaki iletişimi arttırarak daha fazla oranda DNA yüklenmesine yol açmıştır (Dass, 2004).

Genetik materyali enzimlerden koruyarak taşıma özellikleri ile gen tedavisi için uygun taşıyıcılar olarak tanımlanan lipozomların raf ömürleri fiziksel ve kimyasal kararlılığın düşük olması nedeniyle kısadır. Fiziksel dayanıksızlık lipozomdan kontrolsüz madde salımına veya agregat oluşmasına neden olabilmektedir. Kimyasal dayanıksızlık ise lipitlerdeki çifte bağın oksidasyonundan veya ester bağı hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Lipozomlar ısıya hassas oldukları için genellikle en uygun sterilizasyon yöntemi aseptik ortamda filtrasyondur. Yukarıda sayılan etmenler lipozomların büyük çapta üretimini güçleştirmektedir. Ayrıca, düşük ilaç yükleme kapasitesine sahip olmaları üretim sırasında serilerarası farklılıkların oluşmasına da neden olabilmektedir (Gürsoy, 2002; Vergaro ve ark., 2011).

Nötral lipitler

Gen taşıyıcı sistemlerin hazırlanması sırasında kullanılan lipit (özellikle katyonik) ile ilişkili toksisiteyi ve enflamatuvar cevabı önlemek için nötral lipitler kullanılmıştır. Sıkça kullanılan üç nötral lipit dioleil fosfatidiletanolamin (DOPE), kolesterol ve dioleil fosfatidilkolin'dir (DOPC) (Zhang ve ark., 2004).

Çok güvenli sayılan nötral lipitlerin negatif yüklü genetik materyalle zayıf elektrostatik etkileşimi taşıyıcı sistem olarak kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu sınırlama, genetik materyalin lipite konjugasyon ile bağlanması veya genetik materyalin (siRNA'nın) kimyasal modifikasyonu ile ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır (Soutschek ve ark., 2004). Dolayısıyla nötral lipitler formülasyonlarda genellikle yardımcı lipit olarak kullanılmaktadır (Yoo ve ark., 2004).

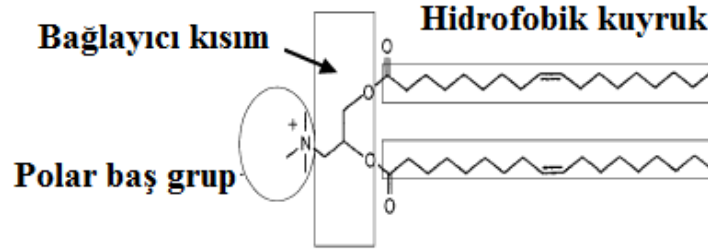
siRNA bağlı lipit sistemler hücreye genellikle endositoz yolu ile alınır (Morille ve ark., 2008; Winkler, 2011). Yapılan çalışmalar, lipozomlarla birlikte kullanılan DOPE nötral lipidinin hücre membranına füzyonu kolaylaştırdığını ve plazma membranının ve endozomun kararlılığının bozulmasına yardımcı olduğunu göstermiştir (Zhang ve ark., 2004; Maitani ve ark., 2007). DOPE, kolesterol gibi yardımcı nötral lipitlerin kullanımı ile *in vivo* transfeksiyon düzeylerinin arttığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Zhdanov ve ark., 2002; Even-Chen ve ark., 2012). Kolesterol eklenmiş lipozomların çok sayıda doku üzerindeki transfeksiyonunun DOPE'ye oranla daha etkin olduğu belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2004; Even-Chen ve ark., 2012).

Katyonik lipitler

Katyonik lipitler net pozitif yüke sahiptir. Bu özellik hem polianyonik nükleik asitlerle etkileşimlerinde hem de negatif yüklü hücre membranlarına tutunabilmeleri açısından büyük fayda sağlamaktadır (David ve ark., 2010).

Formülasyon için kullanılan katyonik lipitlerde başlıca 3 bölge bulunmaktadır (Şekil 10). Bunlar:

- Pozitif yüklü baş grup
- Hidrofobik kuyruk
- Bağlayıcı kısım



Şekil 10. Katyonik lipitlerin yapısı (Dass, 2004)

Polar ve apolar kısımları birarada tutan bağlayıcı kısım, ester, eter veya karbamat ve amit bağlarından oluşmaktadır. Bağlayıcı kısım genetik materyalin negatif yüklü fosfatları ile pozitif grup arasındaki bağlanmayı sağlamlaştırmada önemlidir. Polar baş bölgesi guanidin, poliamino bileşenleri, poliamidoamin ve piridinyum içerir; hidrofobik bölgeler ise alifatik zincirlerden veya kolesterol türevlerinden oluşur. Katyonik lipitlerdeki baş, kuyruk ve hidrofobik bölgeler toksisite ve transfeksiyonda önemli rol oynar (Dass, 2004). Yapılan çalışmalarda, baş gruptaki amin grubu yerine arsenik veya fosfor kullanımının (Floch ve ark., 2000), hidrofobik bölgede bulunan alifatik zincirdeki asimetrisinin (Balasubramaniam ve ark., 1996) ve bağlayıcı kısımda da eter bağlarının bulunmasının (Ghosh ve ark., 2000) transfeksiyonu arttırdığı hücre kültüründe gösterilmiştir.

Yapısında eter bağları bulunan ilk katyonik lipit (+)-N,N,N-trimetil-2,3-bis(z-oktadek-9-eniloksi)-1-propanaminyum klorür (DOTMA) 1987’de tanımlanmıştır. Bu çalışma ile genetik materyalin taşınmasında katyonik lipitlerin kullanılmasına ilk adım atılmıştır (Zhang ve ark., 2004). Bugüne kadar tek veya çok değerlikli yapıda olan, kolesterol türevi veya guanidin içeren bileşiklerden oluşan sayısız katyonik lipit sentezlenmiştir (Dal-Maso ve ark., 2008).

1,2-diöleol trimetil amonyum propan klorür (DOTAP) lipozom formülasyonlarında kullanılan başlıca katyonik lipittir. Yapısında bağlayıcı kısım olarak ester bağları bulundurmaktadır. DOTAP tek başına veya DOPE, kolesterol gibi yardımcı nötral lipit ile birlikte nükleik asitleri kondanse eder (Pedroso de Lima ve ark., 2001).

DOTMA ve DOTAP gibi tek değerlikli katyonik lipitlerin yanısıra tanımlanan çok değerlikli katyonik lipitler arasında dioktadesil amidoglisil spermin (DOGS), (+)-N,N-dimetil-N-[2-(sperminkarboksamido)etil]-2,3-bis(diöleilloksi)-1-propan iminyum pentahidroklörür (DOSPA) ve dipalmitoil fosfatidiletanol amidoespermin (DPPES) yer almaktadır (Zhang ve ark., 2004; Dal-Maso ve ark.,

2008). Çok değerlikli katyonik lipidlerin tek değerlikli olanlara göre genetik materyali daha etkin olarak kondanse ettikleri yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Pedroso de Lima ve ark., 2001).

DOTMA (Lipofectin®), DOSPA (Lipofectamine®), DOTAP, Dc-Chol veya DOGS (Transfectam®) günümüzde yaygın olarak kullanılan ticari katyonik lipidlerdir (Dal-Maso ve ark., 2008).

Katı Lipit Nanopartiküller (KLN)

Katı lipid nanopartiküller 1990'ların başlarında emülsiyon, lipozom ve polimerik sistem gibi geleneksel taşıyıcı sistemlere alternatif olarak sunulmuştur (Gürsoy, 2002; Souto ve ark., 2004). KLN, oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipidler ile hazırlanan ve yüzey etkin maddelerle kararlı hale getirilebilen nanometre boyuttaki parçacıklardır.

Nanopartikül hazırlamak için kullanılan lipidler GRAS (*Generally Recognized As Safe*) özelliğine sahip biyoyumlu bileşiklerdir. Katı lipid olarak trigliserit (tristearin, vb), yağ asitleri (stearik asit, vb), steroid (kolesterol vb) ve mumlar (setil palmitat vb) kullanılabilir (Demirel ve Yazan, 2000; Mehnert ve Mäder, 2001; Mozafari, 2006; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006). Lipit dispersiyonunu kararlı kılmak için yüklerine ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak çeşitli yüzey etkin madde tipleri eklenebilir. Kararlılığın sağlanabilmesi için % 1-5 yüzey etkin madde veya yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde karışımı kullanılmaktadır (Mehnert ve Mäder, 2001; Mozafari, 2006). Yüzey etkin madde seçimi ve konsantrasyonu seçilen lipite ve uygulama yoluna bağlıdır. Örneğin, parenteral uygulamalarda kullanılan yüzey etkin maddeler dermal veya oral uygulamalara göre daha sınırlıdır (Demirel ve Yazan, 2000; Mozafari, 2006; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006).

KLN'in avantajları;

- İlaç salımının kontrollü yapılabilmesi,
- Hedeflendirme yapılabilmesi,
- Fizyolojik lipidlerden oluşması,
- Akut ve kronik toksisitesinin düşük olması,
- Farmasötik dozajların kararlılığını arttırabilmesi,
- İlaç içeriğinin yüksek ve arttırılabilir olması,
- Geniş uygulama alanına sahip olması (dermal, rektal, oftalmik, intravenöz),
- Hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçları taşıyabilme yeteneği,
- Mükemmel derecede biyoyumlu olması,
- Küçük parçacık boyutu, geniş yüzey alanı,
- Farmasötik, nütresötik ve diğer maddelerin performansını arttırabilmeleri,
- Organik çözücüye ihtiyaç göstermemesi,
- Büyük çapta üretilebilmeleri,
- Sterilize edilebilmeleri (otoklav, filtrasyon, aseptik ortamda sterilizasyon),

Ekonomik olması,

KLN'in dezavantajları;

Parçacık boyutunun zamanla büyümesi,

Jelleşme eğiliminin olması,

Saklama süresince polimorfik geçişler nedeniyle ilaç sızıntısı,

Kristal yapısı nedeniyle zayıf ilaç yüklemesidir (Gasco, 1993; Demirel ve Yazan, 2000; Demirel ve ark., 2001; Gürsoy 2002; Mozafari, 2006; Üner ve Yener, 2007).

KLN Hazırlama Yöntemleri

KLN'ler yüksek basınçlı homojenizasyon (sıcak veya soğuk), mikroemülsiyon, çözücü emülsifikasyonu/evaporasyon, emülsifikasyon-difüzyon ve yüksek hızda karıştırma/ultrasonikasyon yöntemleriyle hazırlanabilir (Gürsoy, 2002; Numanoglu ve Tarımcı, 2006; Domb ve ark., 2007).

Yüksek basınçla homojenizasyon yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği kullanılarak lipit nanopartikül hazırlanışı Müller ve Lucks (Müller ve ark., 1995; Domb ve ark., 2007) tarafından geliştirilmiştir. Sulu dispersiyonlarda birbirine yakın parçacık boyut dağılımlarının elde edilmesi kararlılığı arttırmak için gereklidir; aksi durumda dispersiyon içerisinde farklı boyutlu parçacıklar farklı dispersiyon özellikleri gösterecektir. Bu yöntemin faydaları arasında birbirine yakın ve küçük parçacıklar elde edilebilmesi (özellikle parenteral uygulamalar için gerekli $< 5 \mu\text{m}$ boyuttaki parçacıklar), organik çözücüye ihtiyaç göstermemesi ve büyük ölçekte üretilebilmesidir (bir seride 50-150 kg) (Üner ve Yener, 2007).

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi sıcakta veya soğukta yapılmaktadır. Her iki yöntemde de etkin madde homojenizasyondan önce erimiş lipit içerisinde çözündürülür veya disperse edilir (Demirel ve Yazan, 2000; Domb ve ark., 2007).

Sıcak homojenizasyon yöntemi

Bu yöntemde etkin madde erime noktasının 5-10°C üzerindeki sıcaklığa getirilmiş lipit içerisinde çözündürülür. Etkin madde içeren lipit eriyik aynı sıcaklığa getirilmiş yüzey etkin madde içeren sulu faz içerisinde disperse edilir ve dispersiyonların emülsifikasyonu yüksek hızdaki karıştırıcı yardımıyla gerçekleştirilir. Elde edilen pre-emülsiyon yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilir. Tipik üretim homojenizasyonu 500 bar basınçta ve 3-5 homojenizasyon döngüsü ile yapılır (Demirel ve Yazan, 2000; Mehnert ve Mäder, 2001; Gürsoy, 2002; Büyükköroğlu, 2005). Elde edilen nanoemülsiyon oda sıcaklığında soğumaya bırakılır ve KLNler soğuma sırasında katılaştıran damlacıklar ile oluşur.

KLN'lerin sulu dispersiyonları püskürtürerek kurutma yöntemiyle kuru toz haline getirilerek daha uzun süre saklanabilmektedir. Sıcaklığın önemli olduğu bu yöntem özellikle sıcaklığa dayanıklı, lipofilik ve suda çözünmeyen etkin maddelerin enkapsülasyonunda çok tercih edilmektedir (Demirel ve Yazan, 2000;

Demirel ve ark., 2001; Gürsoy, 2002; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006; Domb ve ark., 2007).

Soğuk homojenizasyon yöntemi

Soğuk homojenizasyon yönteminde etkin madde içeren lipit sıvı azot veya kuru buz içerisinde soğutulur, 50-100 µm boyutuna öğütülür ve soğuk sulu yüzey etkin madde fazında dağıtılır. Oluşan makro-süspansiyon oda sıcaklığında yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek nanopartiküller oluşur. Kuru buz veya sıvı azot lipitin kırılgenliğini arttırmak ve öğütme aşamasını kolaylaştırmak için kullanılmaktadır. Yüksek soğutma lipit matris içerisinde etkin maddenin homojen dağılımına yardımcı olmaktadır (Büyükköroğlu, 2005; Mukherjee ve ark., 2009).

Soğuk homojenizasyon yönteminin başında lipitin eritilmesi sıcaklık gerektirmesine karşın örneğin ısı alması minimuma indirilmektedir. Bu nedenle bu teknik özellikle ısıya hassas ve hidrofilik etkin maddeler için tercih edilmektedir. Hidrofilik etkin maddelerin sulu faza geçişini engellemek amacıyla dispersiyonlarda düşük molekül ağırlıklı polietilen glikol ve yağlar kullanılmaktadır (Domb ve ark., 2007).

Mikroemülsiyon ile KLN hazırlama

Gasco tarafından geliştirilen mikroemülsiyon tekniği daha sonra başka araştırmacılar tarafından da kullanılmıştır (Mukherjee ve ark., 2009). Yöntemde öncelikle lipit materyal yaklaşık 60-70°C'ye ısıtılır. Aynı sıcaklığa getirilen yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde içeren sulu faz ile farklı oranlarda (1:2'den 1:100'e kadar) karıştırılarak yağ/su tipinde mikroemülsiyon sistemi oluşturulur. Oluşan sıcak dispersiyon daha sonra soğuk sulu faz içerisinde dağıtılır (Domb ve ark., 2007).

Sonuçta elde edilen mikroemülsiyonda uzaklaştırılması güç olan aşırı sıvı ve formülasyonu kararlı hale getiren yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde kütlesi bulunmaktadır (Müller ve ark., 2000; Domb ve ark., 2007).

Mikroemülsiyon tekniği ile büyük ölçekte KLN hazırlamak mümkündür. Ancak hazırlama sırasındaki karıştırma hidrodinamiği, mikroemülsiyondaki ve sulu fazdaki ısı değişimleri benzer ürün özelliklerinin oluşturulmasında dikkat edilmesi gereken önemli ve kontrol edilebilmesi güç parametrelerdir (Ekambaram ve ark., 2012).

Çözücü emülsifikasyonu-evaporasyon ile KLN hazırlanması

Sjöström ve Bergestahl'ın tanımladığı yöntemde lipit ve etkin madde su ile karışmayan bir organik çözücüde (sikloheksan, kloroform, metilen klorür gibi) dağıtılır (Mukherjee ve ark., 2009). Oluşan organik faz yüzey etkin madde içeren sulu faz içerisinde karıştırıcı yardımıyla emülsifiye edilir. Nanopartikül manyetik karıştırıcı üzerinde organik çözücünün uçması sırasında su içerisindeki lipitin çökmesi ile oluşur. Son aşama olan organik çözücü evaporasyonu parçacık birleşmesini önlemek için hızlı olmalıdır. Bu yöntem peptit ve protein gibi hidrofilik moleküllere uygulanmaktadır (Domb ve ark., 2007).

Yöntemin diğer KLN hazırlama yöntemlerine göre en önemli üstünlüğü etkin maddenin herhangi bir ısı etmenine maruz kalmamasıdır. Bu nedenle ısıya hassas etkin maddeler kolaylıkla hazırlanabilmektedir. Başlıca sakıncaları ise organik

çözücü kullanılması ve parçacık büyüklüğünün kullanılan lipit konsantrasyonu ile değişkenlik göstermesidir (Müller ve ark., 2000; Domb ve ark., 2007; Ekambaram ve ark., 2012).

Emülsifikasyon-difüzyon ile KLN hazırlanması

Quintanar-Gerrero ve Fessi'nin patentini aldığı yöntemde su ile kısmen karışan benzil alkol veya tetrahidrofuran gibi bir çözücü kullanılmaktadır (Domb ve ark., 2007). Su ile çözücü arasındaki termodinamik eşitliği sağlayabilmek için çözücü suyla doyurulur. Suyu doyurulmuş bu çözücü içerisinde lipit dağıtılır ve ardından etkin madde eklenir. Oluşan organik faz şiddetli karıştırma ile yüzey etkin madde içeren sulu faz içerisinde emülsifiye edilir. Düşük hızda manyetik karıştırıcı ile sulu faza çözücü difüzyonu ile lipitler çökmeye başlar. Çözücü kaynama noktasına bağlı olarak ultrafiltrasyon veya distilasyon ile uçurulur. Çözücünün tamamının uçurulması ile nanopartiküller oluşur. Bu yöntem ile 100 nm boyutunda parçacıklar elde edilmektedir (Domb ve ark., 2007; Ekambaram ve ark., 2012).

Ultrasonikasyon veya yüksek hızda homojenizasyon

KLN'lerin bu yöntemle hazırlanmasının en büyük yararı kullanılan cihazların hemen hemen tüm laboratuvarlarda bulunmasıdır. Yöntemin en büyük sorunu ise mikrometre düzeyinde parçacık boyut dağılımı ve saklama süresince parçacık büyümesinin gözlenmesidir. Ayrıca ultrasonikasyon yüzünden metal kontaminasyonu da olasıdır (Mehnert ve Mäder, 2001; Müller ve ark., 2004; Wissing ve ark., 2004; Büyükköroğlu, 2005).

Polimerik Sistemler

Viral olmayan sistemler arasındaki katyonik polimerler, genetik materyal ile kendi kendilerine kolayca polielektrolit bileşikler oluşturmaları ve bu bileşikleri parçacık içerisinde kondanse ederek transfeksiyona aracılık etmeleri, enzimatik parçalamadan korumaları, endolizozomal kaçışı ve hücre alımı desteklemeleri nedeniyle çok fazla ilgi görmektedir (Reischl ve Zimmer, 2009).

Katyonik polimerler, polietilenimin (PEI), poli-L-lizin (PLL) ve siklodekstrin polikatyonları gibi sentetik ve kitosan, atelokolajen gibi doğal polimerler olarak ikiye ayrılır (Oh ve Park, 2009; Howard, 2009). Katyonik polimerlerden PEI ve kitosan viral olmayan polimerik vektörler olarak gen taşımada oldukça yoğun olarak kullanılmaktadır (Oh ve Park, 2009; Kim ve ark., 2009).

Polietilenimin (PEI)

Gen taşımada en etkili katyonik polimerin PEI olduğu düşünülmektedir. PEI sahip olduğu yüksek proton tamponlama kapasitesi ile endozomların hızlı ozmolizine yol açarak PEI/DNA kompleksinin sitozol içerisine kaçmasına ve hücre çekirdeği içerisine taşınmasına yardımcı olur (Lungwitz ve ark., 2005). Ancak yüksek molekül ağırlığındaki PEI'nin doza bağlı toksisitesi bulunmaktadır (Jiang ve ark., 2007). Bu nedenle insanlarda kullanımı sınırlıdır. Toksisiteyi azaltmak için genellikle polietilenglikol gibi yardımcı polimer ile konjuge edilmektedir (Kim ve Kim, 2009).

PEI ile siRNA kompleksinin *in vivo* ve *in vitro* kullanımına günümüzde yapılan son çalışmalarda sıkça yer verilmektedir. Bu çalışmalarda siRNA'daki fosfat

grupları ile polimerdeki amin grupları arasındaki oranın, PEI'nin doğrusal veya dallı olmasının veya oluşan kompleksin parçacık boyutunun ve zeta potansiyel değerinin transfeksiyon etkinliği üzerinde çok etkili olduğu belirlenmiştir (Read ve ark., 2005; Grayson ve ark., 2006; Zintchenko ve ark., 2008).

Polietilen Glikol (PEG)

İnsanlarda nükleik asit taşıma ihtiyacını karşılamak amacıyla birçok polimer kullanılmış ancak kullanılan polimerlerdeki biyouyumluluk ve gen transfer etkinliğindeki problemler bugüne kadar aşılamamıştır. Bu problemleri aşabilmek için PLL ve PEI gibi katyonik polimerler PEG ile modifiye edilmiştir (Lee ve Kim, 2005). Bu işleme 'pegilasyon' denir. PEG, ilaç etkin maddesinin ve nükleik asitin uzatılmış kan sirkülasyonunu ve dokuya ulaşmada yüksek etkinliği sağlamak için en çok çalışılan biyouyumlu polimerdir. Düşük toksisite göstermesi, çözünürlüğü arttırması ve iyonik yükleri perdeleme etkisi PEG kullanımını arttıran özellikler arasındadır (Lee ve Kim, 2005; Sonoke ve ark., 2008).

Pegilasyon sonucu katyonik polimerin siRNA taşınmasını arttırdığı saptanmıştır (Liang ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda çekirdeğinde siRNA/PEI olan PEG ile sarılmış polielektrolit kompleks misellerinin kendiliğinden oluştuğu belirlenmiştir. Hayvan tümör modelleri üzerindeki çalışmalar siRNA'lı kompleksin intratümoral uygulamanın yanısıra intravenöz uygulamalarda da immün cevap oluşturmada tümör dokusunda büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir (Kim ve Kim, 2009).

Siklodekstrin Polikasyon Sistemleri

Polikasyon içeren siklodekstrin sistemleri siRNA taşınması için kullanılmıştır. Polikasyon yapı ile siRNA karıştırıldığında kendi kendilerine yaklaşık 50 nm çapında kolloidal parçacıklar oluşturmaktadır. Uçlarındaki imidazol gruplarının intraselüler ortamda nükleik asit salımında etkin olduğu belirlenmiştir (Lieskovan ve ark., 2005). Siklodekstrin içeren polikasyon sisteminin siRNA'yı enzimatik parçalanmadan koruması nedeniyle siRNA'nın kimyasal modifikasyonuna gerek kalmamıştır (Howard, 2009).

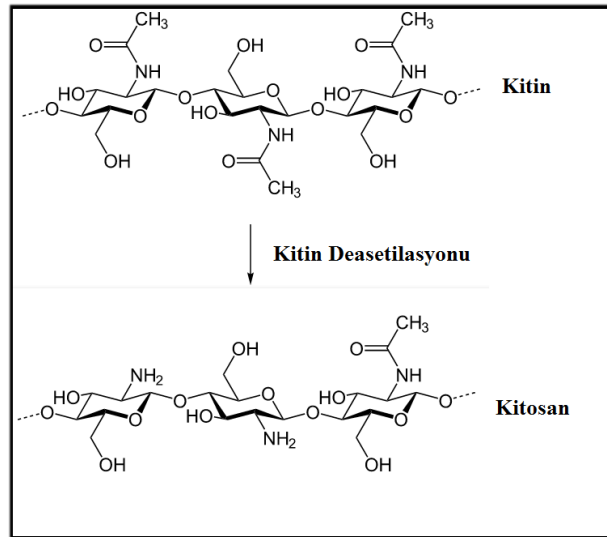
Poli(D,L- laktit-ko-glikolit) (PLGA)

PLGA polilaktit asit ve poliglikolik asit kopolimerleridir (Gürsoy, 2002). Viral olmayan vektörler arasında PLGA polimeri ile oluşturulan nükleik asit taşıyıcı sistemi önemli yer tutmaktadır. Bugüne kadar yapılan *in vivo* gen taşıma çalışmaları PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin toksik olmadığını ve biyouyumlu olduğunu göstermiştir (Jensen ve ark., 2010). PLGA nanopartikülleri endositoz ile hücre içerisine girdikten sonra endolizozomal kompartimanlardan kaçır ve sitoplazma içerisinde etkin maddeyi salar. Elde edilen olumlu sonuçlar siRNA ile ilgili çalışmalarda da önem taşımakla birlikte PLGA nanopartiküllerinin tek başına düşük etkinliğe sahip olduğu gözlenmiştir (Patil ve Panyam, 2009; Jensen ve ark., 2010). Bu nedenle PLGA nanopartikülleri daha çok PEI gibi katyonik bir polimerle birlikte kullanılmıştır. PEI ile oluşturulan kompleksin siRNA enkapsülasyonunu arttırdığı ve *in vitro* gen ekspresyonunu başarılı şekilde inhibe ettiği farklı çalışmacılar tarafından rapor edilmiştir (Patil ve Panyam, 2009; Lee ve ark., 2011).

Kitosan

Kitosan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen pavyuya, karides gibi kabukluların dış kabuklarında ve bitkilerin hücre duvarlarında bulunan yapısal bir elementtir. Tekrarlayan D-glikozamin ve N-asetil-glikozamin birimlerinden oluşan ve birbirlerine glikozidik bağlarla bağlı biyoparçalanabilir bir polisakkarittir (Mao ve ark., 2010). Kitosanın kimyasal yapısı **Şekil 11**'de gösterilmiştir.

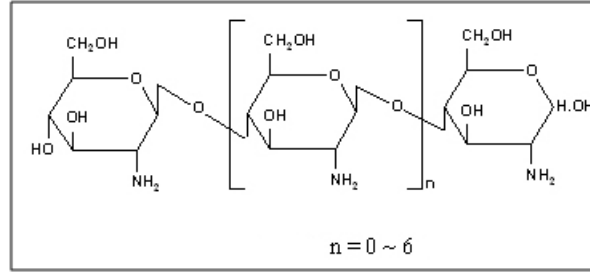
Kitosan sahip olduğu yüksek katyonik özelliği nedeniyle DNA ve RNA gibi negatif yüklü moleküller ile etkileşme yeteneğine sahiptir. Mumper ve ark. ilk kez pDNA'yı, Katas ve ark. da (2006) ilk kez siRNA'yı *in vitro* olarak taşımak için kitosanı kullanan araştırmacılarıdır (Mao ve ark., 2010). Kitosanın genetik materyale bağlanma afinitesi, kararlılığı, parçacık büyüklüğü ve kompleksin hücrede salımı ve etkinliği formülasyon parametrelerine bağlıdır. Parametreler arasında kitosanın moleküler ağırlığı, deasetilasyon derecesi, kompleksin sitokiyometrisi (N/P oranı), genetik materyal konsantrasyonu, serum konsantrasyonu, transfeksiyon ortamının pH'sı, hücre tipi, vb bulunmaktadır (Kim ve ark., 2007; deMartimprey ve ark., 2009; Mao ve ark., 2010).



Şekil 11. Kitosanın kimyasal yapısı (Mao ve ark., 2010)

Kitosan fizyolojik ortamda kan veya bağırsaktaki normal florada üretilen lizozim ve kitinazlar tarafından parçalanmaktadır (Mao ve ark., 2010). Bu nedenle endüstride ve farmasötik araştırmalarda ilaç taşıyıcı sistem olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Kitosan son yıllarda gen taşıma için diğer viral olmayan vektörlere güvenli alternatif olarak önerilmektedir (Kumar, 2000; Kumar ve ark., 2004; Venkatesan ve ark., 2010). Bununla birlikte kitosanın sudaki zayıf çözünürlüğü onu biyomedikal uygulamalarda sınırlandırmaktadır (Kumar, 2000). Kitosanın keşfinden bu yana çözünürlüğü ve uygulamalardaki çeşitliliği arttırmak için farklı kimyasal modifikasyonlar yapılmaktadır. Bu modifikasyonlar arasında kitosanın kitooligosakkarite dönüşümü en çok ilgi çeken değişimdir (Alves ve Mano, 2008).

Kitooligosakkaritler kitosanın kısmi hidroliz ürünüdür. Ürünün antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuvar ve antitümör etkileri bulunmaktadır (Park ve Kim, 2010). Etkiler arasında en fazla çalışılan antitümör etki, kitooligosakkaritlerin moleküler ağırlıklarından ve D-glikoz aminlerindeki serbest amino gruplarının sağladığı aşırı katyonik özellikten kaynaklanmaktadır (Huang ve ark., 2006). Ayrıca elektrik yüklerinin güçlü olması yine antikanser etkinlikte önemli rol oynamaktadır (Park ve ark., 2003; Feng ve ark., 2004; Huang ve ark., 2006). Kitooligosakkaritlerin genel kimyasal yapısı **Şekil 12**'de verilmiştir.



Şekil 12. Kitooligosakkaritlerin kimyasal yapısı (http-9)

Kitosan gibi kitooligosakkaritlerde de uygulama sınırlarını genişletmek için çeşitli modifikasyonlar yapılmaktadır. Bunlar arasında en fazla kullanılan fosforilasyon dışında karboksilasyon veya propiyonil, palmitol, butiril, oleil, stearoil ve lauroil gibi çeşitli yağlarla modifikasyonu bulunmaktadır (Venkatesan ve ark., 2010).

Polimer Parçacıkların Hazırlanış Yöntemleri

Polimerin hazırlanış yöntem polimerin tipi, büyüklüğü, kullanılma amacı ve etkin madde ile etkileşimine göre farklılık göstermektedir. Hazırlama yöntemleri arasında iyonotropik jelasyon, koaservasyon, çapraz bağlama, püskürtürerek kurutma, emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma ve polimerizasyon bulunmaktadır (Kaş, 2002; Singla ve ark., 2004).

İyonotropik jelasyon

Polimer çözeltisi farklı konsantrasyonlardaki tripolifosfat, sülfat veya sitrat gibi anyonik çözeltiler içerisinde polimerin dağıtılmasıyla hazırlanır. Bu şekilde oluşan partiküller süzülerek alınır ve distile su ile yıkanıp kurutulur (Singla ve ark., 2004).

Koaservasyon

Bu yöntemde polimerin (jelatin, albümin gibi) alkali ortamda çökme özelliği kullanılır. Basit ve kompleks koaservasyon olarak iki gruba ayrılır. Basit koaservasyon yöntemi tek bir polimerik madde içerir. Bu yöntemde etkin madde polimer çözeltisi içerisinde dağıtılır. Sıcaklık, pH, çözücü (alkol) ve tuz (susuz sodyum sülfat) uygun oranlarda ise sulu faz içerisindeki polimerin çözünürlüğü azalarak kümeleşir. Kompleks koaservasyon zıt yüklü iki polimer arasındaki etkileşim sayesinde gerçekleşir. Genel olarak pH'ya ve polimerlerin yüklerinin nötralizasyonuna bağlıdır. Sodyum aljinat, sodyum karboksimetil selüloz ve

jelatin bu yöntemde kullanılan polimerlerdir. Farklı iki polimer çözeltisinin birbiri içerisinde dağıtılmasından sonra sırasıyla jelleşme ve bir çapraz bağlayıcı eklenmesiyle sertleşme meydana gelir (Singla ve ark., 2004).

Çapraz bağlama

Genellikle doğal polimerlerin kullanıldığı bu yöntemde polimer ve etkin madde sulu faz içerisinde çözündürülür veya dağıtılır. Sulu faz uygun yüzey etken madde ile stabilize edilir. Polimerin jelleşmesi veya çapraz bağlanması; sistemin soğutulup ısıtılması veya çapraz bağlayıcı ajan eklenmesiyle sağlanır (Kaş, 2002, Singla ve ark., 2004).

Polimerizasyon

Yöntemin emülsiyon, süspansiyon ve misel polimerizasyonu olarak farklı tipleri vardır. Polimerizasyon yönteminde birisi suda diğeri yağda çözünen iki monomer kullanılarak damlacık yüzeyinde polimerizasyon sağlanır (Kaş, 2002).

Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma

Bu yöntem suda çözünen peptit, protein ve diğer makromoleküllerin hapsedilmesini sağlar. Öncelikle organik çözücüde polimer ve etkin maddenin çözeltisi oluşturulur. Polimer çözeltisi ile karışmayan yüzey etken madde çözeltisi eklendiğinde damlacıklar ortaya çıkar. Kullanılan organik çözücü sıcaklık veya vakum ile buharlaştırılarak uzaklaştırıldıktan sonra filtrasyon veya santrifüj ile partiküller elde edilir (Rosca ve ark., 2004).

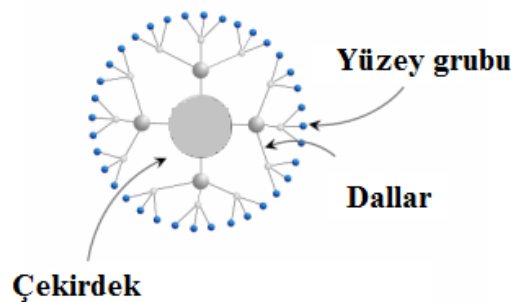
Püskürterek kurutma

Bu yöntemde etkin maddenin polimer çözeltisi içerisinde dağıtılması veya çözündürülmesi ile elde edilen çözelti püskürterek kurutma cihazına uygulanarak toz halinde partiküller oluşur. Elde edilen partiküllerin boyutu polimer-etkin madde çözeltisinin viskozitesine, püskürtme başlığındaki delik çapına, akış hızına ve sıcaklığa bağlıdır.

Dendrimer

Vögtle ve ark. tarafından 1970'lerin sonunda geliştirilen ilk kaskat polimerik moleküller, daha sonra 1980'li yıllarda Tomalia ve ark. tarafından yeniden çalışılmaya başlanmıştır (Templeton, 2009; Bulut ve Akar, 2012).

Dendrimer iç çekirdek etrafında birçok dallanmadan oluşan monodispers makromoleküldür. Polimerik yapıların yeni bir sınıfı olarak değerlendirilmektedir (Şekil 13) (Templeton, 2009; Sahoo ve ark., 2007).



Şekil 13. Dendrimer yapısı (http-4)

Kimyasal yapısının çok yönlü olması dendrimerleri biyomedikal uygulamalar için uygun kılmaktadır (Baker, 2009). Dendrimerdeki sayısız yüzey grubu varlığı yüzey gruplarının çözücüyle veya diğer moleküllerle eş zamanlı etkileşimini kolaylaştırır. Örneğin, sahip oldukları fazla sayıda yüzey amin grupları nedeniyle dendrimerler genetik materyali iyi derecede tutabilmektedir. Bu özellik aynı zamanda yüksek çözünürlük ve reaktivite eğilimine de yol açmaktadır (Chen ve ark., 2000; Dufès ve ark., 2005). Polimerin yüzeyinde yer alacak fonksiyonel grupların yeri, sayısı ve cinsini kontrol etme yeteneği bu yapıların hücredeki reseptörlere bağlanabilmesi açısından avantaj sağlar (Bulut ve Akar, 2012). Yapılan çalışmalarda dallanma sayısının gen taşımada ve transfeksiyonda çok etkili olduğu gösterilmiştir (Templeton, 2009).

Fonksiyonel grupların elektrostatik veya kovalan bağlarla etkileşim sağlaması ile ilaç moleküllerini enkapsülleme sırasında iç kısımlara yükleyebilme özellikleri nedeniyle dendrimer ilaç taşıyıcı olarak işlev görmektedir (Dufès ve ark., 2005; Bulut ve Akar, 2012).

Dendritik polimerler iyi tanımlanmış 3-boyutlu yapısı ve özel moleküler ağırlığı sonucu gen taşınmasında önemli bir yol olarak görülmektedir. Genetik materyal ile nanometre boyutlarında etkin partiküller oluşturabilmektedir. Poliamidoaminler (PAMAM) gen taşıma için karakterize edilmiş ve sıklıkla kullanılan dendrimerdir (Baker, 2009). Literatürde siRNA ve oligonükleotit ile hazırlanan bileşiklerin hepsinde poliamidoamin kullanıldığı görülmekle birlikte oligonükleotitlerde elde edilen etkinlik siRNA ile elde edilememiştir (Hussain ve ark., 2004; Kang ve ark., 2005). Laboratuvar ortamında ve büyük ölçekte üretilme güçlüğü henüz aşılamamış bir problemdir (Hadjichristidis ve ark., 2011). Dallanma sayısının artması ile transfeksiyon etkinliğinin arttığı belirlenmiştir. Ancak dallanmanın artması ile toksisitenin de artması ve eritrosit morfolojisinde farklılaşmaya neden olması ile hemolize yol açtığı çalışmacılar tarafından belirlenmiştir (Malik ve ark., 2000).

Transfeksiyon Yöntemleri

Genetik materyalin belirli bir hücreye aktarılması ve genetik değişiklik ortaya çıkarması işlemine 'transfeksiyon' denir. Kültüre alınmış hayvan hücrelerinde transfeksiyon ilk olarak 1965'de Vaheri ve Pagano tarafından DNA'nın özel şekilde çöktürülmesi ve ardından hücrenin fagositozla almasıyla gerçekleştirilmiştir. Biyoteknolojide rekombinant DNA teknolojisi, özellikle genden rekombinant protein üretiminde, hücre hattı geliştirilmesinde, genetik işaretleyicilerin hücre hatlarına eklenmesinde, hücrenin protein ekspresyon düzeyini değiştirerek genin fazla ekspresyonunun hücre metabolizmasına etkisinin araştırılması gibi çalışmalarda ve tüp bebek, klonlama, transgen teknolojisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Carter ve Shieh, 2010).

Transfeksiyon genel olarak geçici ve kalıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Geçici transfeksiyonda genetik materyal konakçı genomuna entegre olmaz; buradaki amaç hücredeki hedef genin geçici ancak yüksek ekspresyonunu sağlamaktır. Kalıcı transfeksiyonda ise transfekte edilen genetik materyal konakçı genomuna entegre olur ve hücrelerin genetik materyelinde kalıcı değişim oluşturur (Ma ve Chen 2005).

Transfeksiyon çeşitleri biyolojik, kimyasal ve fiziksel olmak üzere üçe ayrılır (Çizelge 1) (Niidome ve Huang, 2002; Mitrović, 2003; Ma ve Chen 2005).

Çizelge 1. Transfeksiyon tipleri (Kim ve Eberwine, 2010)

Tip	Yöntemler	Örnek
Biyolojik	Virüs ilişkili	Herpes simpleks, adeno-ilişkili, adeno virüs
Kimyasal	Katyonik polimer	PEI, dendrimer, lipofektamin, DOTAP, DOTMA
	Kalsiyum fosfat	
	Katyonik lipit	
Fiziksel	Direkt enjeksiyon	Mikro-iğne, gen tabancası, AFM tip, Amaxa nükleofektör, fototransfeksiyon, manyetofeksiyon
	Biyolistik parçacık taşıma	
	Elektroporasyon	
	Sonaporasyon	

Virüs-ilişkili transfeksiyon yöntemlerinde genellikle retrovirüs ve adenovirüs kullanılmaktadır ancak virüslerin oluşturduğu sorunlar kullanımlarını kısıtlamaktadır (Ma ve Chen, 2005).

Kimyasal yöntemlerle geçici veya kalıcı transfeksiyon süspende veya primer hücrelerde *in vitro* olarak yapılabilir (Mitrović, 2003; Ma ve Chen 2005).

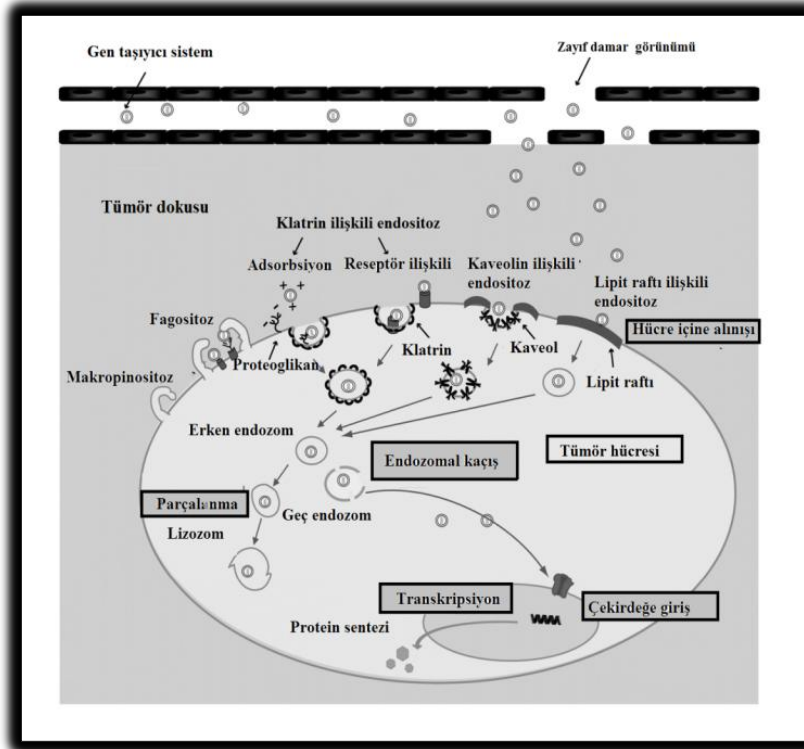
Fiziksel yöntemlerde sıklıkla elektroporasyon ve gen tabancaları kullanılmaktadır. Doğrudan enjeksiyonda genetik materyalin kararsızlığı ve dolaşım sisteminde nükleazla çabuk parçalanması bu yöntemi kısıtlamaktadır. Uygulanan elektrik alan şiddeti, süresi, sıcaklık, genetik materyal miktarı ve transfeksiyon besiyerinin iyonik bileşimi elektroporasyonda önemli etmenlerdir (Niidome ve Huang, 2002; Ma ve Chen, 2005).

Biyobalistik veya parçacık bombardımanı olarak adlandırılan gen tabancası ile transfeksiyon yöntemi özellikle genetik materyalin hücrelere girmesinin güç olduğu çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu yöntemde DNA veya RNA biyolojik olarak geçimli parçacıklara (altın veya tungsten) adhere edilir. Genetik materyal bağlı parçacıklar hedef doku üzerine basınç ile hızlandırılmış vuruş yapılarak uygulama gerçekleştirilir. Bu yöntemin etkinliği hücre tipine, hücre büyüme koşullarına, gen tabancasının özelliklerine ve deneysel deneyime bağlıdır (Mitrović, 2003; Ma ve Chen, 2005).

Genetik Materyalin Hücre İçine Alımı

Katyonik lipidlerle hücrenin dışından çekirdeğe kadar taşınma tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, lipid partiküllerin plazma membranına füzyonunu ve asidik çevresi ile DNA/RNA'yı parçalayan endolizozomal kompartımandan kaçışı sağlamaları nedeniyle en çok kabul gören yöntemdir. Endositoz ile de geçiş olduğu elektron ve floresan mikroskopi çalışmaları ile lipopleks ve polipleks sistemlerin membran altındaki hücre içi veziküllerde saptanmasıyla kanıtlanmıştır (Morille ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalarda, taşıyıcı sistemlerin hücre içine alınması ile ilgili birçok yol olduğu belirlenmiştir (Merdan ve ark., 2002; Kirkham ve Parton, 2005; Winkler, 2011). Bunlar arasında klatrin-ilişkili endositoz, lipid raftı ile ilişki (kaveol gibi), fagositoz veya makropinositoz bulunmaktadır (Şekil 14).



Şekil 14 . Gen taşıyıcı sistemlerin hücre içine alım yolları (Morille ve ark., 2008)

Katyonik taşıyıcı sistemlerin en önemli giriş yolu pozitif yüklü sistemler ile membran üzerinde bulunan negatif yüklü glikoprotein, proteoglikan ve gliserofosfatların seçici olmayan birleşimleri sonucu klatrin-aracılı yoldur. Ayrıca membran üzerindeki özel reseptörlere bağlanabilen araçları taşıyan sistemler de klatrin yolunu kullanmaktadır (Morille ve ark., 2008).

Fagositoz veya makropinositoz daha çok granülosit ve makrofajların büyük molekülleri parçalamak için kullandıkları yoldur. Bu nedenle geçiş yolu olarak fazla tercih edilmez (Winkler, 2011).

Vektörlerin membran ile birleşmesi ve hücre içine alınmasında her yolun belli katkısı olduğu kısmen açıklanmıştır. Örneğin, katyonik lipidler ile yapılan çalışmalarda klatrin yolunun tercih edildiği, polimer ile hazırlanan komplekslerde ise hem kaveol hem de klatrin yolunun kullanıldığı saptanmıştır (Zuhorn ve ark., 2002; Rejman ve ark., 2004). Sonuç olarak, membran kompozisyonu, transfekte edilecek hücre veya komplekslerin parçacık boyutu ve yüzey yükü giriş yollarından birisini veya birkaçını etkiler (Rejman ve ark., 2004; Khalil ve ark., 2006).

Apoptoz

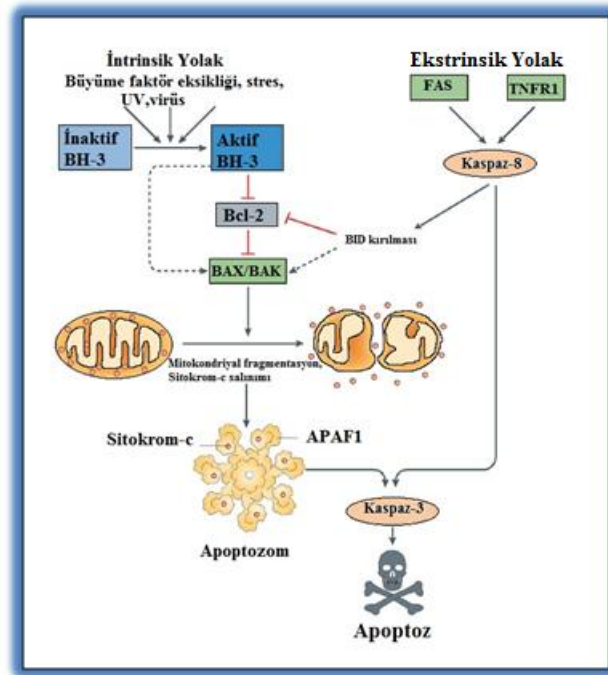
Apoptoz terimi ilk olarak Kerr, Wyllie ve Currie tarafından (1972) nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli olarak tanımlanmıştır. Apoptoz patolojik ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü ve hücre intiharı apoptoz ile aynı anlamda kullanılan diğer terimlerdir (Davis, 2002; Boujrad ve ark., 2007).

Apoptoz mekanizmasındaki bozukluk apoptoza uğraması gereken farklı morfolojiye sahip hücre/hücrelerin yaşamasına fırsat verir. Bu hücrelerin aşırı artışı ile genetik kararlılığını kaybetmiş hücresel topluluk oluşabilir. Bu süreçte işleyen olaylar tümör gelişmesinde önemli rol oynar. Bu nedenle apoptoz programının daha iyi anlaşılması özellikle kanser gibi hücre çoğalmasıyla endike hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalarda umut vermektedir (Kasibhatla ve Tseng, 2003; Masiero ve ark., 2007; İncesu ve ark., 2007).

Antikanser ilaçlar kanser hücrelerindeki apoptoz mekanizmasını uyardığından apoptoz mekanizmasını anlamak kanser tedavisinde önemli yer tutmaktadır. Bu noktada apoptoz gen tedavisinin de önemli amaçları arasına girer. Konuyla ilgili birçok gen saptanmış ve bu genlerle *in vitro-in vivo* faz çalışmaları yapılmaktadır. Üzerinde çalışılan genlerin bazıları apoptozu arttıran (proto-onkogen) p53, MYC, Bax, Bcl-XS ve apoptozu azaltan (tümör süpresör gen) Bcl-xL, Bcl-2, Mcl1'dir (Davis, 2002; Özvaran, 2004; Masiero ve ark., 2007).

Fiziksel ajanlar, sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörlerinin azalması ve FAS ve TNFR1'in uyarılması gibi birçok etken apoptozu başlatabilir. Diğer taraftan UV radyasyonu, DNA alkilasyonu veya mitozda ortaya çıkan problemler nedeniyle de apoptotik süreç başlamaktadır (http-5).

Apoptoz ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere başlıca iki yol üzerinden işlev gösterir (**Şekil 15**) (Ashkenaz, 2008).



Şekil 15. Apoptoz yolları (http-5)

İntrinsik yol apoptozun en çok görüldüğü yoldur. UV, büyüme faktör eksikliği veya sitotoksik ilaçlar gibi etmenlerle başlayan bu yolda, mitokondri veya FAS/TNF kaynaklı sinyallerle Sitokrom C ve APAF1'in salımı sonucu kaspazların (Kaspaz 3 ve 9) aktivasyonu gerçekleşir (Fulda, 2009).

Ekstrinsik yolda apoptozun başlaması için gerekli sinyallerin bağlandığı bölgeleri içeren TNF ailesi ve FAS reseptörleri, apoptozu başlatan sinyal kompleksinin oluşmasını sağlar. Bu yolda da apoptoz süreci kaspazlar uyarılarak başlatılır. Reseptörler normal hücrelerde değil özellikle tümör hücrelerinde aktivasyon sağlar (Ashkenaz, 2008; Fulda, 2009).

Bcl-2

DNA üzerindeki Bcl-2 geni insan foliküler B-hücre lenfomada t(14;18) translokasyonu ile karakterize olan ve ilk klonlanan protoonkogenlerdendir. Yaklaşık 250 kb uzunluğunda 3 ekson ve 2 promotordan oluşmaktadır (Gong ve ark., 2011).

Bcl-2 proteini, mitokondri dış zarının sitoplazmaya bakan kısmında lokalize 26 kDa'luk proteindir (Sioud ve Sørensen, 2003). Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik yolağın (intrinsik yolak) en önemli kısmını oluşturur ve birbirine zıt çalışan iki gruba ayrılır. Bu proteinlerin düzeyi hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir (Khosravi-Far ve White, 2007). Bcl-2 protein ailesi Bcl-2 homoloji 1 adı verilen benzer yapıda 4 domain yapısı içermektedir. Bu domainler BH1, BH2, BH3 ve BH4'tür. Bunlar aynı zamanda C-terminal membran bağlama dizisi ve 3 boyutlu yapıları da benzerdir.

Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir. Bcl-2 apoptozu engelleme fonksiyonunu kaspazların öncül formlarını durdurarak veya kaspaz akışını

doğrudan uyaran sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve Sitokrom C gibi apoptogenik faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (Tsujimoto, 2003). Bax veya Bak gibi proapoptotik üyeler kaspaz serbestleşmesini heterodimerizasyon yoluyla uyarır ve mitokondri zarının geçiş gözeneklerinin boyutunu değiştirip Sitokrom C'yi serbestleştirerek kaspaz aktivasyonuna yol açar (Tsujimoto, 2003; Altunkaynak ve Özbek, 2008).

Klinikte kullanılan birçok sitotoksik ilaç antitümör etkisini apoptozu indükleyerek gösterir (Nagamatsu ve ark., 2008). Bcl-2 birçok kanser türünde ve tümör oluşumu ve gelişiminde önemli derecede artar (Fu ve ark., 2005; Sonoke ve ark., 2008; Nagamatsu ve ark., 2008). Bu nedenle siRNA'nın aday hedefleri arasında apoptoz ve hücre döngü düzenleyici moleküller bulunmaktadır. Antiapoptotik Bcl-2 proteini sitotoksik ajan gibi dış etkilere karşı direnci arttırmaktadır (Fu ve ark., 2005; Sonoke ve ark., 2008). Tümör hücrelerindeki Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu hastalık gelişimiyle orantılıdır. Yapılan fare modeli çalışmalarda katyonik lipozom kullanılarak Bcl-2 mRNA'sının siRNA ile susturulmasının tümör hücrelerindeki çoğalmayı durdurduğu gösterilmiştir (Yano ve ark., 2004). Bu da Bcl-2'nin kanser tedavisinde önemli bir hedef olduğunu göstermektedir .

Oblimersen sodyum (G3138; *Genasense*[®]; Genta Inc., Berkeley Heights, NJ), insan Bcl-2 mRNA'sının ilk 6 kodonuna spesifik olarak bağlanarak mRNA'nın parçalanmasına ve hücre içi Bcl-2 proteininin azalmasına neden olan antisens fosforotiyoat oligonükleotit bileşiğidir. Oblimersen insan tümörlerinde Bcl-2 ekspresyonunu azaltan antisens etkinin klinik olarak gerçekleştirildiği ilk oligonükleotittir (Herbst ve Frankel, 2004). Oblimersen için faz çalışmaları halen devam etmektedir.

MATERYAL ve YÖNTEMLER

Materyal

Kullanılan Maddeler

Agaroz	Prona	İspanya
Akrilamit/Bisakrilamit (% 30, 29:1)	Applichem	Almanya
Amonyum persülfat (% 99)	Applichem	Almanya
Bcl-2 antikoru	SantaCruz Bio.	Amerika
<i>Brillant Blue G</i>	Amresco	Amerika
DKM (Diklorometan)	Sigma-Aldrich	Almanya
DMSO (Dimetilsülfoksit)	Applichem	Almanya
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Biological Ind.	İsrail
EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit)	Sigma-Aldrich	Almanya
Etanol	Merck	Almanya
Etidyum bromür	Amresco	Amerika
Fötal sığır serumu	Sigma-Aldrich	Almanya
Glasiyel asetik asit	Sigma-Aldrich	Almanya
Gelucire® 50/13 (Gliserol makragol stearat)	Gattefose	Fransa
Gliserol	Sigma-Aldrich	Almanya
Glisin	Merck	Almanya
İzopropanol	Merck	Almanya
Kloroform	Carlo Erba	Fransa
Lipofectamin® 2000 transfeksiyon ajanı	Invitrogen	İngiltere
<i>Lysis Buffer</i>	Cell Signalling	Amerika
Metanol	Merck	Almanya
Micro BCA kiti	ThermoScientific	Amerika
MTT boyası	Applichem	Almanya
Penisilin/streptomisin	GIBCO	İngiltere
PMSF (Fenil metan sülfonil florid)	ThermoScientific	Amerika
Potasyum dibazik fosfat	J.T.Baker	Hollanda
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich	Almanya
Precirol® ATO5 (Gliserol distearat)	Gattefose	Fransa
PVA (Polivinil alkol)	Sigma-Aldrich	Almanya

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Merck	Almanya
SDS protein işaretleyici (3 renkli)	ThermoScientific	Amerika
siRNA Bcl-2	SantaCruz Bio.	Amerika
Span [®] 85 (Sorbitane trioleate)	Fluka	İspanya
Sodyum bikarbonat	Merck	Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	Almanya
Sodyum klorür	Merck	Almanya
Sodyum dibazik fosfat	Merck	Almanya
Suda çözünür kitosan	Kitto Life Co.	Kore
Tween [®] 80	Merck	Almanya
(Polioksietilen sorbitan monooleat)		
TEMED (Tetrametiletildiamin)	Applchem	Almanya
Trizma baz	Sigma-Aldrich	Almanya
Tripsin/EDTA	Biological Ind.	İsrail
Yükleme tamponu (Laemli tampon)	Sigma-Aldrich	Almanya
Western Blot kiti	ThermoScientific	Amerika
Western Blot sinyal artırıcı	SantaCruz Bio.	Amerika

Kullanılan Cihazlar

Blotlama cihazı	Cleaver	İngiltere
Büyük kapasiteli santrifüj	Eppendorf 5810	Almanya
CO ₂ 'li etüv	Hera Cell 240i	Amerika
Çoklu okuyucu	Perkin Elmer (Victor X 5)	İngiltere
Dikey elektroforez	UVP	İngiltere
Distile su cihazı	Millipore	Amerika
Dondurucu (-20°C)	Arçelik	Türkiye
Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Sci.	Amerika
Floresan mikroskop	Leica 400DMI	Almanya
TEM- Geçirimli elektron mikroskobu	FEI Tecnai™ (G2 Spirit)	Amerika
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 (Silent Crusher S)	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
Sonikatör	Sonics	Amerika
Su banyosu	GFL T-251425	Almanya
Ultraturaks	IKA T-25	Almanya
Vorteks karıştırıcı	Jeio Tech Co.	Çin
Yatay elektroforez cihazı	ThermoScientific	Amerika
Zeta potansiyel ve parçacık boyutu ölçer	Nano Zetasizer ZS (Malvern)	İngiltere

YÖNTEMLER

Tez kapsamında farklı molekül ağırlığına sahip ve suda çözünen (1 kDa, 1 kDa-3kDa, 3 kDa-5 kDa, 10 kDa) dört çeşit kitosan ve iki farklı katı lipit (Gelucire® 50/13 ve Precirole® ATO5) formülasyonu hazırlanmıştır. Katı lipit formülasyonlarına katyonik ajan oktadesilamin ile katyonik özellik kazandırılmıştır. Hazırlanan formülasyonlara siRNA yüklenmesi adsorpsiyon ve enkapsülasyon çalışmaları ile incelenmiştir. Bu formülasyonların hastalıklı hücrelere uygulaması yapılarak transfeksiyon özellikleri gözlenmiştir. Formülasyonların hücre üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için *MTT* testi kullanılmış ve hücrelerdeki gen ekspresyon etkinliği *Western Blot* analizi ile araştırılmıştır.

Formülasyon Çalışmaları

Ön Formülasyon Çalışmaları

Tez kapsamında, amaçlanan hedefin gerçekleştirilmesi için farklı yöntemler kullanılarak çok sayıda formülasyon çalışması yapılmıştır. Bu formülasyonların fizikokimyasal özellikleri ve toksisiteleri öncelikli olarak değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlara göre en uygun formülasyonlar belirlenmeye çalışılmıştır. Değerlendirmeler sonucunda üzerinde ayrıntılı çalışma gerektiği düşünülen KLN ve kitosan formülasyonlarının adlandırılması, formülasyon bileşimi, hazırlama yöntemi ve genetik materyali yükleme şekli **Çizelge 2'**de belirtilmiştir.

Katı Lipit Nanopartikül Hazırlama Çalışmaları

KLN'ler sıcak ve soğuk ortamda yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, çözücü difüzyon yöntemi, mikroemülsiyon, çözücü emülsifikasyonu ve çözücü uçurulması ile yüksek hızda karıştırma veya ultrasonikasyon yöntemleri kullanılarak hazırlanabilmektedir (Mehnert ve Mäder, 2001).

Bu çalışmada KLN hazırlamak için Precirol® ATO5 ve Gelucire® 50/13 lipitleri seçilmiş ve yöntem olarak yüksek hızda karıştırma ve sonikasyon teknikleri ile su-içinde-yag emülsiyonu oluşturma yöntemi kullanılmıştır.

Precirol® ATO5 sürekli salım gösteren dozaj şekillerinin hazırlanmasında kullanılan gliserit baz olarak adlandırılır. PEG esterleri yoktur ve belirgin hidrofobik karakterdedir (HLB=2). Kimyasal olarak inert ve geçimli olup bugüne kadar tablet, mikrokapsül ve nano-yapılı lipit taşıyıcı olarak kullanılmıştır (Hamdani ve ark., 2003).

Gelucire® 50/13, PEG ile doğal yağların alkoliz reaksiyonu ile hazırlanan yarı-katı şekildir. Yağ asitlerinin gliserol ve PEG esteri olarak tanımlanır. Erime derecesi ve HLB değeri ile karakterize edilir. Gelucire® 50/13 yüksek HLB değeri (HLB=12) ile hidrofilik özellikte gliserittir. Bugüne kadar farklı etkin maddelerin kontrollü salımı amacıyla ve kaplama maddesi olarak kullanılmıştır (Mohsin ve ark., 2012).

	Katı lipidler				Yüzey etkin maddeler		Katyonik Ajan	Genetik materyal	Organik çözücü	Uygulanan yöntemler			
Formülasyon	Gelucire® 50/13 (% g/g)		Precirol® ATO5 (% g/g)		Tween® 80 (% g/g)	Span® 85 (% g/g)	Oktadesilamin® (% g/g)	siRNA	DKM	Yüksek Hızda Karıştırma (23.000 rpm)	Sonikasyon % 20 Güç	Diyaliz	Filtrasyon
G0	4		-		2.8	1.2	-	-	-	+	-	-	-
G1	4		-		2.8	1.2	0.0125	-	-	+	-	-	-
G2	4		-		2.8	1.2	0.125	-	-	+	-	-	-
G3	4		-		2.8	1.2	0.25	-	-	+	-	-	-
G4	4		-		2.8	1.2	0.5	-	-	+	-	-	-
G5	4		-		2.8	1.2	1.25	-	-	+	-	-	-
P0	-		4		2.8	1.2	-	-	-	+	-	-	-
P1	-		4		2.8	1.2	0.0125	-	-	+	-	-	-
P2	-		4		2.8	1.2	0.125	-	-	+	-	-	-
P3	-		4		2.8	1.2	0.25	-	-	+	-	-	-
P4	-		4		2.8	1.2	0.5	-	-	+	-	-	-
P5	-		4		2.8	1.2	1.25	-	-	+	-	-	-
S1	2		-		2.8	1.2	-	-	+	-	+	-	-
S2	2		-		2.8	1.2	0.250	-	+	-	+	-	-
S3	4		-		2.8	1.2	-	-	+	-	+	-	-
S4	4		-		2.8	1.2	0.125	-	+	-	+	-	-
S5	4		-		2.8	1.2	0.250	+	+	-	+	-	-
S5 _{FD}	4		-		2.8	1.2	0.250	+	+	-	+	Filtrasyon- dan sonra	Diyaliz- den önce
S5 _{DF}	4		-		2.8	1.2	0.250	+	+	-	+	Filtrasyon- dan önce	Diyaliz- den sonra
	Kitosan (% g/mL)								Çözücü	Manyetik Karıştırıcı 500 rpm			
	1 kDa	1-3 kDa	3-5 kDa	10 kDa					D.Su				
K1	4	-	-	-	-	-	-	-	+	+			+
K2	-	4	-	-	-	-	-	-	+	+			+
K3	-	-	4	-	-	-	-	-	+	+			+
K4	-	-	-	4	-	-	-	-	+	+			+

Çizelge 2. Hazırlanan tüm formülasyonların adlandırılması, formülasyon bileşimi, hazırlama yöntemi ve genetik materyali yükleme şekli

Yüksek Hızda Karıştırma Tekniği ile KLN Hazırlanması

Yüksek hızda karıştırma tekniği ile formülasyon hazırlamak için Gelucire® 50/13 ve Precirol® ATO5 katı lipitleri seçilmiş ve oranları daha önce yapılan ön formülasyon çalışmaları sonuçlarına dayanarak % 4 olarak belirlenmiştir.

Ön çalışmalarda en kararlı dispersiyonları oluşturması nedeniyle yüzey etkin madde olarak % 2.8 Tween®80 ve % 1.2 Span®85 karışımı seçilmiştir.

Hazırlama sırasında katı lipit erime derecesinin yaklaşık 10°C üzerine kadar ısıtılmış, yüzey etkin madde sulu faza eklenerek lipit ile aynı sıcaklığa getirilmiştir. Karıştırma işlemi, sıcaklık korunarak, ultraturaks ile 23.000 rpm'de 5 dakika süre ile uygulanmıştır. Hazırlanan dispersiyonlar 0.22 µm filtreden geçirilmiştir (**Çizelge 2, Çizelge 3**).

Çizelge 3. Yüksek hızda karıştırma ve basit emülsiyon ile hazırlanan formülasyon (% g/g)

Formülasyon	Gelucire® 50/13	Precirol® ATO5	Tween® 80	Span® 85	Distile su	Üretim Sıcaklığı
G0	4	-	2.8	1.2	ym 10 mL	60°C
P0		4	2.8	1.2	ym 10 mL	66°C

Sonikasyon Tekniği ile KLN Hazırlanması

Sonikasyon tekniği ile hazırlanan formülasyonlarda katı lipit olarak % 2 ve % 4 oranında Gelucire® 50/13 ve yüzey etkin madde olarak Tween®80 ve Span®85 karışımı kullanılmıştır (**Çizelge 2, Çizelge 4**). Gelucire® 50/13 katı lipiti 25 mL'lik balon içerisinde 500 µL DKM içinde çözündürülmüştür. Yüzey etkin madde karışımı bir mikrotüp içinde 2 mL distile su içinde dağıtılmıştır. Daha sonra yağlı ve sulu faz sonikatör yardımıyla 1 dakika süre ile % 20 güçte sonike edilmiştir. Süre sonunda oluşan dispersiyonlar rotavapora aktarılmış ve yaklaşık 250 mbar'da 30-60 dakika ve 40°C su banyosu üzerinde 50 rpm'de karıştırılarak organik çözücünün uzaklaşması sağlanmıştır. Oluşan dispersiyon iki kısma ayrılmış bir kısmı 0.22 µm filtreden geçirilmiş ve diyaliz membranına (*Medicell Int. Ltd., 12-1400 Da, 15.9 mm:30M*) aktararak 2 gün distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda diyaliz işlemi yapılırken, diğeri önce diyaliz işlemi uygulanıp daha sonra filtreden geçirilmiştir.

Çizelge 4. Sonikasyon ile hazırlanan formülasyon (% g/g)

Formülasyonlar	Gelucire® 50/13	Tween 80	Span 85	Oktadesilamin
S1	2	2.8	1.2	-
S2	2	2.8	1.2	0.250
S3	4	2.8	1.2	-
S4	4	2.8	1.2	0.125
S5	4	2.8	1.2	0.250

KLN'lere oktadesilamin ile pozitif yük kazandırılması

Precirol® ATO5 ve Gelucire® 50/13 lipidleri anyonik özelliktedir (Chen ve ark. 2010). Genetik materyalin bu maddelere elektrostatik olarak tutunmasının sağlanması ve negatif yüzey yüküne sahip olan hücrelere aynı etkileşim ile tutunması için katyonik özellik kazandırılması gerekmektedir (Uddin, 2007). Bu amaçla, katyonik özellik taşıyan lipidik oktadesilamin KLN formülasyonlarına belirli oranlarda eklenmiştir. Emülsifikasyon yöntemi ile KLN hazırlanırken oktadesilamin katı lipidler ile birlikte ısıtılarak eritildikten sonra veya sonikasyon ile KLN hazırlama sırasında DKM içinde lipid ile birlikte çözündürülerek üzerine sulu faz eklenmiştir.

Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan formülasyonlarda oktadesilamin oranı arttırılarak denenmiş ve oranları **Çizelge 2** ve **Çizelge 5**'de verilmiştir.

Çizelge 5. Yüksek hızda karıştırma ve basit emülsiyon tekniği ile hazırlanan formülasyonlarda kullanılan oktadesilamin oranı (% g/g)

	Gelucire® 50/13	Oktadesilamin		Precirol® ATO5	Oktadesilamin
G1	4	0.0125	P1	4	0.0125
G2	4	0.125	P2	4	0.125
G3	4	0.25	P3	4	0.25
G4	4	0.5	P4	4	0.5
G5	4	1.25	P5	4	1.25

Kitosan Parçacıklarını Hazırlama Çalışmaları

Kitoooligosakkaritler, kitin veya kitosanın kimyasal veya enzimatik olarak sentez edilmesi ile elde edilir. Suda çözünen kitoooligosakkaritler kitosanalara göre daha düşük moleküler ağırlığa ve daha yüksek etkinliğe sahiptir (Li ve ark. 2011).

Kitosan parçacıkları koaservasyon, iyonik jelasyon, kovalan çapraz bağlama ve desolvasyon gibi farklı yöntemlerle pratik olarak hazırlanabilir (Lai ve Chia-Mi Lin, 2009). Hazırlama sırasında genellikle asetik asit gibi asidik yapıdaki organik çözücü içerisinde çözündürülür. Bu çalışmada distile su içerisinde dağılabilen farklı molekül ağırlığında ve deasetilasyon derecesinde (% 80-% 85) oligosakkarit yapıdaki kitosan çeşitleri kullanılmıştır.

Kitosan parçacıkları, molekül ağırlığı 1 kDa, 1-3 kDa, 3-5 kDa ve 10 kDa olan kitosanları kullanarak distile su içerisinde % 4 oranında ve manyetik karıştırıcı üzerinde 30 dakika 500 rpm'de karıştırılarak hazırlanmıştır. Oluşturulan sistemler daha sonra 0.22 µm'lik filtreden süzölmüştür (**Çizelge 2**, **Çizelge 6**).

Çizelge 6. Kitosan ile hazırlanan formülasyon

	1 kDa	1-3 kDa	3-5 kDa	10 kDa
Konsantrasyon (% g/mL)	4	4	4	4
Formülasyon adı	K1	K2	K3	K4

Karakterizasyon Çalışmaları

Bu bölümde hazırlanan formülasyonların parçacık büyüklüğü ve dağılımı, yüzey özelliği, zeta potansiyeli ve pH değeri gibi fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Parçacık Boyutu ve Dağılımı

Hazırlanan formülasyonlarda parçacık boyutu ve dağılımı foton korelasyon spektroskopisi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerde pH 7.4 ve 50 μ S iletkenliğe sahip 0.22 μ m filtreden geçirilmiş distile su kullanılmıştır. 100 μ L formülasyon örneği 1 mL distile su içerisinde dağıtılmış ve 25°C’de gerçekleştirilen 100 ölçümün ortalaması alınacak şekilde ayarlanmış *Zetasizer cihazı* ile ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

Zeta Potansiyel

Zeta potansiyel ölçümü parçacık boyutu için hazırlanan örneklerde ve aynı cihaz kullanılarak yapılmıştır. Elektrostatik hareketliliğin zeta potansiyeline dönüştürülmesinde *Helmholtz-Smolochowski* eşitliği kullanılmıştır. 20 ölçümün ortalaması alınacak şekilde ayarlanan cihazda ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

pH Değeri

Formülasyon örnekleri hazırlandıktan sonra pH-metre ile pH değerleri belirlenmiştir. Gerekli durumlarda 1 M HCl veya 1 M NaOH kullanılarak pH ayarlaması yapılmıştır.

Morfolojik İnceleme

Formülasyonların morfolojik incelemesi TEM yardımıyla yapılmıştır. 5 mL distile su içerisinde ultrasonik banyoda disperse edilen örnekler 300 mesh’lik ızgaralara damlatılarak havada kurutulmuş ve çeşitli büyütme ölçeklerinde incelenmiştir. TEM analizi Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi’nde (AÜBİBAM) yapılmıştır.

Hücre Kültürü

Seçilen kanser hücrelerinin (A549 ve MCF-7) üretiminde ve formülasyonların uygulanmasında hücre kültür tekniğinden yararlanılmıştır. Bunun için:

1. Hücreler % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren DMEM’de kültüre edilmiştir.
2. Hücre kültürü 37°C’de % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren atmosfer ortamında yapılmıştır.

3. Hücreler hızlı büyüme fazına ulaştıktan sonra 2 X Tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilip alt kültürler ayrıştırılmıştır.
4. Kullanılmayan alt kültürler hücre stoğu olarak -80°C’de kısa süre ile saklanmıştır.

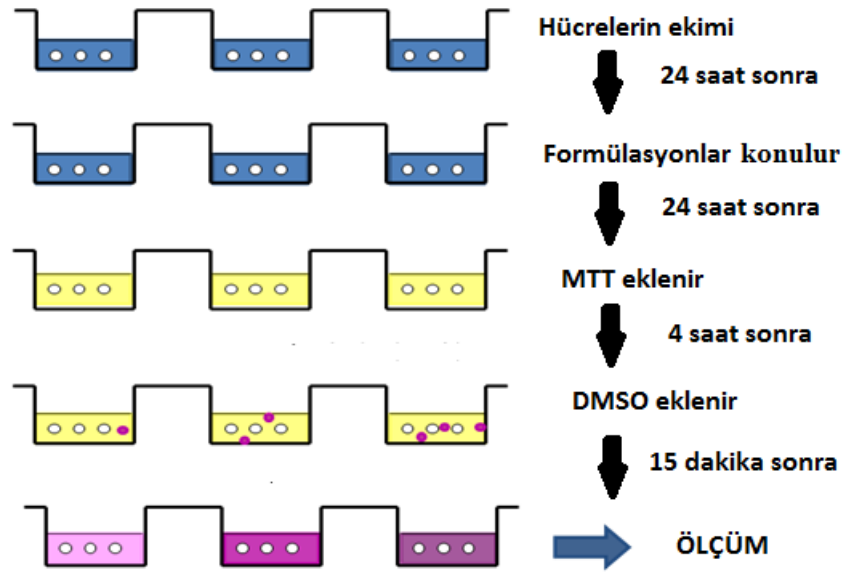
Sitotoksite Çalışması

Günümüzde MTT olarak bilinen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromür yöntemi ilk olarak Mosmann tarafından tanımlanmış ve daha sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Hücre biyolojisinde sitotoksite, hücre canlılığı ve proliferasyonun değerlendirilmesinde en çok kullanılan yöntemdir (Stockert ve ark., 2012).

MTT, hücelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı reaksiyon ile renk veren, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. Bu yöntem canlı hücelerde mitokondrinin, MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Parçalanma sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazana indirgenmektedir. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hüceler mor renkte boyanırken, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hüceler boyanmamaktadır. Hücelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının bir ölçütü olarak değerlendirilir ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı gösterir (**Şekil 16**) (Uchida ve ark., 2009; Van Meerloo ve ark., 2011).

Bu çalışmada hazırlanan formülasyonların hücre üzerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi için MTT testi kullanılmıştır.

1. Hüceler kültüre edildikten sonra % 10 FBS içeren DMEM besiyerinde süspansiyon haline getirilmiş ve *Thoma* lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. 2×10^4 /mL hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her kuyucuğuna belirli miktarlarda aktarılmıştır.
2. 1-günlük üreme periyodunun ardından sitotoksik etkiyi incelemek için hücre süspansiyonunun üzerine farklı derişimlerde formülasyon 2. gün eklenmiş ve formülasyon ile muamele edilmeyen kontrol hüceleri ile birlikte 37°C’de % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren atmosfer ortamında 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. 24-48 saatlik inkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 20 µL (5 mg/mL) MTT boyası eklenmiş ve MTT boyasının canlı hüceler tarafından formazan tuzu haline dönüştürülebilmesi için 37°C de 4 saat daha inkübe edilmiştir.
4. Bu sürenin sonunda formülasyon MTT kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklenerek plaka okuyucuda (ELISA) 570 nm dalga boyunda renk değişimi belirlenmiştir (Uchida ve ark., 2009).
5. Deney her bir derişim için 8 kuyuda yapılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 16. MTT yöntemi

Genetik Materyali (siRNA) Formülasyonlara Yükleme Çalışmaları

Adsorpsiyon

Katyonik özellik taşıyan KLN'lere ve kitosan parçacıklarına belirlenmiş (Çizelge 7) oranlarda siRNA eklenmiş ve 37°C'de 20 dakika inkübasyona bırakılarak negatif yüklü siRNA'nın pozitif yüzey yüklü parçacıklara adsorbe olması sağlanmıştır.

Çalışma için kullanılan siRNA ilgili genin spesifik susturulması ya da ekspresyonunun azaltılması için dizayn edilmiş 19-25 nükleotidlik her birinin 3'ucu boşta olan çift iplikli RNA yapılarıdır. Çalışmamızda Bcl-2 mRNA'sına spesifik ticari olarak hazırlanmış Bcl-2 siRNA (Santa Cruz Biotechnology) kullanılmıştır. Kontrol siRNA olarak fluoresein konjugeli spesifik olmayan 19-25 nükleotidlik kontrol RNA dizisi (Control siRNA (Fluorescein Conjugate)-A, Santa Cruz Biotechnology) kullanılmıştır. Fluoresein 490 nm'de maksimum absorpsiyona ve 514 nm de maksimum emisyonu sahip ve molekülde fonksiyonel grup olarak bulunan bir bileşiktir. Hücre içerisinde floresan mikroskop altında yeşil renk olarak görülmektedir.

Çizelge 7. KLN ve Kitosan formülasyonlarının genetik materyal adsorpsiyonu (µg:µL)

Formülasyonlar	Genetik Materyal
	siRNA/Formülasyon
Kitosan formülasyonu (K1, K2, K3)	1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:7,5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150, 1:200, 1: 250, 1:300

Kitosan formülasyonu (K4)	1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:7,5, 1:10, 1:15, 1:20
KLN formülasyonu (G2)	1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:7,5, 1:10, 1:15, 1:20

Adsorbe edilen siRNA'ların geri kazanımlarını belirlemek amacıyla aşağıda belirtilen *Ekstraksiyon Yöntemi* uygulanmıştır.

Ekstraksiyon Yöntemi

1. siRNA adsorbe edilmiş kitosan parçacıkları 50°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.
2. Fenol-kloroform eklenerek karıştırılmış ve 1.500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürülmüştür.
3. Üst kısım atılmış pellet üzerine 200 µL % 99'luk alkol eklenerek yeniden santrifüj yapılmıştır.
4. Santrifüj sonrası alkollü kısım atılarak pelletin oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır.
5. Kurumanın ardından 50 µL TE tamponu eklenerek siRNA'nın dağılması sağlanmıştır.
6. Yükleme tamponu konularak % 2'lik agaroz jele yüklenmiş ve görüntülenmiştir.

Ekstraksiyon işlemi sırasında siRNA'da oluşacak hasarın ve kaybın belirlenmesi amacıyla bu işlem kitosana adsorbe edilen siRNA oranında çıplak siRNA'ya da uygulanmıştır.

Enkapsülasyon

siRNA'nın enkapsülasyonu için, % 4 Gelucire® 50/13 katı lipiti 500 µL DKM içerisinde çözündürülmüş ve **Çizelge 2'**de belirtilen oranlarda yüzey etkin madde içeren ve 62.5 µg, 125 µg ve 250 µg siRNA eklenmiş sulu faza % 20 güç uygulanarak 1 dakika sonikasyon işlemi yapılmıştır. Oluşan dispersiyonlar rotavapora aktarılmış ve organik çözücünün uzaklaştırması için yaklaşık 250 mbar'da 30-60 dakika ve 40°C su banyosu üzerinde 10 rpm'de karıştırılarak bekletilmiştir.

Oluşan dispersiyon iki kısma ayrılmıştır. Birinci kısım 0.22 µm filtreden süzülerek, ikinci kısım ise süzülmeden diyaliz membranına aktarılacak şekilde su içerisinde ve manyetik karıştırıcıda organik çözücü kalıntılarının giderilmesi için 2 gün muamele edilmiştir. Diyaliz işlemi sonrasında ikinci kısım 0.22 µm filtreden geçirilmiştir. Diyaliz işleminin ardından filtre edilen formülasyon DF

olarak, filtre edildikten sonra diyaliz edilen formülasyonlar FD olarak adlandırılmıştır (**Çizelge 2**).

Sonikasyon işleminin genetik materyalin kırılmasına neden olduğu belirtilmiştir (Gvili ve ark., 2006). Sonikasyon yöntemiyle KLN'lere siRNA yüklenmesi çalışması sırasında siRNA'da oluşabilecek hasarın ve kaybın belirlenmesi amacıyla *Ekstraksiyon II yöntemi* geliştirilmiştir. Aynı yöntem KLN'lere adsorbe edilmiş ve çıplak siRNA'ya da uygulanmıştır.

Ekstraksiyon II yöntemi

1. 150 µL siRNA/KLN formülasyonu mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
2. Üzerine 500 µL DKM ve 500 µL % 99'luk alkol eklenerek tüpler birkaç kez alt üst edildikten sonra 1.200 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.
3. Santrifüj sonrasında üst kısım atılmış ve çökelti üzerine 500 µL % 99'luk alkol eklenip ardından santrifüj işlemi uygulanarak siRNA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır.
4. Üst kısmı ortamdan uzaklaştırılmış tüpler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
5. Kuruma işlemi bittikten sonra üzerine 50 µL TE konularak % 2'lik agaroz jele yüklenmiştir.

Jel Retardasyon Çalışmaları

Bu sistem formülasyonların siRNA bağlama oranlarının, bu oranların serum varlığında olası değişiminin belirlenmesinde ve sonikasyon ile ekstraksiyon yöntemlerinin genetik materyal üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

Elektroforez işlemi için % 1.5 veya % 2 agaroz içeren jel hazırlanmıştır. Yürütme tamponu ve jel hazırlamak için stok 10 X TBE'den hazırlanan 1 X TBE kullanılmıştır.

10 X TBE (1 L pH 8.0)

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

1. 100 mL 1 X TBE tamponuna 1.5 g agaroz eklenmiş ve manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözünmesi sağlanmıştır.
2. Jel çözeltisi yaklaşık 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine % 5 oranında etidyum bromür (10 mg/mL) eklenerek jel tepsisine dökülmüştür.

3. Üzerine uygun taraklar konularak jelin polimerleşmesi beklenmiştir. Jel polimerleştikten sonra üzerine 1 X TBE tampon konularak taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.
4. Yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir.
5. Örneklerin, 50 mV uygulanarak ~2 saat jelde yürütülmesi ve jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmesi sağlanmıştır.

Serum İçindeki Kararlılık

Hücrelerde maksimum etkinlik için hazırlanan formülasyonların siRNA'yı serum bileşenlerine karşı koruması gereklidir. Bu nedenle siRNA içeren formülasyonların serum bileşenlerini içeren besiyeri içerisindeki davranışlarını incelemeye gerek duyulmuştur. Bu inceleme için transfeksiyon işleminde kullanılan oranlarda siRNA/formülasyonu, % 10 FBS içeren DMEM ile 37°C'de 1 saat, 4 saat, 10 saat, 24 saat ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örnekler jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir.

Transfeksiyon Çalışmaları

Transfeksiyon çalışmalarında, hazırlanan formülasyonların genetik materyali hücre içerisine aktarabilme yetisinin belirlenmesi için FITC-konjugeli kontrol siRNA kullanılmıştır. FITC-konjugeli kontrol siRNA hücrelere transfekte olduktan sonra hücre içerisine vermiş olduğu ışımaya sayesinde floresan mikroskobu altında görüntülenebilmektedir (Pedersen ve ark. 2009). Hücre olarak A549 akciğer ve MCF-7 meme kanser hücreleri kullanılmıştır. Belirli oranlarda formülasyon ile adsorbe edilmiş FITC-konjugeli siRNA bileşimleri aşağıda belirtilen protokole uygun olarak uygulanmıştır. FITC-konjugeli siRNA'nın etkinliğinin ve formülasyonların taşıyıcı etkinliğinin belirlenmesi için de Lipofectamine® 2000 ile karşılaştırmalı olarak çalışılmıştır (Lipofectamine® 2000 firmanın belirttiği protokole uygun olarak hazırlanmıştır).

1. 1. gün 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına antibiyotiksiz % 10 FBS içeren besiyeri ile hücre ekimi yapılmış ve % 60-70 yoğunluk oluncaya kadar 37°C'de % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren atmosfer ortamında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Formülasyonlar iki ayrı plakada çalışılmıştır.
2. 1-günlük üreme periyodunun ardından kuyucuklardaki besiyerleri 2. gün çekilmiştir. 1 X PBS tamponu ile bir kez yıkanmıştır.
3. Çeşitli oranlarda hazırlanmış formülasyonlar FBS içermeyen besiyeri ile karıştırılıp hücrelere damlatılarak eklenmiştir (**Çizelge 8**).
4. Plakalar yeniden 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından plakalardan birisine formülasyon içeren besiyeri üzerine % 20 FBS içeren besiyeri eklenmiştir. Diğer plakadan 6 saat sonra formülasyon içeren besiyeri çekilerek taze besiyeri eklenmiştir.
5. 24 ve 48 saat inkübasyonun ardından plakalar floresan mikroskobu altında incelenmiştir.

Çizelge 8. Transfeksiyonu çalışılan formülasyon oranı

Formülasyon	FITC-siRNA/G2	S5 için FITC-siRNA* içeriği	FITC-siRNA/K4
Oran	1:15/1:20/1:25	67.5µg/125 µg /250 µg	1:1/1:2/1:3

*S5 formülasyonunda siRNA enkapsüle edildiği için µg olarak verilmiştir.

Transfekte Edilmiş Hücrelerin Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi

Transfeksiyon işleminden sonra hücre üzerindeki etkinlik mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonun sonucunda Lipofectamine® 2000, S5 ve K4 formülasyonları için transfeksiyonun gerçekleştiği ve gerçekleşmediği hücreler aynı alanda mikroskopik olarak incelenmiştir. Kuyucuklarda 10 farklı alandaki tüm hücreler 40X büyütmede sayılmış ve transfekte olan ve olmayanların toplam hücre üzerinden sayısı belirlenerek transfeksiyon indisi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Transfeksiyon indisi} = \frac{\text{Transfekte olan hücre sayısı}}{\text{Transfekte olan + olmayan hücre sayısı}} \times 100$$

Transfeksiyon Yapılmış Hücrelerden Protein İzolasyonu

Formülasyonların FITC-konjugeli siRNA ile hücrelere aktarılabildiğinin saptanmasından sonra transfeksiyon işlemi Bcl-2 siRNA taşıyan formülasyonlar için de gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde transfeksiyon işlemi 6 kuyucuklu plakalara ekilen hücreler üzerinde yapılmıştır. Daha sonra hücrelerden protein izole edilmiştir.

1. 24, 48 ve 72 saat sonunda 6 kuyucuklu plakalar besiyeri içeriğinin tamamen uzaklaştırılması için soğuk 1 mL 1 X PBS tamponu ile yıkanmıştır.
2. Hücrelere 1 mL soğuk 1 X Trypsin/EDTA eklenmesinin ardından tüm hücre materyali kazıyıcı yardımı ile kaldırılmış ve 1.5 mL steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
3. En son kalan hücre topluluğunu aktarmak için 6 kuyucuklu hücre plakasına 0.5 mL soğuk 1 X PBS konulmuş ve kazıyıcı yardımıyla son hücreler de alınarak aynı 1.5 mL mikrosantrifüj tüpü içinde tüm materyal toplanmıştır.
4. Hücreler daha önce soğutulmuş santrifüjde 1200 rpm’de ve 4°C’de 5 dakika sonunda çöktürülmüştür.
5. Üst sıvı hücre pelletine zarar vermeyecek şekilde atıldıktan sonra, pellet üzerine içinde 1 mM PMSF bulunan 100 µL lizis tamponu konulmuş ve buzda 5 dakika bekletilmiştir.
6. 11.500 rpm’de ve 4°C’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen protein içeren üst sıvı 0.5 mL’lik steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve

bu örnekler üzerinde total protein miktarı belirlenmesi gerçekleştirilmiştir (http-6).

Total Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bu çalışmada transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla SDS ve *Western blot* analizi yapılmıştır. Kullanılacak total protein özütü elde edildikten sonra jeldeki kuyulara yükleme yapmak için protein konsantrasyonunun kantitatif olarak belirlenmesi gereklidir. Protein özütlerinin konsantrasyonunu belirlemek için çalışmada *Micro BCA Kit*'i kullanılmıştır. Ticari olarak satılan kit alkali ortamda proteinlerce indirgenen bakır iyonları (biüret reaksiyonu) ile bikinkoninik asidin şelasyon yapması prensibine dayanmaktadır. Firmanın önerdiği protokole göre protein standartlarının hazırlanması için 2 mg/mL bovin serum albümini, çözücü olarak ise % 0.9 NaCl çözeltisi kullanılmıştır.

Proteinin standart eğrisini hazırlamak için BSA stoğundan (2000 µg/mL) **Çizelge 9**'da belirtilen seyreltmeler yapılmıştır. Ölçümler protein örneklerin 5 µL'sinin NaCl ile 150 µL'ye tamamlanmasının ardından gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 9. BSA standardının hazırlanması

BSA Stoğu (2 mg/mL)	Çözücü (% 0.9 NaCl)	Konsantrasyon
0.5 µL	149.5 µL	1 µg/300 µL
1 µL	149 µL	2 µg/300 µL
2 µL	148 µL	4 µg/300 µL
3 µL	147 µL	6 µg/300 µL
4 µL	146 µL	8 µg/300 µL
5 µL	145 µL	10 µg/300 µL

Micro BCA protein testinin uygulanması

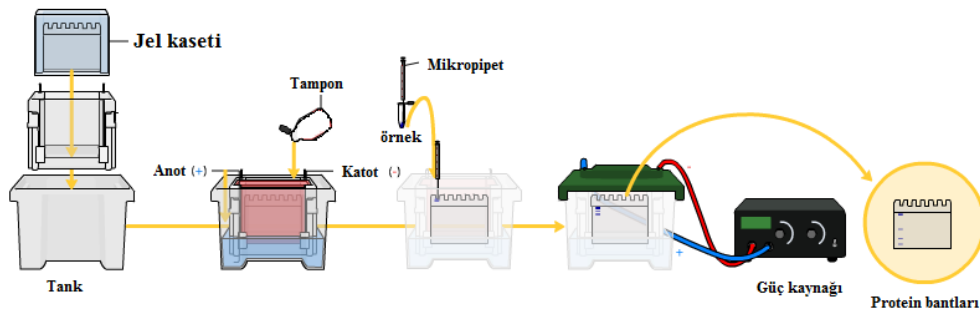
1. Her bir standarttan ve örnekten 150'şer µL alınarak 96 kuyucuklu plakalara konulmuştur.
2. Kuyucuklara 150 µL *Micro BCA* çalışma çözeltisi eklenerek mikropipet yardımıyla karıştırılmıştır.
3. 96 plaka çalkalayıcı üzerinde 30 dakika hafifçe çalkalanmış, daha sonra 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.
4. Inkübasyon sonrasında plakalar oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır.

5. Absorbans değerleri 562 nm’de kör olarak kullanılan % 0.9’luk NaCl’e karşı ölçülmüştür.
6. Kör için ölçülen absorbans değeri tüm örneklerin absorbans değerlerinden çıkartılmıştır.
7. Elde edilen veriler bilgisayar programına girilerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur.
8. Örneklerin protein miktarı oluşturulan eşitlikten yararlanılarak belirlenmiştir.

SDS-PAGE Jel Elektroforezi (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi)

Bu çalışmada en popüler PAGE (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) yöntemlerinden birisi olan sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi kullanılmıştır (**Şekil 17**).

Bu yöntem proteinlerin saflığının kontrolü ve moleküler ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılır ve *Western Blot*’lamanın ilk aşamasını oluşturur. Akrilamit ve N-N’-metilen bis-akrilamit monomerlerinin polimerleşmesiyle oluşan jel matrisde elektrik akımı yardımıyla proteinler büyüklüklerine göre ayrılır. Polimerizasyon başlatıcı/katalizör (amonyum persülfat ve TEMED) sistemi yardımıyla gerçekleşir. SDS elektroforezde diğer sistemlerden farklı olarak örnek hazırlama tamponuna bir miktar SDS eklenir. SDS örnekteki protein molekülünün etrafında boşluk kalmayacak şekilde katman oluşturarak negatif yüklenmesini sağlar. Böylece ayrışma, moleküllerin kendi yüklerinden bağımsız (negatif), molekül ağırlıklarına göre gerçekleşir. Akım geçirildiğinde jel matrisi içinde bulunan proteinler farklı büyüklükteki gözeneklerden büyüklüklerine göre farklı geçiş hızları gösterir. Buna göre küçük proteinler jelde hızlı, büyük proteinler ise yavaş ilerler (Wenk ve Fernandis, 2007).



Şekil 17. SDS elektroforez (<http://7>)

SDS-PAGE Yöntemi

Kullanılan çözeltiler

% 12 Ayırma jeli (10 mL)

% 30 Akrilamit/bisakrilamit	4 mL
1.5 M Trizma baz	2.5 mL
% 20 SDS	0.05 mL
% 10 APS	0.05 mL
TEMED	0.0066 mL
Distile su	3.4 mL

% 5 Yığma Jel

% 30 Akrilamit/bisakrilamit	0.67 mL
1 M Trizma baz	0.5 mL
% 20 SDS	0.04 mL
% 10 APS	0.04 mL
TEMED	0.004 mL
Distile su	2.7 mL

Yürütme Tamponu (pH 8.5)

1.92 M Glisin	144 g
0.25 M Trizma baz	30.3 g
% 0.1 SDS	1 g
Distile su	1 L

Brillant Blue Çözeltisi

Brillant blue	0.25 mg
Metanol:Distile su (1:1)	90 mL
Glasiyel asetik asit	10 mL

SDS için protein örneklerinin ve işaretleyicinin hazırlanması

1. Mikrotüp içerisine yaklaşık 30 µg protein konulmuş ve üzerine 2 X yükleme tamponundan 5 µL eklenmiştir.
2. Diğer bir tüpe 10 µL işaretleyici ve 5 µL yükleme tamponu konulmuştur.
3. Tüpler yaklaşık 90°C'de 2 dakika bekletilmiştir.
4. Tüpler kısa süre santrifüjlendikten sonra jele yüklenmeye hazır hale getirilmiştir.

SDS-PAGE'in uygulanması

SDS-PAGE uygulaması sırasında *Brillant Blue* ile boyama ve *Western Blot* 'lama için iki ayrı jel hazırlanmıştır.

1. Jel hazırlanmadan önce cam plakalar distile su ile yıkanmış ve kurulanmıştır. Camlar jel kasetine yerleştirilmiş ve sıkıca tutturulmuştur. Herhangi bir sızıntı olup olmadığı distile su ile kontrol edilmiştir.
2. Sırasıyla, distile su, SDS, Tris ve akrilamit tüpe konularak iyice karışmaları sağlanmıştır. En son APS ve TEMED eklenerek ayırma jeli hazırlanmıştır.
3. Ayırma jeli plakalar arasına pipet yardımı ile hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmüştür.
4. Tarakların yaklaşık 1 cm altına kadar ayırma jeli doldurulduktan sonra üzerine izopropanol eklenerek hava ile temas kesilmiş ve polimerleşme için 1 saat beklenmiştir.
5. Polimerleşme olduktan sonra izopropanol kurutma kağıdı yardımı ile ortamdan çekilmiştir.
6. Yürütme jeli için karışım üstteki sırayla hazırlandıktan sonra yine mikropipet yardımıyla dökülmüş ve taraklar dikkatlice takılmıştır. Polimerleşme için 1 saat beklenmiştir.
7. Polimerleşme olduktan sonra kaset tank içerisine yerleştirilmiş ve tank yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Taraklar dikkatlice çıkarılmıştır.
8. Örnekler mikropipet yardımı ile kuyulara yüklenmiştir.
9. Örnekler 100 V ve 25 mA'de (bromofenol mavisi yürütme jelinin en altına gelinceye kadar) jelde yaklaşık 2.5 saat yürütülmüştür.
10. Yürütme işlemi bittikten sonra jel dikkatlice tanktan çıkarılmış ve tarak kısmı koparılarak atılmıştır.
11. SDS-PAGE yapılırken protein iki jele aynı anda yüklenip yürütme işlemi yapılmıştır. Yürütme işlemi sonunda jellerden birisinde *brillant blue* ile boyama yapılırken diğeri *Western blot* 'lama için membrana aktarılmıştır (172).

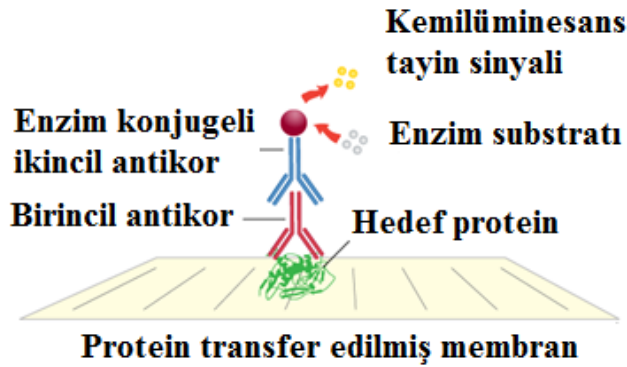
Jelin *Brillant blue* ile boyanması

1. Jel elektroforezden çıkarıldıktan sonra doğrudan plastik kap içerisine alınmıştır.
2. Kabin içine hazırlanan *Brillant Blue* çözeltisi konulup kap çalkalayıcı üzerine alınmıştır.
3. Çalkalayıcı üzerinde bantlar görülünceye kadar yaklaşık 1 saat çalkalanmıştır (172).

Western Blot'lama

Western Blot Yöntemi

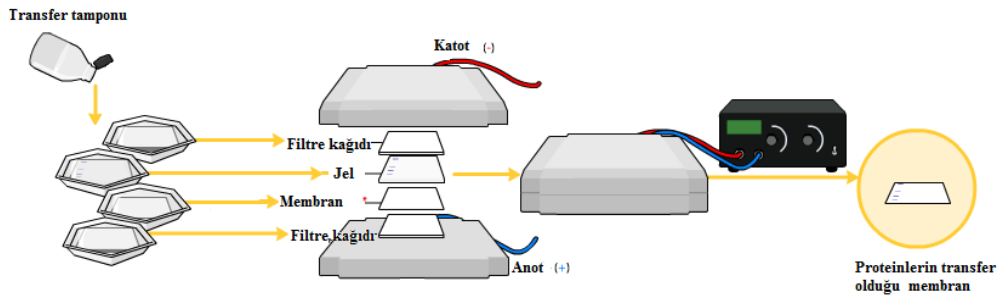
Blot'lama işlemi, SDS-PAGE işlemi sonucunda jelde moleküler ağırlıklarına göre göç etmiş proteinlerden özel bir proteinin varlığının belirlenmesi için kullanılan yöntemdir. Jelde molekül ağırlıklarına göre ayrılmış proteinler bir membrana transfer edilir. Membran olarak nitroselüloz veya PVDF kullanılmaktadır. Membrana aktarılmış proteinlere bağlanabilecek özellikte birincil poliklonal veya monoklonal antikor ile tepkime reaksiyonu gerçekleştirilir. Antikorlara bağlanabilen radyoaktif izotop bağlı ikincil antikor veya enzimlerle (alkalen fosfataz veya peroksidaz enzimleri) muamele edilerek membran üzerinde hedeflenen proteinin yerinin belirlenmesi sağlanır (Şekil 18) (Wenk ve Fernandis, 2007).



Şekil 18. Western Blot'lama (<http-8>)

Western blot'lama için firmanın protokolüne uygun işlem yapılmıştır (Şekil 19). Membran olarak Millipore marka Immobilon-P^{sq} PVDF (Polivinilidin Diflorür), antikorlama ve diğer enzimler için Pierce® Fast Western Blot kiti kullanılmıştır. Antikor, HRP ve ECL çalışma çözeltileri bu kit kullanılarak hazırlanmıştır. Western Blot'lamanın ardından Luminol çözeltisi kiti kullanılarak membran üzerindeki sinyaller artırılmıştır.

Blotlama da primer antikor olarak insan Bcl-2 proteininin 1-205 aminoasitlik bölgesine karakterize fare Bcl-2 monoklonal antikor (Bcl-2(C-2), Santa Cruz Biotechnology) kullanılmıştır.



Şekil 19. Western Blot'lama protokolü (<http-7>)

Kullanılan Çözeltiler

Transfer Tamponu (pH 8.5)

250 mM Trizma baz	30.28 g
192 mM Glisin	144.13 g
Metanol	200 mL
Distile su	1 L

1X Yıkama Tamponu (100 mL)

10X Yıkama tamponu	10 mL
Distile su	90 mL

Primer Antikor Çözeltisi (10 mL, 1 µg/mL)

Antikor çözeltisi (200 µg/mL)	50 µL
Seyreltik antikor	9950 mL

HRP Çözeltisi (10 mL)

HRP Reaktifi	1 mL
Seyreltik antikor	9 mL

ECL Çalışma Çözeltisi (10 mL)

Çalışma çözeltisi 1	5 mL
Çalışma çözeltisi 2	5 mL

1X TBS Yıkama tamponu (pH 7.4)

Tris-HCl, NaCl, Tween® 20

Western Blot Uygulaması

1. *Blot*lama işlemi başlamadan önce jel boyutunda kesilmiş PVDF membranı metanolde 1-2 dakika bekletilerek iyice ıslanması sağlanmıştır. Daha sonra sudan geçirilip transfer tamponu içerisinde bir süre bekletilmiştir.
2. Elektroforez tankından çıkarılan jel distile su ile yıkanmıştır.
3. *Blot*lama cihazına alttan başlayarak (pozitif kısım) jel boyutunda kesilmiş ve transfer tamponda ıslatılmış 3 adet *Whatman* kâğıdı konulmuş, üzerine membran dikkatlice yerleştirilmiştir.
4. Membranın üzerine jel tek seferde kaydırma yapmadan ve membran ile arasında hiçbir hava kabarcığı kalmasına izin verilmeden yerleştirilmiş ve üzerine pipet yardımıyla hafifçe bastırılarak oluşan hava kabarcıkları yok edilmiştir.
5. Jelin üzerine yine transfer tamponda ıslatılmış 3 adet *Whatman* kâğıdı yerleştirilmiştir. Cihazın negatif yüklü üst kapağı kapatıldıktan sonra cihaz 10 V ve 125 mA'de 1 saat 15 dakika çalıştırılmıştır.

6. *Blot* lama bittikten sonra antikorlama işlemine geçilmiştir. Antikorlama için *Whatman* kağıtları arasından membran dikkatlice alınmış ve çalkalayıcı üzerinde yıkama çözeltisi ile 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır.
7. primer antikor çözeltisi (*Bcl-2 (C-2) Santa Cruz Biotechnoogy*) A549 hücreleri için 1:200, MCF-/ hücreleri için 1:500 oranında hazırlanmış (10 mL) ve membran üzerine dökülerek oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerinde 30 dakika bekletilmiştir.
8. Membran temiz kaba alınmış, üzerine HRP çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığındaki çalkalayıcı üzerinde 10 dakika bekletilmiştir.
9. 10 dakika sonunda temiz kaba alınan membran 1 X yıkama çözeltisi ile 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır.
10. Yıkama işleminden sonra membrana ECL çalışma çözeltisi eklenerek 1-5 dakika beklenmiş ve luminol kiti ile sinyal güçlendirilmesi işlemi yapılmıştır.
11. ECL çalışma çözeltisinden alınan membran 1 X TBS tamponu ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır.
12. Kit içerisindeki A ve B çözeltileri membran başına 0.125 mL/cm² olacak şekilde eşit hacimde hazırlanmıştır. Membranın TBS ile yıkanmasından sonra fazla TBS süzölmüş ve Luminol çözeltisinde oda sıcaklığında 1 dakika bekletilmiştir.
13. Fazla Luminol çözeltisi süzöldükten sonra membran CCD kameralı görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

İstatistiksel analiz

Formülasyonların transfeksiyon etkinlik değerlendirmesi istatistiksel olarak çiftleştirilmiş t-testi ve bağımsız örneklerde t-testi kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

siRNA yeni jenerasyon biyofarmasötik madde olarak öne çıkmaktadır. siRNA'nın tedavi edici potansiyelini destekleyen birçok çalışma vardır. Farklı araştırmacılar ve biyoteknoloji şirketleri siRNA'nın hücre sitoplazmasına taşınması için çeşitli vektörler kullanmıştır; ancak kullanılan vektörlerin *in vivo* etkinliği genellikle düşük çıkmaktadır. Günümüzdeki siRNA ile ilgili klinik çalışmalar göz ve akciğer gibi hedef bölgelere doğrudan uygulama ile yapılmaktadır.

Farklı hastalıklarda hem sistemik hem de lokal olarak uygulanabilecek siRNA taşıma vektörlerinin geliştirilmesi büyük önem kazanmıştır (Oh ve Park, 2009). siRNA taşıma vektörlerinin geliştirilmesinde, vektörün parçacık boyutu, zeta potansiyel değeri, serum içerisinde siRNA yüklü parçacıkların kararlılığı, genetik materyali hücre sitoplazmasına kadar taşıyabilmesi ve endojen RISC ile siRNA'nın etkileşebilmesi için sitoplazma içerisinde salım gibi konulara dikkat edilmesi gerekmektedir (Aigner, 2007, Howard, 2009).

Bu çalışmada Gelucire® 50/13, Precirol® ATO5 lipitleri ve suda çözünen değişik molekül ağırlığındaki kitosan (1 kDa, 1 kDa-3kDa, 3 kDa-5 kDa, 10 kDa) ile yapılan analizlerde yukarıda bahsedilen konulara özen gösterilmiştir.

Katı Lipitler ile Yapılan Formülasyon Çalışmaları

KLN'lerin pDNA bağlayabildiğini Olbrich ve ark.'nın (2001) göstermesinden sonra, diğer sistemlere göre çeşitli uygulama ve üretim avantajları ile KLN'lerin gen tedavisindeki önemi artmıştır. Günümüze kadar KLN ve pDNA bileşimleri ile yapılan birçok çalışmada olumlu sonuçlar elde edilmiştir. KLN'lerin genetik materyali taşınmasına karşın siRNA ile olan çalışmaları sınırlıdır (Kim ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasında hücre içerisine siRNA taşınmasını sağlayabilecek KLN sistemi hazırlanmıştır. KLNlerde iki çeşit katı lipit (Precirol® ATO5 ve Gelucire® 50/13) seçilmiş ve iki farklı hazırlama yöntemi (su içinde-yağ basit emülsiyon oluşturma ve sonikasyon tekniği) kullanılmıştır.

Parçacık Büyüklüğü Dağılımı

In vitro ve *in vivo* çalışmaları etkilediği için farmasötik uygulamalarda parçacık büyüklüğü çok önemli bir özelliktir. Parçacık büyüklüğü fiziksel kararlılığı, lipit parçacıkların biyolojik yıkımını ve yüklenmiş maddenin salım hızını etkilemektedir (Ekambaram ve ark., 2012). Ayrıca dolaşım sisteminde makrofajlar tarafından yakalanma durumu ve biyolojik kararlılık da etkilenmektedir. Parçacık boyutunun artması ile fagositozun artması ve pinositozun azalması parçacıkların biyodağılımında önemli etmendir. Taşıyıcı sistemlerde parçacık büyüklüğünün ve dağılımının belirlenmesi, hazırlanan sistemin amaca uygunluğunun tayin edilmesinde, kullanılan maddenin ve yöntemin seçilmesinde ve sistemin kararlılığının belirlenmesinde önem taşır (Müller, 2000).

Parçacık büyüklüğü genetik materyal taşıyıcı sistemlerde de özellikle transfeksiyonun değerlendirilmesi için en önemli parametrelerden birisidir. Etkili transfeksiyon için en uygun parçacık boyutu henüz belirlenmemiştir. Yapılan çalışmalar yaklaşık 200 nm çapındaki parçacıkların hücre içine alımda ve

transfeksiyon etkinliğinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Büyük parçacık boyutlarının küçüklere göre hücre üzerine kolayca yerleşebildiği ancak hücre içine alımda problem çıkardığı belirlenmiştir (Rao, 2010).

Nanopartiküllerin hazırlama yöntemi parçacık büyüklüğü ve dağılımını etkilemektedir. Özellikle formülasyon bileşimi, üretim yöntemi, uygulanan basınç, kullanılan yüzey etkin madde tipi ve miktarı önemli etmenlerdir. Belirli miktara kadar artırılan yüzey etkin madde miktarı ve karıştırma hızı ve süresindeki değişimin parçacık büyüklüğünü etkilediği belirtilmiştir (Demirel ve Yazan, 2000). Bununla birlikte düşük üretim sıcaklığı, düşük yüzey etkin madde ve lipit (% 5-10) miktarı daha büyük ve heterojen dağılımlı parçacıkların oluşumuna neden olmaktadır (Ekambaram ve ark., 2012).

Parçacık büyüklüğünün ölçülmesinde mikroskop, *coulter* sayıcısı, lazer ışık saçılımı cihazı ve foton korelasyon spektroskopisi kullanılabilir (Gürsoy, 2002). Bu çalışmada katı lipit ile hazırlanan formülasyonların parçacık büyüklük dağılımı foton korelasyon yöntemi kullanılarak Zetasizer NanoS cihazı ile ölçülmüştür (sayfa 37).

Yüksek Hızda Hazırlanan KLNlerin Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı

Yüksek hızda karıştırarak elde edilen formülasyonlarda parçacık boyutu genellikle nanometre (100-400 nm) düzeyindedir (Rudolph ve ark., 2004). Aynı zamanda emülsifiye edici ajan/ajanlar % 4-5 konsantrasyonda kullanıldığında da ufak parçacık boyutu elde edilmektedir (Asasutjarit ve ark., 2007).

Literatürde yüksek devir ile karıştırma sırasında parçacıklar arasında artan kinetik enerjinin parçacık büyümesine neden olduğu belirtilmiştir (Ekambaram ve ark., 2012). Bu nedenle ön formülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen karıştırma süresi ortam sıcaklığını korumak amacıyla 5 dakikanın altında tutulmuştur.

Gelucire® 50/13 ile hazırlanan formülasyonun şeffaf-beyaz görünümüne karşın Precirol® ATO5 ile hazırlanan formülasyonun görünümünün süt beyazı olduğu gözlenmiştir. Yapılan ön formülasyon çalışmalarında parçacık boyutunun artması ile formülasyonların şeffaf görüntüden süt beyazı görünümüne döndüğü belirlenmiştir. Formülasyonların parçacık boyutu karşılaştırıldığında Precirol® ATO5 ile hazırlanan formülasyondaki boyutun Gelucire® 50/13 ile hazırlanandan daha büyük olduğu saptanmıştır.

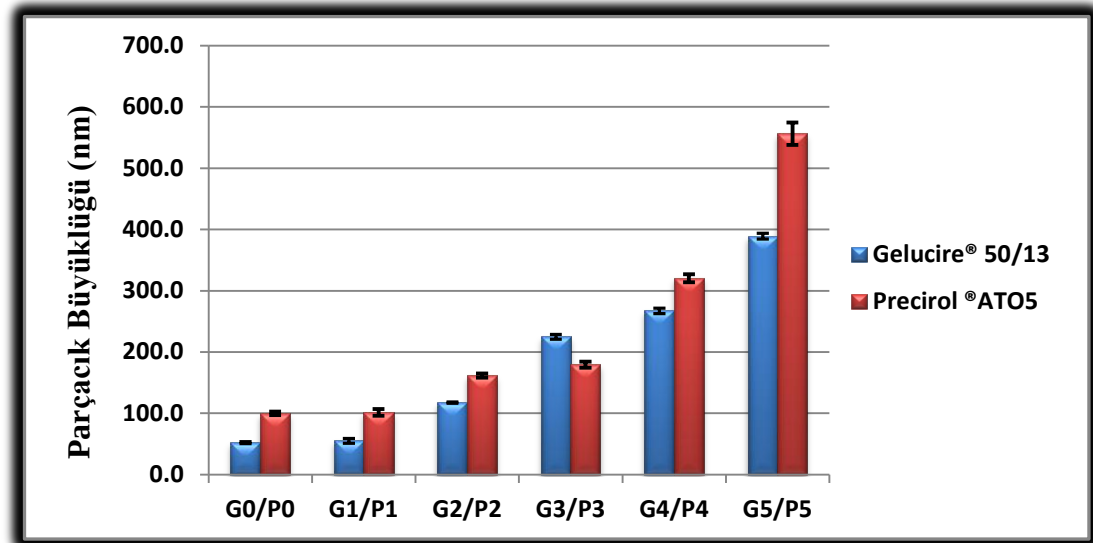
Parçacıklara pozitif yük kazandırılması amacıyla eklenen artan miktarda oktadesilamin'in Gelucire® 50/13 ile hazırlanan formülasyonda şeffaf-beyaz rengi süt beyazına doğru kaydırıldığı gözlenmiştir. Bu durum oktadesilamin'in artan miktarda eklenmesinin parçacık boyutunun büyümesine neden olduğunu görsel olarak ifade etmektedir. Bu sonuç analiz ile de desteklenmiştir. Oktadesilamin'in parçacık boyutu üzerindeki benzer etkisi Precirol® ATO5 ile hazırlanan formülasyonda da saptanmıştır (Çizelge 10, Şekil 20).

Çizelge 10. Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLN'lerin ortalama parçacık büyüklüğü ve polidispersite indisi

	G0	G1	G2	G3	G4	G5
Ortalama Parçacık Boyutu (nm) $\pm$ SH	52.04 $\pm$ 1.58	55.16 $\pm$ 3.95	117.43 $\pm$ 0.87	224.80 $\pm$ 3.79	267.20 $\pm$ 4.52	388.90 $\pm$ 4.64
PI $\pm$ SH	0.28 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.10	0.26 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.07

	P0	P1	P2	P3	P4	P5
Ortalama Parçacık Boyutu (nm) $\pm$ SH	100.00 $\pm$ 2.77	101.50 $\pm$ 5.62	161.60 $\pm$ 3.61	179.47 $\pm$ 4.83	320.33 $\pm$ 6.41	556.37 $\pm$ 18.20
PI $\pm$ SH	0.20 $\pm$ 1.23	0.29 $\pm$ 3.42	0.32 $\pm$ 3.67	0.53 $\pm$ 3.50	0.31 $\pm$ 4.31	0.42 $\pm$ 5.63

SH: Standart Hata, PI: Polidispersite İndisi, n=3



Şekil 20. Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLN'lerin ortalama parçacık büyüklüğü

Yapılan analiz sonuçlarına göre Gelucire® 50/13 ve Precirol® ATO5 ile hazırlanan tüm formülasyonlarda parçacıkların nanoboyutta olduğu ve eklenen oktadesilamin'in artan miktarının parçacık boyutunda artışa yol açtığı saptanmıştır. Gelucire® 50/13 ve oktadesilamin ile hazırlanan formülasyonun parçacık boyutunun Precirol® ATO5 ve oktadesilamin ile hazırlanan formülasyonla karşılaştırıldığında daha ufak olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, hücre içine alımda ve transfeksiyon etkinliğinde optimum parçacık boyutunun

yaklaşık 200 nm olduğu düşünüldüğünde, transfeksiyon çalışmaları için Gelucire® 50/13 ile hazırlanan formülasyonun tercih edileceği açıktır.

Parçacık büyüklüğü dağılımını gösteren polidispersite indisi 0.01 ile 0.7 arasında ise monodispers sistemlerden söz edilir. 0.7'nin üstünde olan indis değeri ise geniş parçacık büyüklüğü dağılımına sahip sistemleri işaret eder (Nıdhin ve ark., 2008). Bu çalışmada hazırlanan KLNlerin polidispersite değeri 0.7'nin altında olduğundan homojen bir dağılımdan söz edilebilir.

Sonikasyon ile Hazırlanan KLNlerin Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı

Sonikasyon ile KLN hazırlama yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak parçacık boyutu ve polidispersite indisini azaltmak için uygulanan uzun sonikasyon süresinin metal kontaminasyona neden olduğu literatürde belirtilmiştir (Mehnert ve Mäder, 2001). Gambhire ve ark.'nın (2011) Compritol® ATO888 kullandıkları çalışmada 3 dakika sonikasyon süresi sonucu yaklaşık 219-348 nm büyüklüğüne sahip parçacıklar elde edilmiştir. Sonikasyon süresinin artması parçacık büyüklüğünü azaltmıştır. Bu durum daha önce yapılan çalışmada da gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2011).

Upadhyay ve ark. (2012) tamoksifen içeren KLNleri 16.000-28.000 rpm arasında yüksek hızda karıştırma ve 5-20 dakika arasında sonikasyon sürelerini kullanarak hazırlamıştır. Hazırladıkları formülasyonların parçacık boyutunun 95-152 nm arasında olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise genetik materyalin hasar görmeden enkapsülasyon işlemi için sonikasyon süresinin % 20 güçte 1-2 dakika olmasına karar verilmiştir.

Her iki lipit için uygulanan sonikasyon yönteminde Precirol® ATO5 ile hazırlanan formülasyonda kremalaşma gözlemlendiğinden bu lipit ile çalışmalar sürdürülmemiştir.

Gelucire® 50/13 ile yapılan çalışmada % 2 lipit içeren S1 ve S2 formülasyonları karşılaştırıldığında oktadesilaminin parçacık boyutunu arttırdığı gözlenmiştir (**Çizelge 11**). 1 dak sonikasyon uygulamasının 2 dak uygulama ile benzer parçacık boyutlu dispersiyonlar oluşturduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak sonikasyon süresinin parçacık boyutunu küçültmede S1 ve S2 formülasyonları için çok etkili olmadığı saptanmıştır.

% 4 lipit içeren ancak oktadesilamin içermeyen S3 formülasyonu oktadesilamin içeren S4 ve S5 formülasyonları ile karşılaştırıldığında parçacık boyutunun arttığı gözlenmiştir. S3 için de uygulanan sonikasyon süresinin parçacık boyutuna etkisiz olduğu belirlenmiştir.

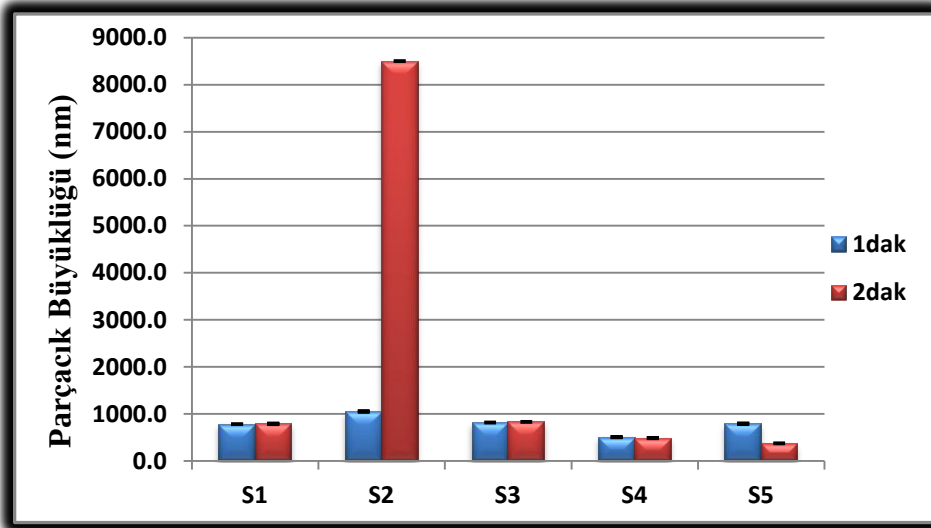
Yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan KLNlerde artan miktarda oktadesilamin kullanımı parçacık boyutunu arttırmıştır. Ancak sonikasyon ile hazırlanan S4 ve S5 formülasyonunun parçacık boyutunun oktadesilamin içermeyen S3 formülasyonuna oranla daha düşük olduğu saptanmıştır. Oktadesilamin içeren S4 ve S5 formülasyonlarının parçacık boyutları karşılaştırıldığında 1 dak sonikasyon sonrasında S4'ün, 2 dak sonikasyon sonrasında ise S5'in daha ufak parçacık boyutuna sahip olduğu saptanmıştır. Parçacık boyutu yüksek hızda karıştırma ile hazırlanan formülasyonla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Hazırlanan formülasyonların parçacık boyutu ve dağılımı aynı analiz yöntemi (sayfa 37) ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 11 ve Şekil 21’de verilmiştir.

Çizelge 11. Sonikasyon ile hazırlanan KLN’lerin lipid oranı ve farklı sonikasyon süreleri için parçacık büyüklüğü ve ve polidispersite indisi

	S1		S2		S3		S4		S5	
	1 dak	2 dak	1 dak	2 dak	1 dak	2 dak	1 dak	2 dak	1 dak	2 dak
Ortalama Büyüklük (nm) ± SH	784.60 ± 1.70	791.80 ± 3.63	1054.30 ± 4.01	8498.30 ± 0.98	819.70 ± 1.71	833.00 ± 1.12	508.00 ± 2.20	487.90 ± 2.01	783.13 ± 2.46	379.60 ± 2.34
PI ± SH	0.72 ± 0.05	0.67 ± 0.12	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.40 ± 0.17	0.90 ± 1.13	0.40 ± 1.15	0.50 ± 0.76	0.62 ± 0.07	0.93 ± 0.08

SH: Standart Hata, PI: Polidispersite İndisi, n=3



Şekil 21. Sonikasyon ile hazırlanan KLN’lerin lipid oranı ve farklı sonikasyon süreleri için parçacık büyüklüğü

Elde edilen sonuçlara göre sonikasyon ile hazırlama tekniğinde oktadesilamin miktarının parçacık boyutunun büyümesinde etkili olmadığı kanısına varılmıştır. 2 dak sonikasyon uygulanmış S5 formülasyonunun oktadesilamin miktarının artması ile yüzey yükünün arttığı ve parçacık boyutunun diğer formülasyonlara göre daha düşük olması nedeni ile en uygun formülasyon olabileceği düşünülmüştür.

Organik çözücü ile hazırlanan formülasyonda ortamda organik çözücü artığının kalması sitotoksisiteyi arttırmaktadır (Legrand ve ark., 2007; Almeida ve Souto, 2007). Formülasyon hazırlanması sırasında kompleks oluşturmamayan katı lipitin, katyonik ajanın ve organik çözücü kullanıldığı için çözücü uçurulması sonucu

kalan çözücü artığının uzaklaştırılması amacıyla diyaliz ve filtrasyon işlemi yapılmış ve bu işlemlerin formülasyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Literatürde diyaliz işleminin polidispersite indisini etkilediği rapor edilmiştir (Legrand ve ark., 2007). Bu çalışmada hazırlanan formülasyonun polidispersite indisinin diyaliz sonrasında düştüğü saptanmıştır.

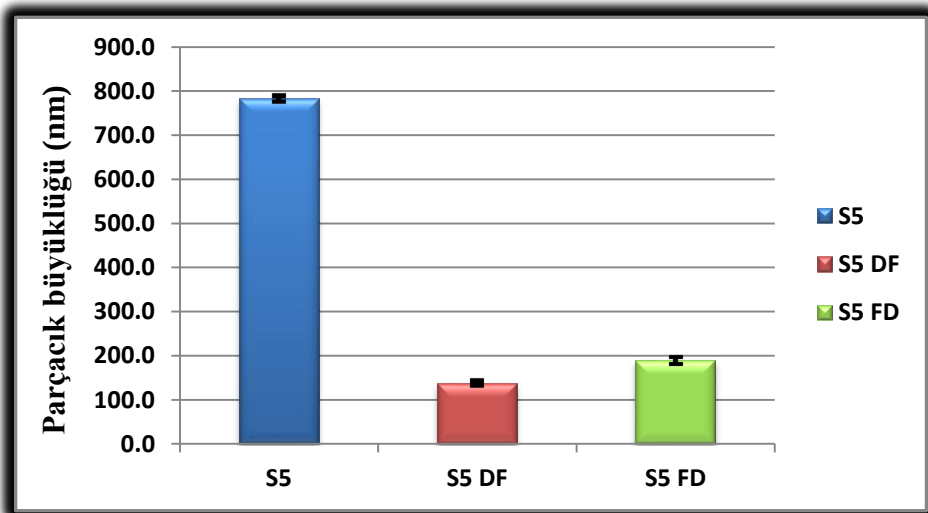
Hazırlanan formülasyonların yoğunluğunun düşük olması nedeniyle santrifüj işlemi uygulanamamıştır. Bu nedenle filtrasyon işlemi hem sterilizasyon hem de diyalizin neden olduğu heterojen parçacık büyüklüğü dağılımını düzeltmek için kullanılmıştır.

siRNA'nın enkapsüle edilmediği boş formülasyonda da diyaliz ve filtrasyon işlemi yapılmış ve parçacık büyüklüğü açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlar Çizelge 12 ve Şekil 22'de verilmiştir.

Çizelge 12. S5 formülasyonunun diyaliz-filtrasyon ve filtrasyon-diyaliz sonrası ortalama parçacık büyüklüğü

	S5		
	S5	S5 DF	S5 FD
Ortalama Büyüklük (nm) ± SH	783.13 ± 1.99	137.03 ± 2.24	188.52 ± 0.50
PI ± SH	0.62 ± 0.07	0.31 ± 0.03	0.34 ± 0.04

SH: Standart Hata, PI: Polidispersite İndisi, n=3



Şekil 22. S5 formülasyonunun diyaliz-filtrasyon ve filtrasyon-diyaliz sonrası ortalama parçacık büyüklüğü

S5 formülasyonunun sonikasyondan hemen sonraki parçacık büyüklüğü 783.13 nm olarak belirlenmiştir. Formülasyon diyaliz edildikten sonra filtrasyon uygulandığında parçacık büyüklüğü 137.03 nm'ye kadar düşmektedir. Filtrasyonun ardından diyaliz işlemi uygulandığında ise hafif bir artış (188.52 nm) gözlenmiştir. Bu durum diyaliz süresinde parçacıkların birleşme eğiliminde olduğunu göstermektedir. Formülasyonlara yalnızca diyaliz uygulandığında parçacık boyutunun 655 nm olması bu düşüncüyü doğrulamaktadır.

Zeta Potansiyel Değeri

Yüksek Hızda Karıştırma ile Hazırlanan KLNlerin Zeta Potansiyeli

Kolloidal parçacıklar dispersiyon ortamından iyon adsorbe ederek pozitif veya negatif olarak yüklenir. Her parçacık pozitif ve negatif yüklü oluşuna göre zıt yüklü iyonlarla çevrenir ve tek tabakalı moleküler tabaka oluşturur. Bu tabakanın etrafında parçacığa bağlı olmayan hareketli ikinci bir iyon tabakası bulunur. Bu tabakaya *Helmholtz çift tabakası* veya *difüze çift tabaka* denir. Parçacık yüzeyine yapışmış elektriksel tabakanın potansiyeline *elektrotermodinamik potansiyel* veya *Nernst potansiyeli* denir. Bu çift tabakanın dışında pozitif ve negatif iyonların birbirine eşit olduğu bir de nötral alan bulunmaktadır. Parçacığın yüzeyi ile nötral bölge arasındaki potansiyel farkı 'zeta potansiyel' olarak adlandırılır. Zeta potansiyel ölçümleri elektriksel alan içerisindeki elektroforetik hareketlerden yararlanılarak zetametre denilen aletle ölçülür ve birimi milivoltur (mV) (Çelebi, 2002; Öner, 2004).

Kasyonik lipit ilişkili transfeksiyonda bazı faktörler transfeksiyon etkinliğini belirlemektedir. Bunlardan en önemlisi DNA veya RNA'nın lipide oranıdır çünkü negatif yüklü siRNA/DNA pozitif yüklü lipit veya polimerle etkileşim kurmaktadır. Bununla birlikte kompleks oluşturduktan sonra hücre membranı ile etkili bir temas için net yük pozitif olmalıdır (Yang ve Huang, 1997).

Bu çalışmada KLN'lerin zeta potansiyel değeri Zetasizer NanoS cihazı ile ölçülmüştür. Distile sudaki iletkenliğin neden olabileceği küçük değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için kullanılan distile su ölçümden önce 50 µS iletkenliğe NaCl ile ayarlanmış ve formülasyon filtre edildikten sonra bu su ile seyreltilmiştir (1:10). Sonuçlar **Çizelge 13** ve **Şekil 23**'de verilmiştir.

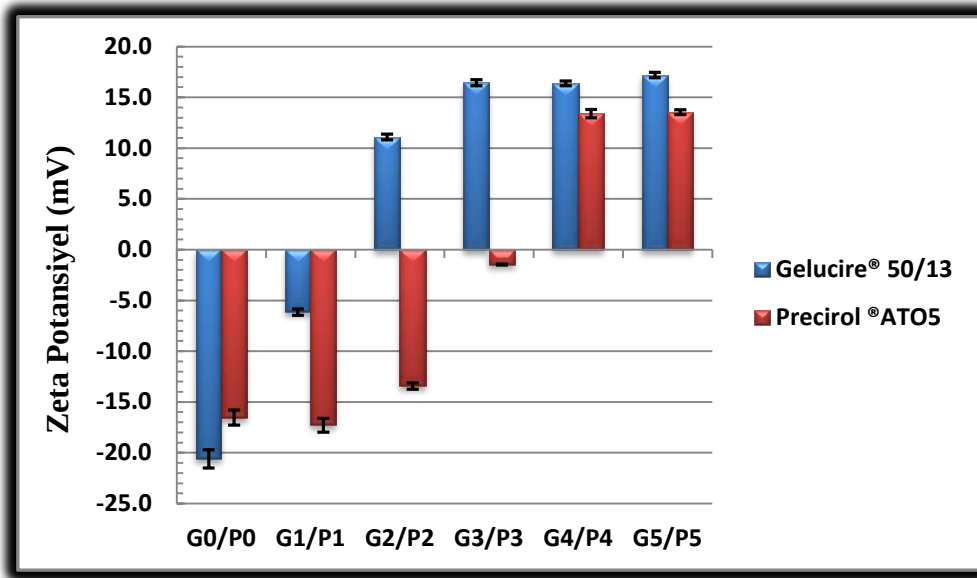
Çizelge 13. Yüksek hızda emülsifikasyon tekniği ile hazırlanan KLNlerin zeta potansiyeli

	G0	G1	G2	G3	G4	G5
Zeta potansiyel (mV)	-20.60	-6.15	11.10	16.43	16.37	17.19
± SH	± 0.90	± 0.31	± 0.28	± 0.30	± 0.24	± 0.27

SH: Standart Hata, n=3

	P0	P1	P2	P3	P4	P5
Zeta potansiyel (mV)	-16.53	-17.30	-13.43	-1.46	13.40	13.50
± SH	± 0.74	± 0.67	± 0.32	± 0.04	± 0.42	± 0.24

SH: Standart Hata, n=3



Şekil 23. Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLN'lerin zeta potansiyeli

Zeta potansiyel analizinde katyonik ajan oktadesilamin eklenmeden hazırlanan formülasyonda parçacıkların yüzey yüklerinin negatif (G0 için -20.60 ve P0 için -16.53) olduğu bulunmuştur. Oktadesilamin eklendikten sonra parçacıkların yüzey yükleri öngörüldüğü üzere pozitif değerlere yükselmiştir. Artan oktadesilamin miktarı Gelucire® 50/13 ve Precirol® ATO5 formülasyonlarında zeta potansiyelin artışı sağlarken belirli bir konsantrasyondan (Gelucire® 50/13 için % 0.25 - % 1.25 ve Precirol® ATO5 için % 0.5 - % 1.25) sonra artış gözlenmemiştir (**Çizelge 2**). Buna göre (**Çizelge 13 ve Şekil 23**) Gelucire® 50/13 kullanılan formülasyondaki artan oktadesilamin miktarı ile G1 formülasyonu pozitif değere ulaşmamış ancak G3, G4 ve G5 formülasyonlarına artan miktarda oktadesilamin eklenmesi ile zeta potansiyelinde aynı oranda artış (+16.43 mV, -17.19 mV) görülmüştür. Gelucire® 50/13 ve Precirol® ATO5'e eklenen oktadesilamin miktarının belirli bir konsantrasyona kadar pozitif özellik verdiği ancak daha yüksek konsantrasyonda bu özelliği değiştirmediği saptanmıştır. Bu sonuca göre formülasyon içindeki oktadesilamin miktarının artırılması ile zeta potansiyelin doğru orantılı olarak artmadığı belirlenmiştir. Parçacık boyutu analizinde oktadesilamin miktarının artması ile parçacık boyutunun arttığı belirlendiğinden ve parçacık boyutu büyümesinin transfeksiyon çalışmalarında etkinliği azaltacağı bilindiğinden G4 ve G5 formülasyonları için transfeksiyon çalışmalarına gerek görülmemiştir. Transfeksiyon ve sitotoksite çalışmaları için G2 ve G3 formülasyonları seçilmiştir.

Benzer değerlendirme Precirol® ATO5 ile yapılan formülasyon için düşünüldüğünde parçacık boyutu büyük olmasına karşın zeta potansiyeli pozitif olan P4 formülasyonu için sitotoksite ve transfeksiyon araştırmasının yapılması planlanmıştır. P5 formülasyonunun P4 ile aynı değerde yüzey yüküne sahip olmasına rağmen parçacık boyutunun daha büyük (556.37 nm) olması nedeni ile P5 formülasyonu değerlendirmeye alınmamıştır.

Sonikasyon ile Hazırlanan KLN'lerin Zeta Potansiyeli

Zhu ve ark.'nın (2011) yaptığı çalışmada, hazırlanan DNA yüklü KLN/PLGA nanoparçacıklarına uygulanan 1.5 dakikalık sonikasyon süresi sonunda yaklaşık 300-350 nm parçacık büyüklüğü elde edilirken zeta potansiyel değeri pH'ya bağlı olarak -10 mV ile +10 mV arasında değişmiştir.

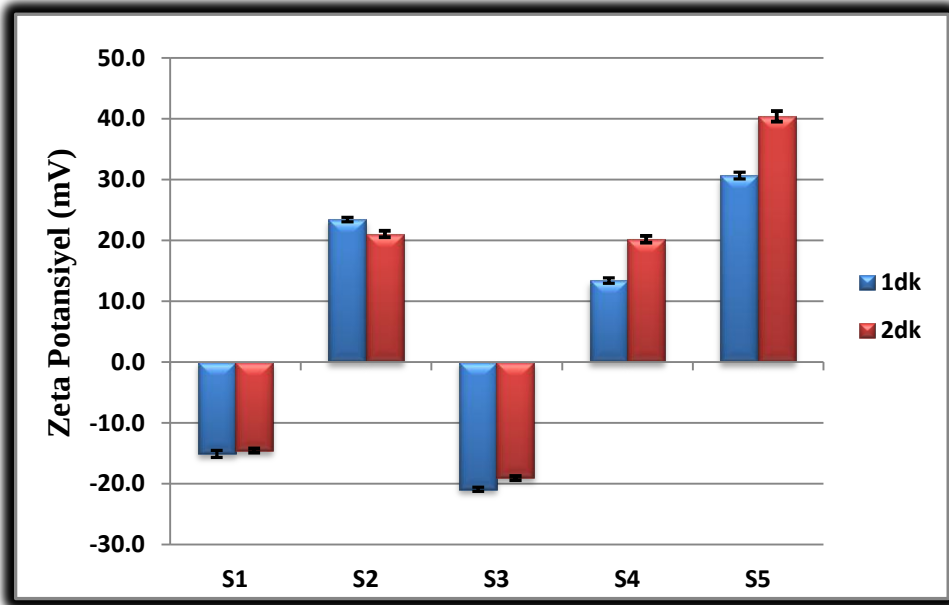
Bu çalışmada sonikasyon işlemi ile hazırlanan formülasyonda oktadesilamin miktarının artması yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLNlerde olduğu gibi zeta potansiyelin artışına yol açmıştır. Bu artış tüm formülasyonlar için gözlenmiştir. Sonikasyon süresi S1, S2 ve S3 formülasyonlarının zeta potansiyelinde fark oluşturmazken S4 ve S5 formülasyonlarında artışa neden olmuştur. Parçacık boyutu değerlendirildiğinde en uygun olarak seçilen S5'in en yüksek zeta potansiyel değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle transfeksiyon çalışmalarında S5'in kullanılmasına karar verilmiştir.

Sonikasyon ile hazırlanan formülasyonların zeta potansiyeli **Çizelge 14**'de ve **Şekil 24**'de gösterilmiştir.

Çizelge 14. Sonikasyon ile hazırlanan KLN'lerin lipit oranı ve farklı sonikasyon süreleri için zeta potansiyeli

	S1		S2		S3		S4		S5	
	1 dak	2 dak	1 dak	2 dak	1 dak	2 dak	1 dak	2 dak	1 dak	2 dak
Zeta Potansiyel (mV) $\pm$ SH	-15.10 $\pm$ 0.59	-14.57 $\pm$ 0.33	23.43 $\pm$ 0.36	21.07 $\pm$ 0.54	-20.93 $\pm$ 0.35	-19.07 $\pm$ 0.33	13.40 $\pm$ 0.43	20.20 $\pm$ 0.55	33.03 $\pm$ 1.62	40.40 $\pm$ 2.34

SH: Standart Hata, n=3



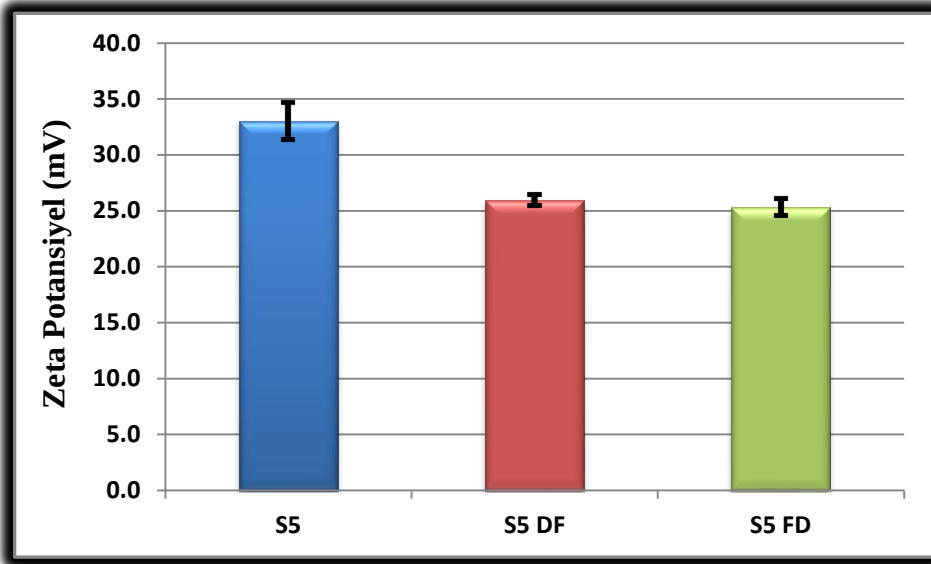
Şekil 24. Sonikasyon ile hazırlanan KLN'lerin lipit oranı ve farklı sonikasyon süreleri için zeta potansiyeli

S5 formülasyonuna organik çözücünün tamamen uçurulması amacıyla diyaliz uygulanmıştır. Diyalizin zeta potansiyel değerine etkisi araştırılmıştır ve sonuçları Çizelge 15’de ve Şekil 25’de verilmiştir.

Çizelge 15. S5 formülasyonunun diyaliz-filtrasyon ve filtrasyon-diyaliz sonrası zeta potansiyeli

	S5		
	S5	S5 DF	S5 FD
Zeta Potansiyel (mV) ± SH	33.03 ± 1.62	25.93 ± 0.49	25.30 ± 0.73

SH: Standart Hata, n=3



Şekil 25. S5 formülasyonunun diyaliz-filtrasyon ve filtrasyon-diyaliz sonrası zeta potansiyeli

Zeta potansiyel değerleri incelendiğinde, hazırlama anında 33.3 mV olan zeta potansiyelin diyaliz-filtrasyonun ardından 25.3 mV’a kadar düştüğü görülmüştür.

Kitosan ile Yapılan Formülasyon Çalışmaları

Polimerik parçacıklar arasında kitosan taşıma vektörleri genetik materyal için güvenli ve oldukça etkili olması nedeniyle diğer polimerik maddelere göre üstün biyomateryaldir (Zhang ve ark., 2007).

Suda çözünmeyen etkin maddelerin çözünürlük ve biyoyararlanımını artırmak amacıyla kitosan ve etkin madde çözeltisi karışımı kurutularak katı formülasyon hazırlanmaktadır. Katı formülasyonda kalan asit kalıntısı nedeniyle etkin madde bozunması, etkinliğini kaybetmesi ve kararlılığının azalması sık karşılaşılan durumdur. Son yıllarda suda çözünmeyen etkin maddenin çözünürlük ve

biyoyararlanımı suda çözünen kitosan türevi ile artırılarak bu sorun aşılmaya çalışılmaktadır (Kim ve ark., 2006). Bu nedenle bu çalışmada suda çözünen kitosanlar tercih edilmiştir. Formülasyonlarda farklı molekül ağırlığına (1 kDa, 1 kDa-3 kDa, 3 kDa-5 kDa ve 10 kDa) sahip dört çeşit kitosan kullanılmıştır.

Parçacık Büyüklüğü ve Dağılımı

KLNlerde olduğu gibi kitosan sistemlerinde de parçacık boyutu ve zeta potansiyel değerinin hücresel alım mekanizmasında önemli katkısı bulunmaktadır. Ufak parçacık boyutu ve yüksek zeta potansiyel değerinin parçacıkların hedef bölgeye ulaşmasında etkin olduğu belirtilmiştir (Jiang ve ark., 2009).

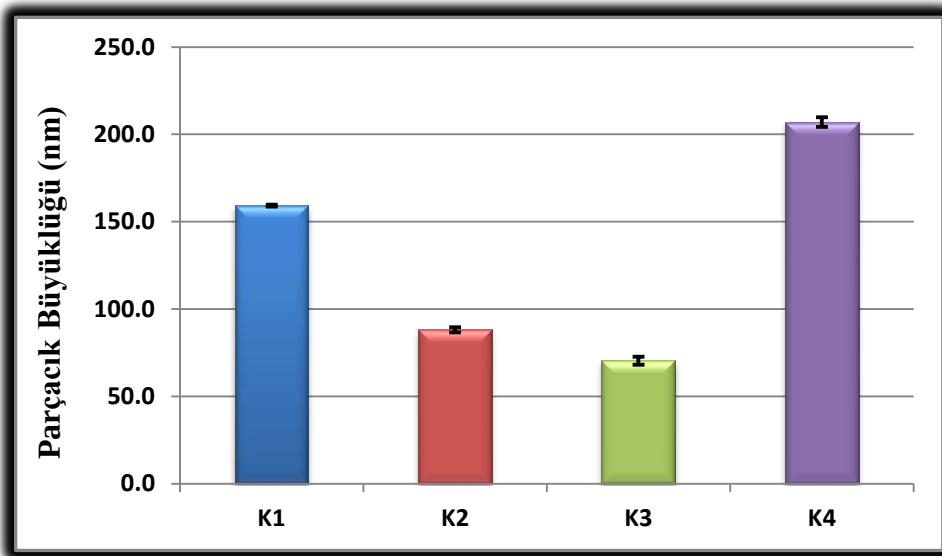
Kitosan ile yapılan çalışmalarda parçacık boyutu üzerine etkisi olan parametrelerin kitosanın molekül ağırlığı, asetilasyon derecesi, hazırlanış biçimi ve nükleik asit/kitosan molar oranı olduğu saptanmıştır (deMartimprey ve ark., 2009). Kitosanın molekül ağırlığının artmasıyla parçacık boyutunun arttığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada farklı molekül ağırlığında (1 kDa, 1 kDa-3 kDa, 3 kDa-5 kDa ve 10 kDa) kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların parçacık büyüklüğü ve dağılımı **Çizelge 16**'da ve **Şekil 26**'de gösterilmiştir.

Çizelge 16. Kitosan formülasyonlarının parçacık büyüklüğü

	K1	K2	K3	K4
Ortalama Parçacık Büyüklüğü (nm) $\pm$ SH	159.23 $\pm$ 0.59	88.07 $\pm$ 1.43	70.35 $\pm$ 2.30	207.07 $\pm$ 2.79
PI $\pm$ SH	0.78 $\pm$ 0.02	0.65 $\pm$ 0.07	0.47 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.09

SH: Standart Hata, PI: Polidispersite İndisi, n=3



Şekil 26. Kitosan formülasyonlarının parçacık büyüklüğü

Yüksek molekül ağırlığına sahip K4 formülasyonunun en yüksek parçacık boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir. K3 formülasyonu ise en ufak parçacık boyutuna sahiptir. İlaç taşıma sisteminin etkinliğini arttırmak (Park ve Kim, 2010) ve hücreye endositozla alımını gerçekleştirmek için parçacık büyüklüğünün nanometre düzeyinde olması gerekmektedir (Choi ve ark., 2006). Bu çalışmada kitosan ile hazırlanan tüm formülasyonların boyutunun etkinlik gösterecek özelliğe sahip olduğu düşünülmüştür.

Zeta Potansiyel Değeri

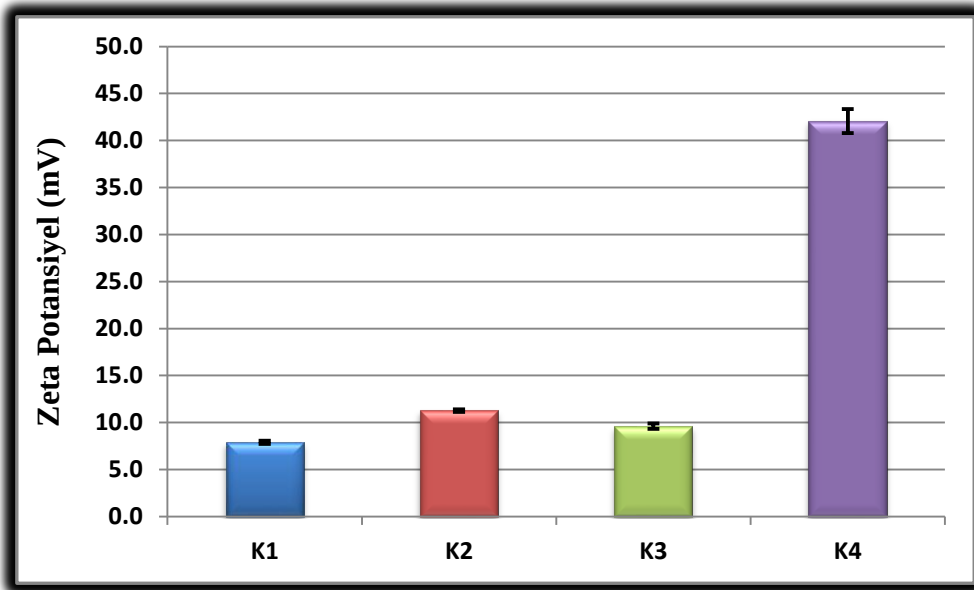
Kitosan formülasyonunun zeta potansiyeli KLN formülasyonu ile aynı yöntem (sayfa 37) kullanılarak belirlenmiştir.

K4 formülasyonunun zeta potansiyelinin en yüksek, K1 formülasyonunun ise en düşük olduğu saptanmıştır. K4 formülasyonu diğer kitosan formülasyonlarına oranla en yüksek parçacık boyutuna sahip olmasına karşın taşıdığı yüzey yükü nedeni ile siRNA bağlama yetisinin yüksek olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle transfeksiyon ve sitotoksite çalışmaları için en uygun formülasyon olarak seçilmiştir.

Bu çalışmada hazırlanan kitosan formülasyonlarının zeta potansiyeli **Çizelge 17** ve **Şekil 27**'de gösterilmiştir.

Çizelge 17. Kitosan formülasyonlarının zeta potansiyeli

	1K	K2	K3	K4
Zeta Potansiyel (mV) ± SH	7.90 ± 0.17	11.27 ± 0.14	9.60 ± 0.29	42.07 ± 1.28

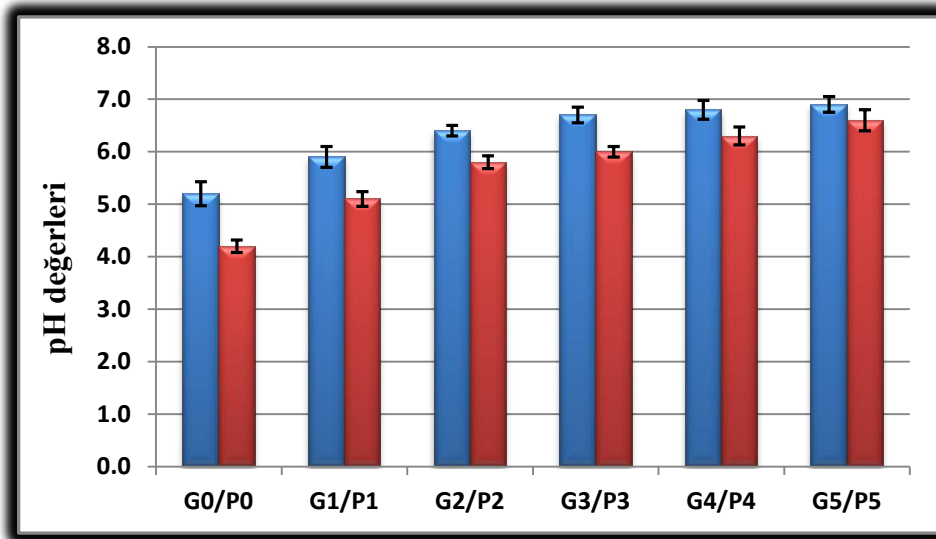


Şekil 27. Kitosan formülasyonlarının zeta potansiyeli

Formülasyonların pH Değeri

Önemli kriterlerden birisi olan pH değeri ön formülasyon çalışmalarında her bir formülasyon için belirlenmiştir. Buradaki amaç hücreye uygulanacak olan formülasyonların besiyeri pH'sında değişikliğe neden olup olmadığının belirlenmesidir. Sato ve ark.'ları (2001) A549 hücrelerinde transfeksiyon etkinliğini farklı pH'larda (6.9-7.5) araştırmış ve pH 6.9'daki transfeksiyon etkinliğinin pH 7.6'dakinden daha fazla olduğunu belirtmiştir. Yapılan çalışmada bileşiklerin pH 6.9'da pozitif yüklü olduğu ve elektrostatik etkileşimle negatif yüklü hücrelere diğer pH'lara göre daha iyi bağlanabildiği gösterilmiştir. Bu nedenle hazırlanan formülasyonların transfeksiyon yetisinin pH değerine göre değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLN'lerden oktadesilamin içermeyen G0'ın pH değerinin 5.2 ve P0'ın ise 4.2 olduğu saptanmıştır. G0 ve P0 tüm formülasyonlarla karşılaştırıldığında en düşük pH'ya sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 28).



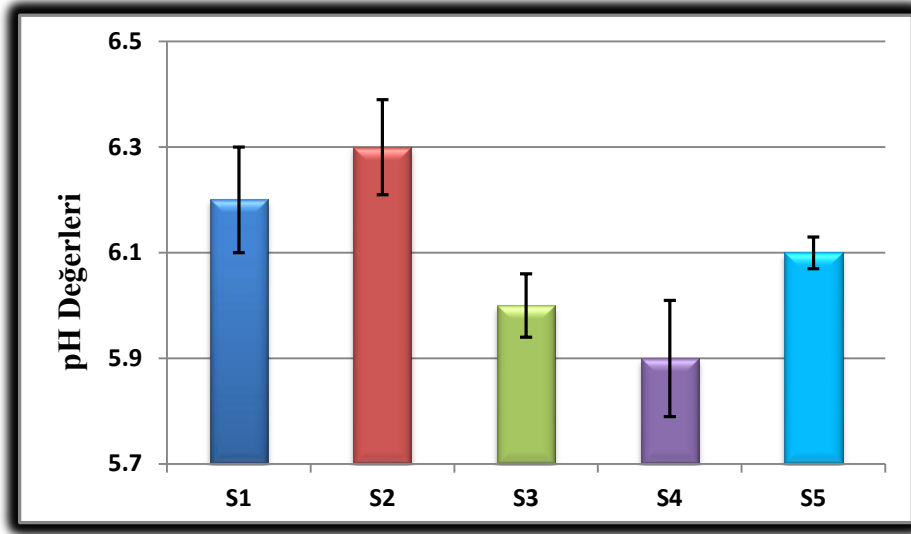
Şekil 28. Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan KLN'lerin pH değeri

Oktadesilamin miktarının artması ile pH değeri Gelucire® 50/13 için 5.9'dan 6.9'a, Precirol® ATO5 için 5.1'den 6.6'ya kadar yükselmiştir. Bu durum formülasyona eklenen oktadesilaminin pH'yı yükselttiğinin göstergesidir (Şekil 28).

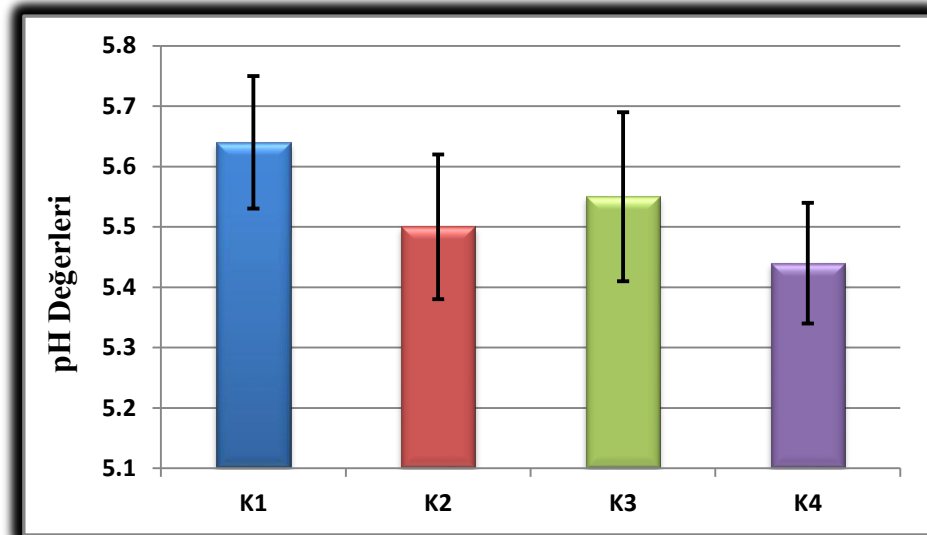
Sonikasyon işlemi ile hazırlanan formülasyonlarda pH değerlerinin birbirine çok yakın olduğu bulunmuştur (~6.0) (Şekil 29). Artan oktadesilamin miktarının pH'da herhangi bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Yüksek hızda karıştırma ve sonikasyon tekniği ile hazırlanan ve aynı oranda Gelucire® 50/13 ve oktadesilamin içeren formülasyonların pH değerindeki farklılığının hazırlama yönteminden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kitosan ile hazırlanan formülasyonların pH değerinin ortalama 5.5 olduğu görülmüştür (Şekil 30).

Hazırlanan tüm formülasyonların parçacık boyutu ve zeta potansiyeli birlikte değerlendirildiğinde, transfeksiyon için en uygun formülasyonların G2, G3, P4, S5 ve tüm kitosan formülasyonlarının (K1, K2, K3, K4) olduğu düşünülmüştür. Transfeksiyon için pH 6.9'un uygun olduğu bilgisi ile bu formülasyonların uygun pH'ya sahip olduğu söylenebilir. Aynı pH değerlerinin hücre çalışmaları için de uygun olduğu düşünülmüştür.



Şekil 29. Sonikasyon ile hazırlanan KLN'lerin pH değeri

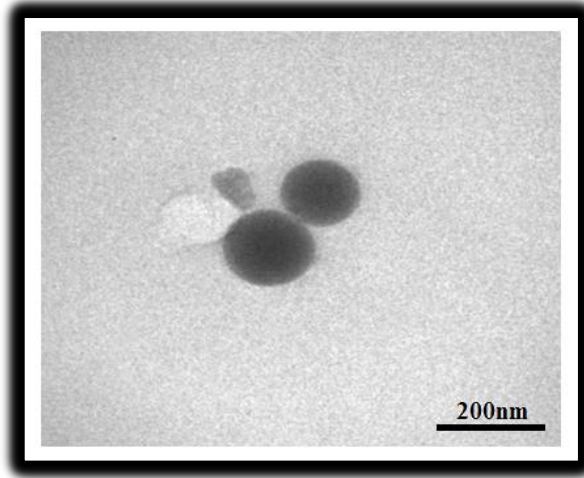


Şekil 30. Kitosan formülasyonlarının pH değeri

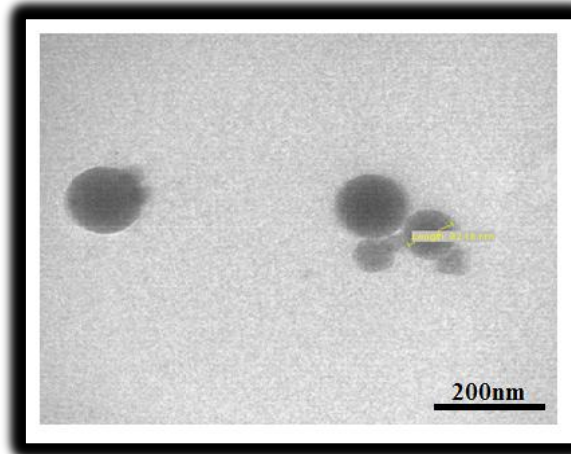
Formülasyonların TEM Görüntüsü

Nanoparçacıkların morfolojik değerlendirmesinin doğrudan yapılması taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile mümkündür (Ekambaram ve ark., 2012). TEM ve SEM analizinde KLN'lerin genellikle küresel şekilli, yüzey etkin madde arayüzeyi ile dış fazdan ayrılmış lipit çekirdeğe sahip yapılar olduğu görülmüştür (Ghaffari ve ark., 2012).

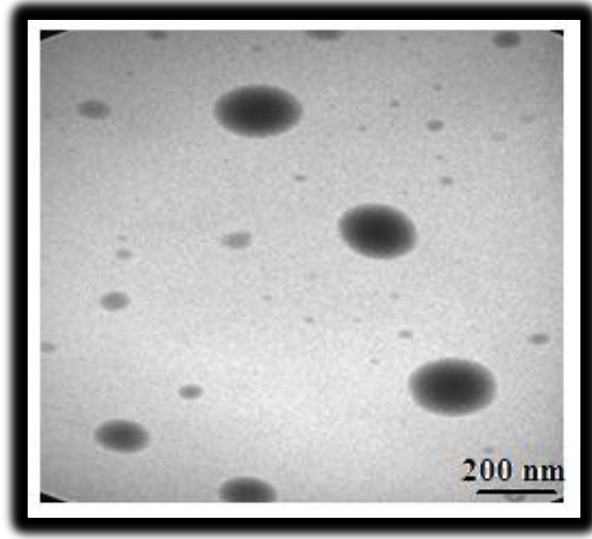
S5, G2 ve K4 formülasyonları TEM ile farklı büyütmelerde görüntülenmiştir. **Şekil 31, Şekil 32 ve Şekil 33'**de KLN'lerin küresel ve tekdüze olduğu görülmektedir. TEM görüntülerinde ölçülen parçacık boyutu cihaz ölçümü sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.



Şekil 31. S5'in TEM görüntüsü (87000 X büyütme)



Şekil 32. G2'nin TEM görüntüsü (87000 X büyütme)



Şekil 33. K4'ün TEM görüntüsü (87000 X büyütme)

Kitosan ile hazırlanan formülasyonların morfolojik analizi için literatürde TEM, SEM ve AFM yöntemleri kullanılmıştır. Yapılan analizlerde nanoboyutta (200 nm-250 nm) ve küresel yapıda parçacıklar saptanmıştır (Nıdhın ve ark., 2008).

Bu çalışmada hazırlanan K4 parçacıklarının TEM ile belirlenen boyutu literatürde saptanan ve daha önce cihaz ölçümünde bulunan sonuçlar ile uyumluluk göstermektedir. TEM'de belirlenen parçacık boyutundaki çok küçük değişimin, TEM ile görüntüleme öncesinde nanoparçacıklara uygulanan işlemlere (kurutma gibi), nanoparçacıkların suyunu kaybetmesine ve dolayısıyla hacimce küçülmesine bağlı olduğu düşünülmüştür.

Formülasyonların Sitotoksitesi

Bu çalışmada hazırlanan formülasyonların sitotoksitesi MTT (Metil-tiyazol-tetrazolyum) yöntemi ile (**sayfa 38**) incelenmiştir. Bu yöntem dolaylı olarak hücre büyümesi veya ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan ve kısa süreli hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (Meerloo ve ark., 2011).

Geliştirilen formülasyonların hücre üzerinde az toksik olması önemlidir. Çalışmada amaçlanan hücrelerin ölümünü azaltan Bcl-2 geninin susturulmasını sağlayacak genetik materyalin hazırlanmış olan sistemlerle hücre içerisine transfeksiyonudur. Transfeksiyon sonrasında beklenen Bcl-2 mRNA'sının susturulması ve dolayısıyla Bcl-2 proteininin üretiminin azaltılması ve hücrelerin ölüme gitmesidir. Bu etkinin kesin olarak belirlenebilmesi için taşıyıcı sistemlerin hücre için toksik özellik taşıyamaması önem taşımaktadır. Hazırlanan formülasyonların toksik özelliklerinin belirlenmesinin ardından transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak formülasyon seçilebilmektedir.

Hazırlanan KLNlerin zeta potansiyel, parçacık boyutu ve pH'sı değerlendirildikten sonra saptanan en uygun G2, G3, P4 ve S5'de ve tüm kitosan formülasyonlarında sitotoksite çalışması yapılmıştır. Sitotoksite çalışmaları kontrol olarak kullanılan Lipofectamin®2000 için'de gerçekleştirilmiştir. Lipofectamin®2000 ve S4 dışında tüm formülasyonlar **Çizelge 19**'de verilen

miktarda besiyeri ile karıştırılarak hücrelere uygulanmış ve 24 ve 48 saat sonrasında ölçüm alınarak değerlendirme yapılmıştır.

Lipofectamin® 2000 'in Sitotoksitesi

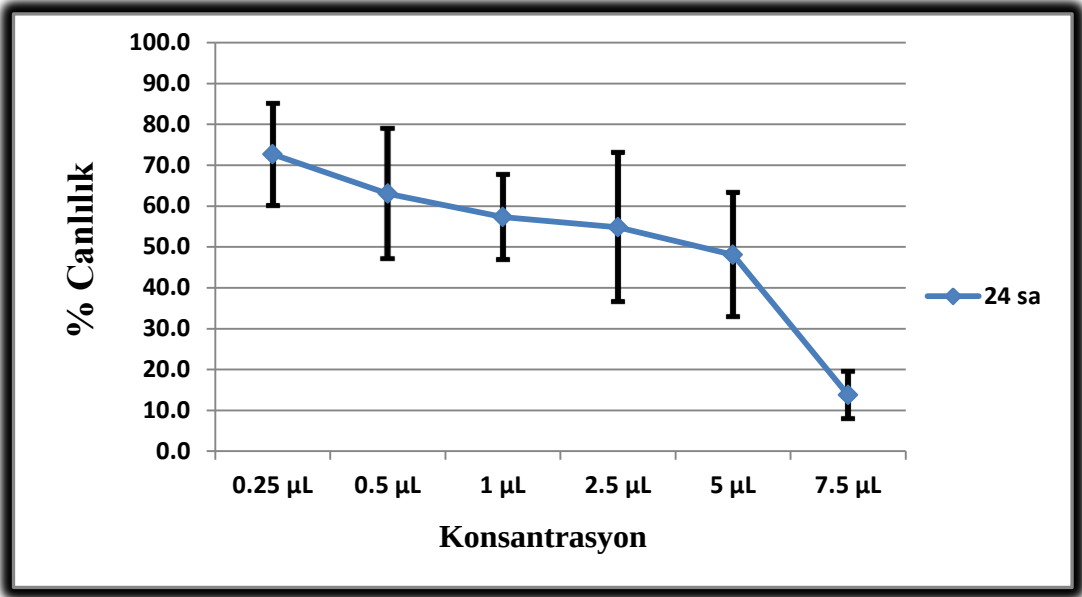
Lipofectamin®2000 için 24 ve 48 saatlik MTT testi için kullanılan miktarlar **Çizelge 18'de** verilmiştir.

Ölçümler Victor X5 çoklu plaka okuyucu ile 572 nm'de yapılmıştır. Sitotoksite testi her bir formülasyon için 3 plaka ve her bir konsantrasyon için 8 kuyuda çalışılmıştır. Absorbans değeri bu plakalarda ölçülen absorbansların ortalaması alınarak bulunmuştur.

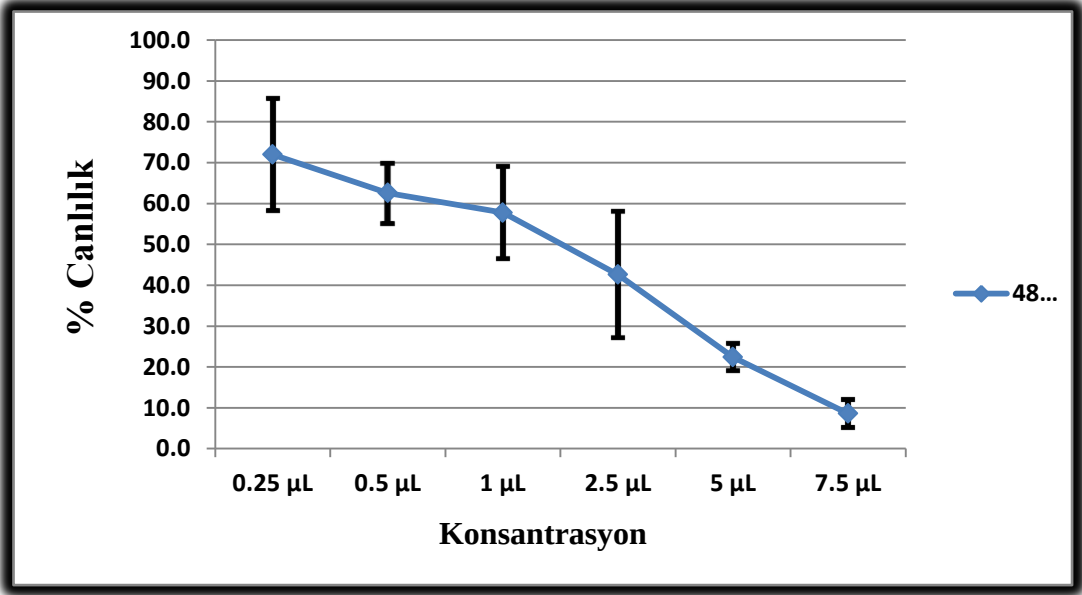
Aynı koşullarda yalnızca kültür ortamı ile inkübe edilen hücrelerin bulunduğu kuyularda okunan absorbans değerleri % 100 hücre canlılığı olarak kabul edilmiştir. Formülasyon uygulanan kuyuların absorbansları bağlı % değeri olarak belirlenmiştir. Sonuçlar **Şekil 34** ve **Şekil 35'te** verilmiştir.

Çizelge 18. Lipofectamin®2000'in sitotoksite çalışmasında kullanılan formülasyon miktarı

Formülasyon (µL)	Besiyeri (µL)	Konsantrasyon (µg/mL)
0.25	ym 100	~2.5
0.5	ym 100	~5
1	ym 100	~10
2.5	ym 100	~25
5	ym 100	~50
7.5	ym 100	~75



Şekil 34. Lipofectamin®2000'in 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesisi (IC_{50} : 4.8 µL/kuyu, ~4.8 µg/kuyu)(n=3)



Şekil 35. Lipofectamin®2000'in 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesisi (IC_{50} : 1.155 µL/kuyu, ~1.155 µg/kuyu)(n=3)

Yapılan analizlerde firmanın önerdiği protokole göre kullanılan en düşük Lipofectamin®2000 miktarında (0.25µL) 24. saatte en fazla % 73 48. saatte en fazla % 72 oranında hücre canlılığı saptanmıştır. Sitotoksiste de kullanılan miktara göre artış gözlenmiştir

Yüksek Hızda Karıştırma Tekniği ile Hazırlanan KLN'lerin Sitotoksitesi

G2, G3 ve P4 formülasyonları için 24 ve 48 saatlik MTT testi için kullanılan miktarlar **Çizelge 19**'de verilmiştir.

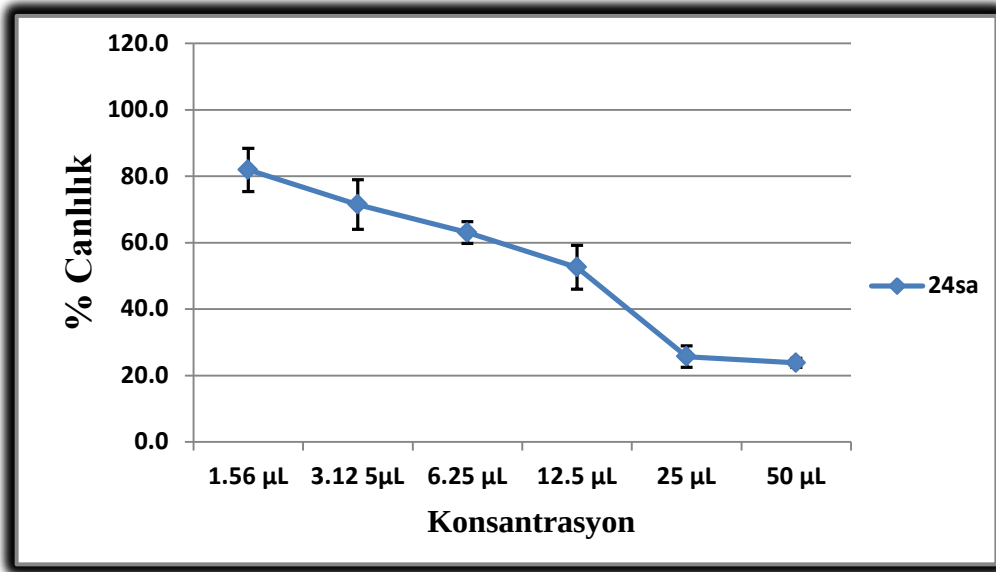
Çizelge 19. G2, G3 ve P4'ün sitotoksite çalışmasında kullanılan formülasyon miktarı

Formülasyon (μ L)	Besiyeri (μ L)	Konsantrasyon (μ g/mL)
1.56	ym 100	~624
3.13	ym 100	~1 250
6.25	ym 100	~2 500
12.50	ym 100	~5 000
25	ym 100	~10 000
50	ym 100	~20 000

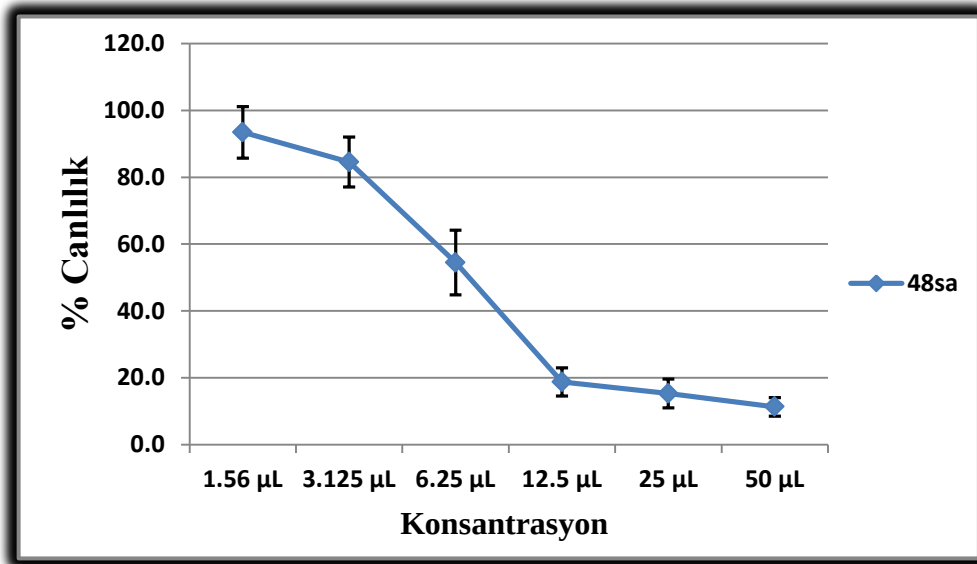
Formülasyonlara ait 24 ve 48 saatlik MTT testi sonuçları **Şekil 36, Şekil 37, Şekil 38, Şekil 39, Şekil 40 ve Şekil 41**'da verilmiştir.

Müller ve ark. ile başlayan KLN çalışmalarının yoğun ilgi görmesinin nedeni sitotoksik olmamalarıdır (Yuan ve ark., 2008; Subedi ve ark., 2009).

G2'nin IC₅₀ değeri 24. saatte 13.145 μ L/kuyu ve 48. saatte 6.81 μ L/kuyu olarak saptanmıştır. Hücre canlılığı en yüksek olan (24 saat için % 82 ve 48 saat için % 93) en düşük konsantrasyon 1.56 μ L/kuyu, transfeksiyon ve siRNA bağlama çalışmaları için ideal konsantrasyon olarak seçilmiştir (**Şekil 36 ve Şekil 37**).



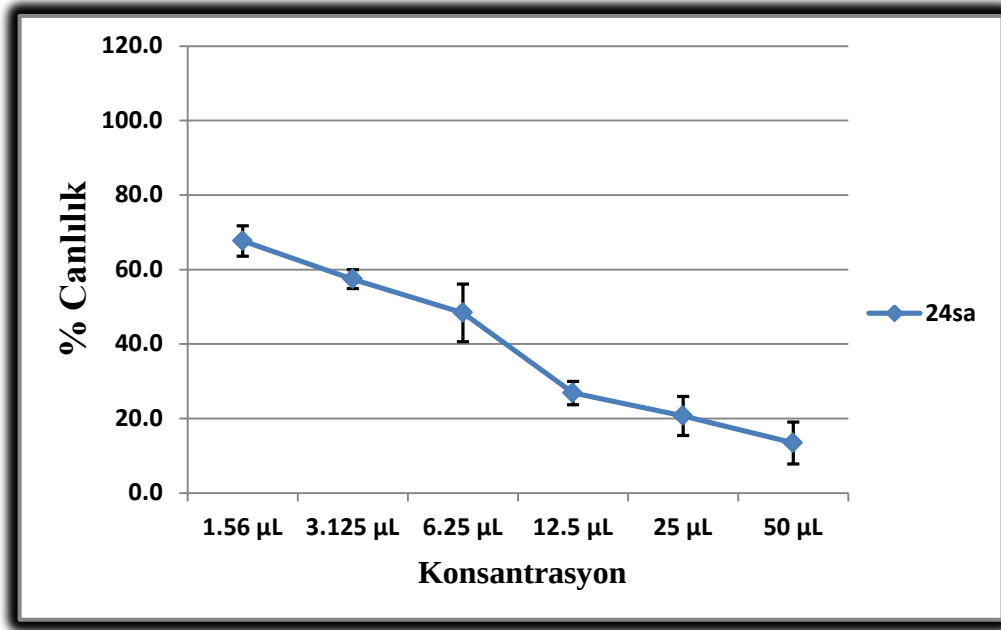
Şekil 36. G2'nin 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi (IC_{50} : 13.145 μ L/kuyu, ~526 μ g/kuyu)(n=3)



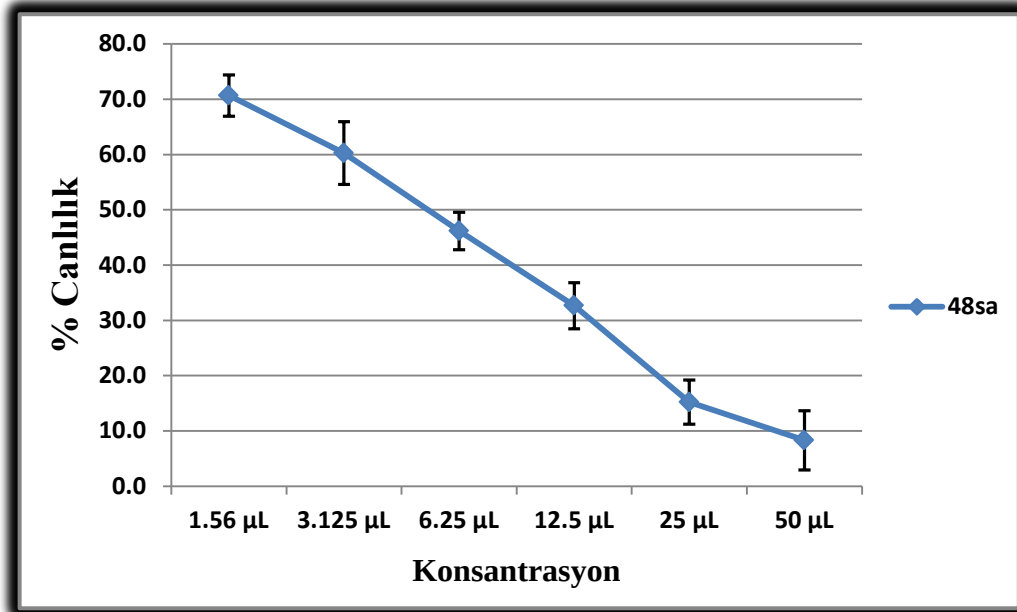
Şekil 37. G2'nin 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi (IC_{50} : 6.81 μ L/kuyu, ~272 μ g/kuyu) (n=3)

G3'ün IC_{50} değeri 24. saat için 3.58 μ L/kuyu ve 48. saat için 5.77 μ L/kuyu olarak bulunmuştur. G3 formülasyonu için en düşük konsantrasyonda (1.56 μ L/kuyu) 24. saatte yaklaşık % 68 ve 48. saatte % 71 hücre canlılığı görülmüştür. 24 saatin ardından % 32, 48 saatin ardından ise % 29 hücre kaybı olduğu saptanmıştır.

Uygulanan formülasyonun parçalanarak konsantrasyonunun azalması ve sağ kalan hücrelerin normal büyüme periyoduna devam etmeleri nedeniyle ilk andaki sitotoksik etkinin 48 saat sonrasında düştüğü düşünülmüştür. Bu oran G2 ile karşılaştırıldığında G3 formülasyonunun hücre sitotoksitesi üzerinde daha etkin olduğunu göstermektedir.



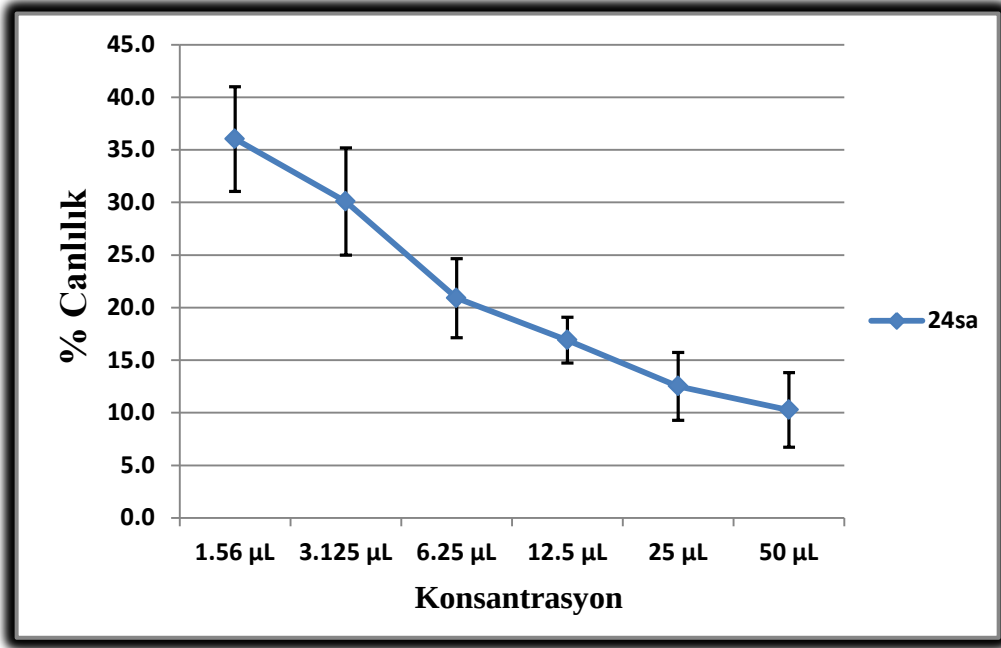
Şekil 38. G3 formülasyonunun 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi (IC_{50} : 3.58 μ L/kuyu, 143.55 μ g/kuyu) (n=3)



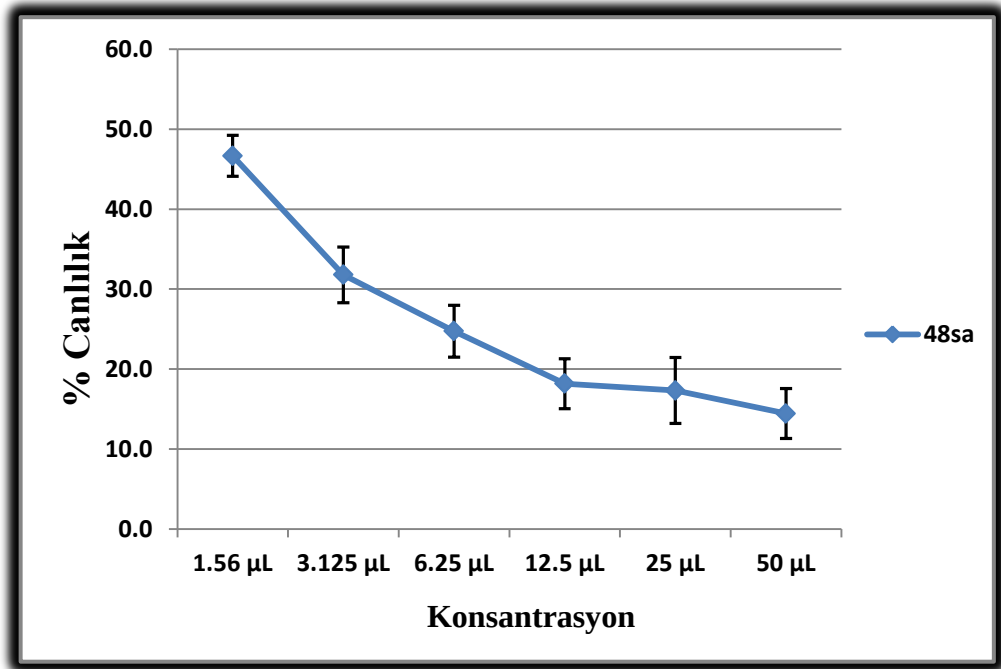
Şekil 39. G3 formülasyonunun 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi (IC_{50} : 5.77 μ L/kuyu, 230.9 μ g/kuyu) (n=3)

P4'ün 24. ve 48. saatlerde sitotoksite göstermesi nedeni ile IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Bu formülasyonun en düşük konsantrasyonunda bile % 50 canlılık yakalanamamıştır. Ortaya çıkan sitotoksik etkinin formülasyon içeriğindeki oktalesilamin miktarının G2 ve G3'e göre daha fazla olması ve daha önce laboratuvar çalışmalarımızda gerçekleştirilen araştırmalarda elde edilen

sonuçlara göre Precirol® ATO5'in Gelucire® 50/13'e göre daha toksik olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.



Şekil 40. P4 formülasyonunun 24 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi (n=3)



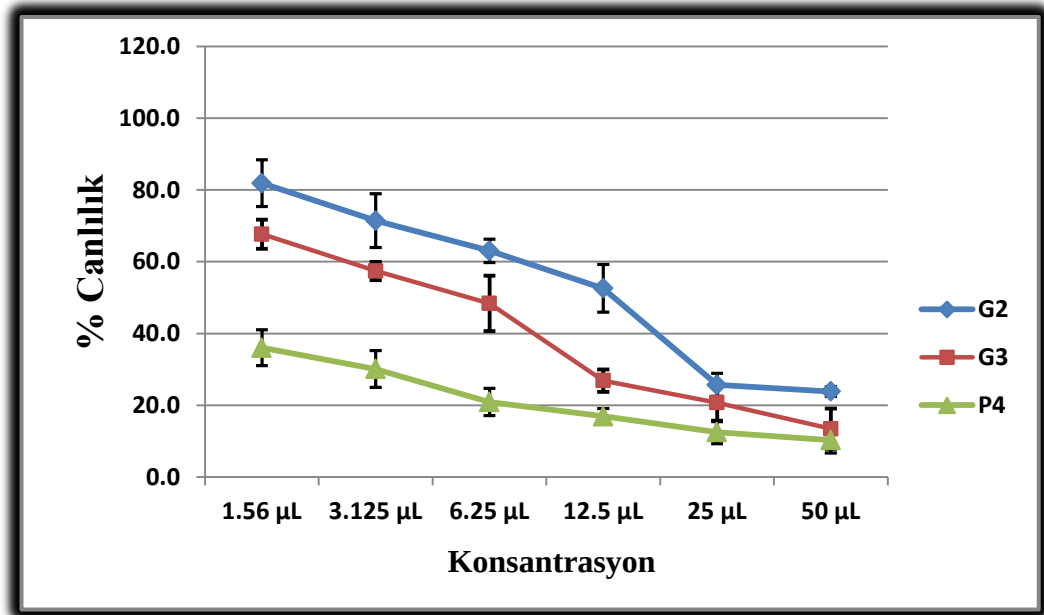
Şekil 41. P4 formülasyonunun 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksitesi (n=3)

Sitotoksite çalışmalarında, yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanmış G2, G3 ve P4 hücrelere aynı oranda uygulanmıştır. Hücre canlılığı göz önünde alınarak transfeksiyon için en düşük konsantrasyonun 1.56 µL/kuyu olduğuna karar verilmiştir. Yuan ve ark.'nın (2008) yaptıkları çalışmada KLN hazırlamak

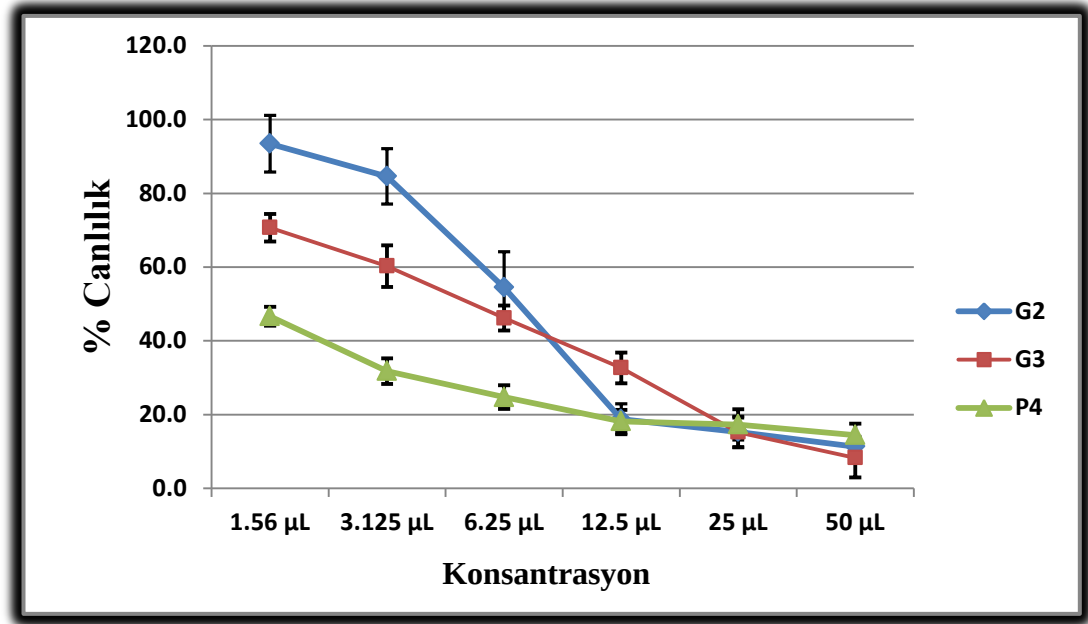
için çeşitli katı lipidler kullanılmış ve sitotoksosite çalışmaları sonucunda IC_{50} değerlerinin yaklaşık 300-500 $\mu\text{g/mL}$ bulunduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki KLN'lerin % 50 canlılık gösterdiği belirlenmiştir. G2 formülasyonu 624 $\mu\text{g/mL}$ uygulanmasına rağmen 24. saatte % 82 ve 48. saatte % 93 hücre canlılığı göstermiştir. Bu oranın literatürdekinden yüksek olmasının nedeni daha önce pDNA ile yapılan çalışmalarda kullanılan düşük konsantrasyonların pDNA bağlamada zayıf kalması bulgularından hareketle yapılacak transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak siRNA'nın formülasyona etkin adsorpsiyonu ve hücre içerisine geçinceye kadar parçacık yüzeyinden kolay ayrılmaması için formülasyon miktarı yüksek tutulmuştur.

G3 formülasyonu için hücre canlılık oranları 24. saatte % 68 ve 48. saatte % 71'dir. Aynı oran P4 için 24. saatte % 36 ve 48. saatte % 46'dır. Aynı konsantrasyonda uygulanmış olan G2 için hücre canlılığının % 82 ve % 93 olmasından dolayı G3'ün bu konsantrasyonda daha toksik olduğu gözlenmiştir. Olası neden G3 içeriğindeki oktadesilamin miktarının G2'ye göre daha yüksek olmasıdır. P4'ün G3'den daha yüksek miktarda oktadesilamin içermesi ve Precirol® ATO5'in Gelucire® 50/13'e göre daha toksik olması sitotoksitenin artmasına yol açmıştır. Her üç formülasyonun da 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılığı oranları karşılaştırmalı olarak **Şekil 42** ve **Şekil 43**'de verilmiştir.

G3 ve P4'ün G2'ye göre oldukça toksik olmaları nedeni ile her iki formülasyonun da transfeksiyon çalışmaları için kullanılmamasına karar verilmiştir. Böylece yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan formülasyonlar arasından yalnızca G2'nin genetik materyal taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Lipofectamin®2000 ile yapılan sitotoksosite çalışmaları ile karşılaştırıldığında da G2 formülasyonu daha düşük sitotoksositeye sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 42. G2, G3 ve P4'ün 24. saatteki hücre canlılığı oranları



Şekil 43. G2, G3 ve P4'ün 48. saatteki hücre canlılığı oranları

Sonikasyon Tekniği ile Hazırlanan KLN'lerin Sitotoksitesi

Sonikasyon tekniği ile hazırlanan S5 formülasyonunda MTT testi için kullanılan miktarlar aşağıda verilmiştir (Çizelge 20).

Çizelge 20. S5'in sitotoksite çalışmasında kullanılan formülasyon miktarı

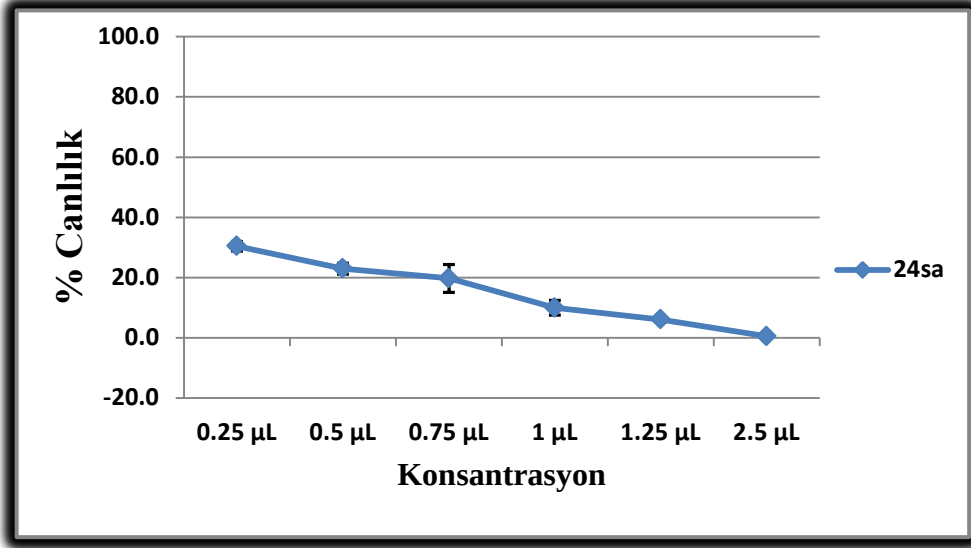
Formülasyon (µL)	Besiyeri (µL)	Konsantrasyon (µg/mL)
0.25	ym 100	~100
0.50	ym 100	~ 200
0.75	ym 100	~300
1.00	ym 100	~400
1.25	ym 100	~500
2.50	ym 100	~1000

S5'in hazırlanması sırasında organik çözücü kullanıldığından uygulanan diyaliz yöntemi (sayfa 35) nedeniyle sitotoksite çalışması diyaliz öncesi ve sonrası olarak ayrı ayrı yapılmıştır.

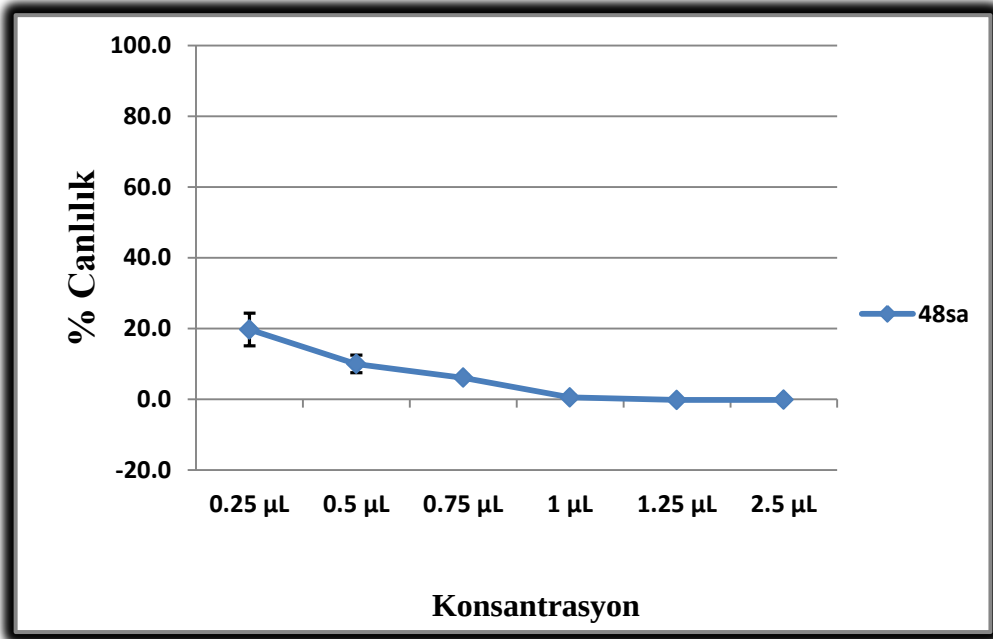
S5'in MTT çalışmasında yüksek hızda karıştırma tekniği için kullanılan yöntemin aynısı (**sayfa 38**) kullanılmıştır. Ancak diyaliz-filtrasyon uygulanan S5 için süre 72 saate uzatılmıştır. Bunun nedeni transfeksiyon ön çalışmalarında genetik materyalin etkisinin 48. saatten sonra görülmesidir.

S5'e ait diyaliz öncesi 24 ve 48 saatlik MTT testi sonuçları **Şekil 44 ve Şekil 45**'de verilmiştir.

Bu formülasyonda hücre canlılığı % 50'nin üzerine çıkmadığı için IC₅₀ değerleri hesaplanamamıştır.



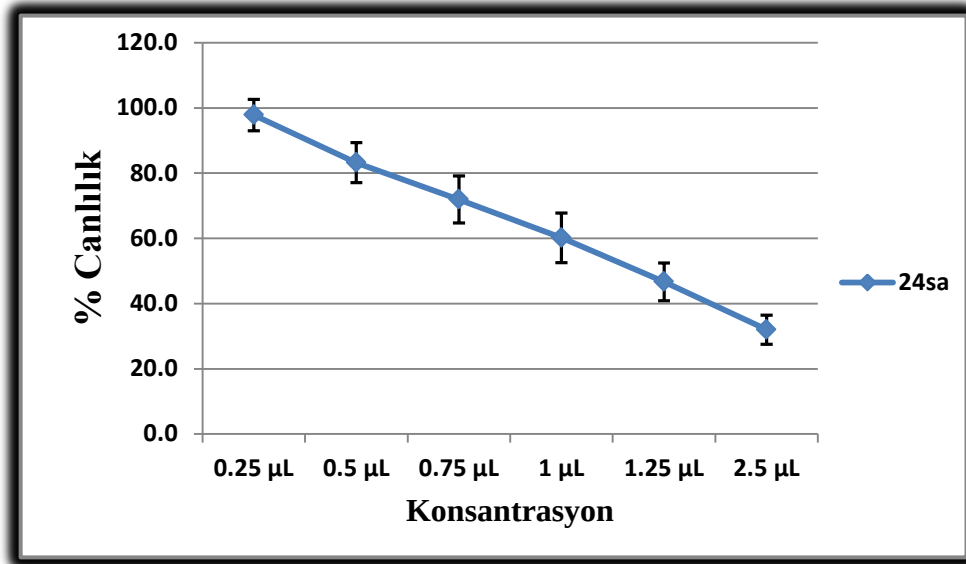
Şekil 44. S5'in diyaliz öncesi 24 saatlik sitotoksitesi (n=3)



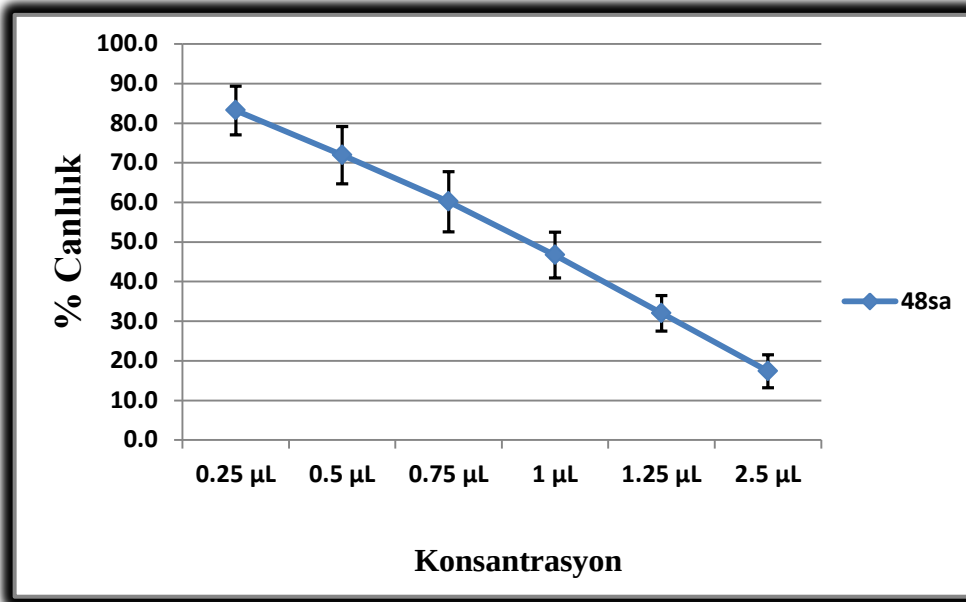
Şekil 45. S5'in diyaliz öncesi 48 saatlik sitotoksitesi (n=3)

Diyaliz işlemi yapılmadan yalnızca filtre edilmiş S5 24. ve 48. saatte oldukça toksik bulunmuştur. Bu nedenle transfeksiyon çalışması için değerlendirmeye alınmamıştır.

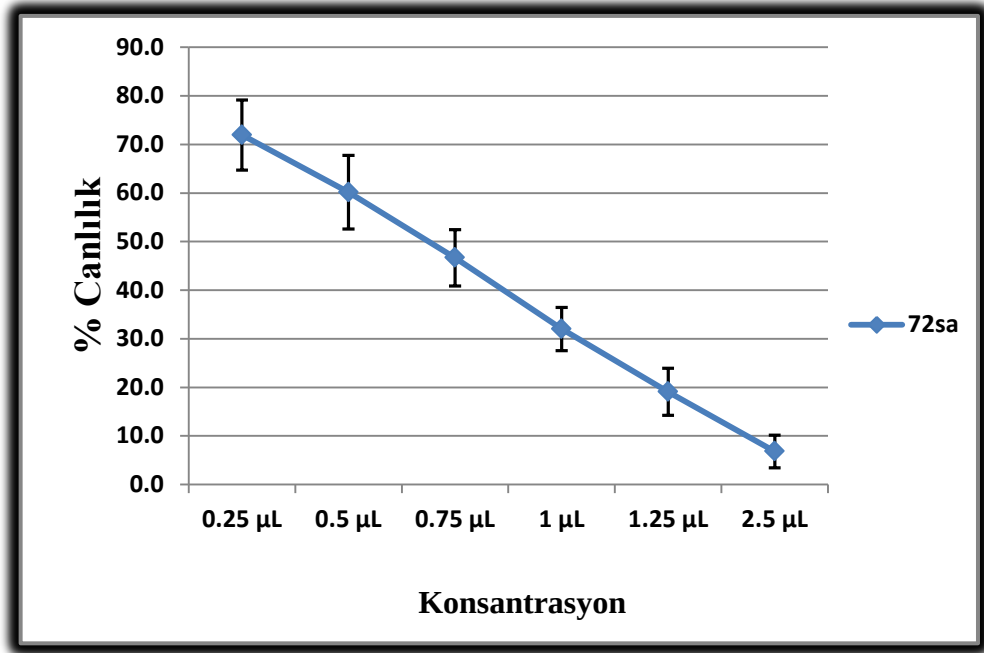
Sonikasyon ile hazırlanan formülasyonlardan S5 için diyaliz-filtrasyon işlemi sonrası 24, 48 ve 72 saatlik sitotoksisite sonuçları Şekil 46, Şekil 47 ve Şekil 48’da gösterilmiştir.



Şekil 46. S5'in diyaliz-filtre sonrası 24. saatteki sitotoksisitesi (IC_{50} : 1.20 μ L/kuyu, 48.14 μ g/kuyu) (n=3)



Şekil 47. S5'in diyaliz-filtre sonrası 48. saatteki sitotoksisitesi (IC_{50} : 0.90 μ L/kuyu, 36.1 μ g/kuyu) (n=3)



Şekil 48. S5'in diyaliz-filtre sonrası 72. saatteki sitotoksitesi (IC₅₀: 0.60 µL/kuyu, 24.07 µg/mL) (n=3)

S5'in diyaliz-filtrasyon sonrasında en düşük konsantrasyondaki (0.25 µL/100 µL) hücre canlılığının 24. saatte % 98, 48. saatte % 83 ve 72. saatte % 72 olduğu saptanmıştır. Diyaliz işlemi görmemiş yalnızca filtre edilmiş S5'de görülen düşük hücre canlılığının nedeni formülasyon içerisinde kalan artık organik çözücü olabilir. Organik çözücü kalıntısı ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra hücre canlılığında 24. saatteki % 30'dan % 98'e, 48. saatte % 20'den % 83'e belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir.

Diyaliz-filtre edilmiş S5 ilk 24 saat içerisinde en düşük konsantrasyonda (0.25 µL/100 µL) % 98 hücre canlılığı gösterirken 72 saat sonunda bu oran % 72'ye düşmüştür. Bu düşmenin nedeni parçacıkların hücre içerisine alındıktan sonra parçalanması ve oktadesilaminin açığa çıkarak toksisite göstermesi olarak açıklanabilir. Hazırlama sırasında organik çözücüde karışım oluşturan Gelucire® 50/13 ve oktadesilaminin hücre içerisinde yavaş yavaş ayrılması sonucu oktadesilamin etkisinin açığa çıktığı düşünülebilir. G3'deki karışım lipidlerin birbiri içerisinde eritilmesi ile hazırlanmıştır. G3 formülasyonunda ilk 24 saatte toksik etkinin görülmesinin nedeni oktadesilaminin hazırlama sırasında ortama eklenen sulu faza yönelmesi (yüzey etkin madde özelliğinden dolayı) sonucu parçacıkların dış yüzeyinde yoğunlaşması olabilir. Böylece hücre ilk olarak oktadesilamin ile temas eder duruma gelmiş ve oktadesilamin toksisitesinden etkilenmiş olabilir.

S5, G2 ile aynı oranda kullanıldığında hücre üzerinde oldukça toksik çıkmıştır. Bunun nedeni bir taraftan S5'in G2'ye oranla iki katı oktadesilamin içermesine diğer taraftan da G3 formülasyonu için yukarıda tartışılan hazırlama tekniği farklılığına bağlı olabilir.

S5 formülasyonunun Lipofectamin®2000 ile yapılan sitotoksosite çalışmaları ile karşılaştırıldığında yüksek konsantrasyonlarda daha az sitotoksositeye sahip olduğu görülmüştür.

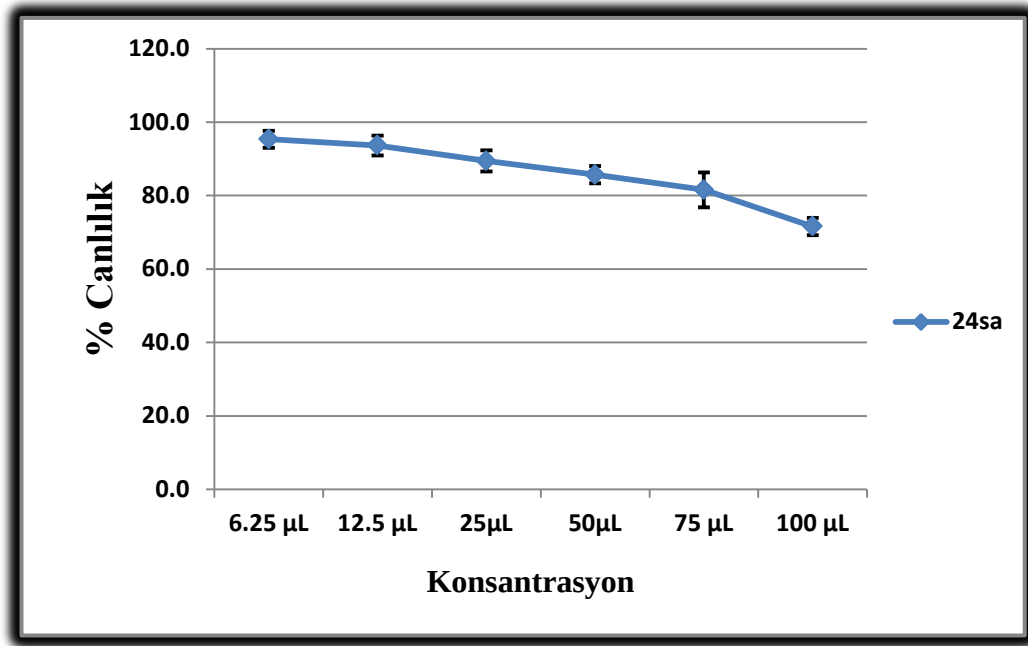
Kitosan Formülasyonlarının Sitotoksitesisi

Zeta potansiyel ve parçacık boyutu açısından değerlendirildiğinde, siRNA'yı bağlayabilecek özellikte olduğu düşünülen tüm kitosan formülasyonları için sitotoksosite çalışması yapılmıştır. Bu test için kullanılan formülasyon miktarları **Çizelge 21**'de verilmiştir.

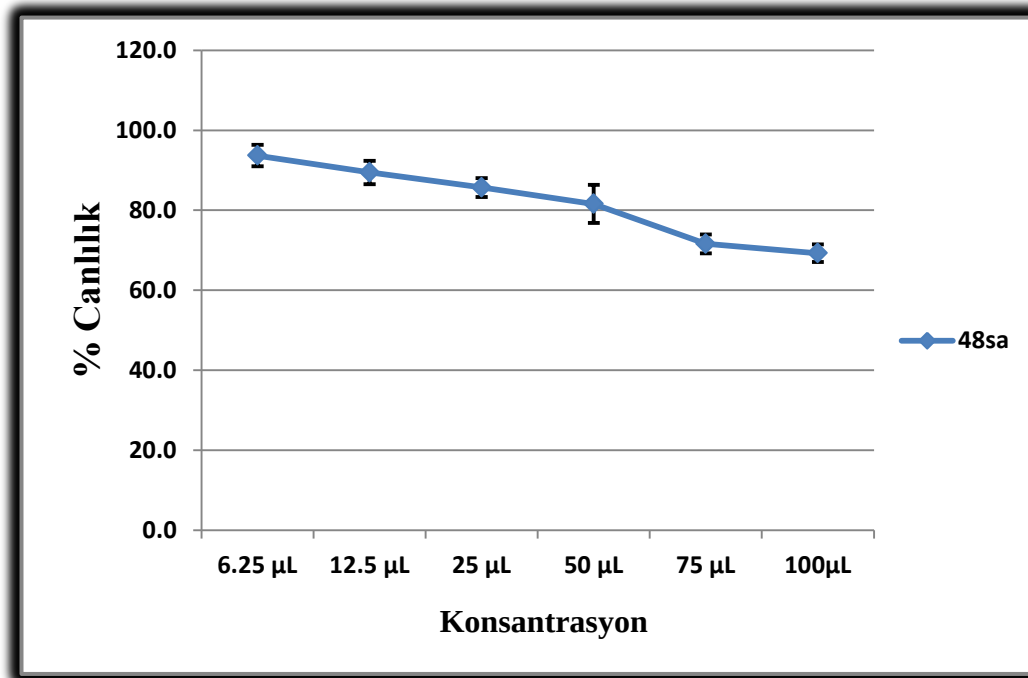
Çizelge 21. Sitotoksosite testi için kullanılan kitosan formülasyonlarının miktarı

Formülasyon (µL)	Besiyeri (µL)	Konsantrasyon (µg/mL)
6.25	ym 100	~2.50
12.50	ym 100	~5.0
25	ym 100	~10.0
50	ym 100	~20.0
75	ym 100	~30.0
100	ym 100	~40.0

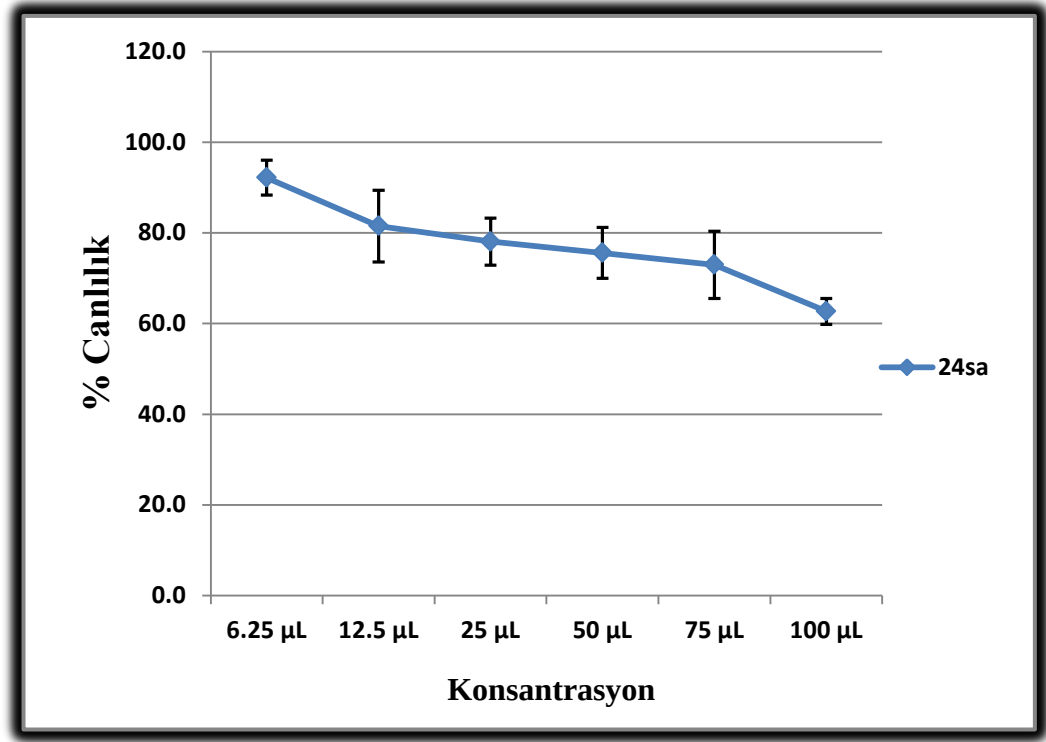
Sitotoksosite çalışmaları sonucunda tüm kitosan formülasyonları için elde edilen ilk konsantrasyondaki canlılık oranı % 90'nın altına düşmemiştir. Yapılan inceleme sonuçları **Şekil 49, Şekil 50, Şekil 51, Şekil 52, Şekil 53, Şekil 54, Şekil 55 Şekil 56 ve Şekil 57**'de verilmiştir.



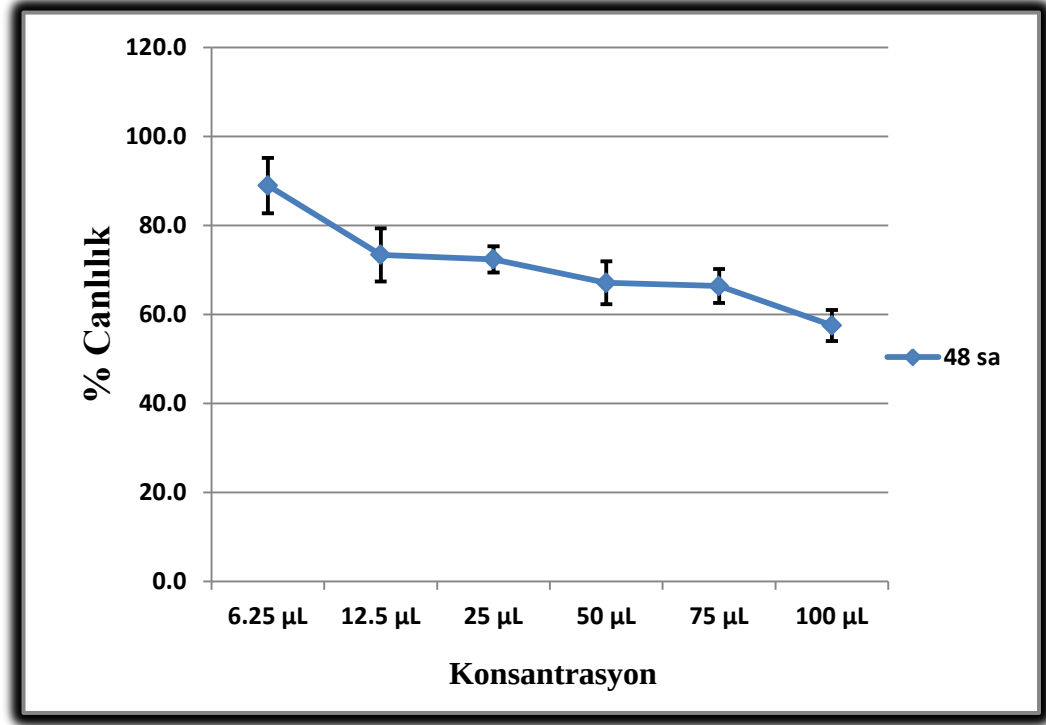
Şekil 49. K1'in 24 saatlik sitotoksitesi (n=3)



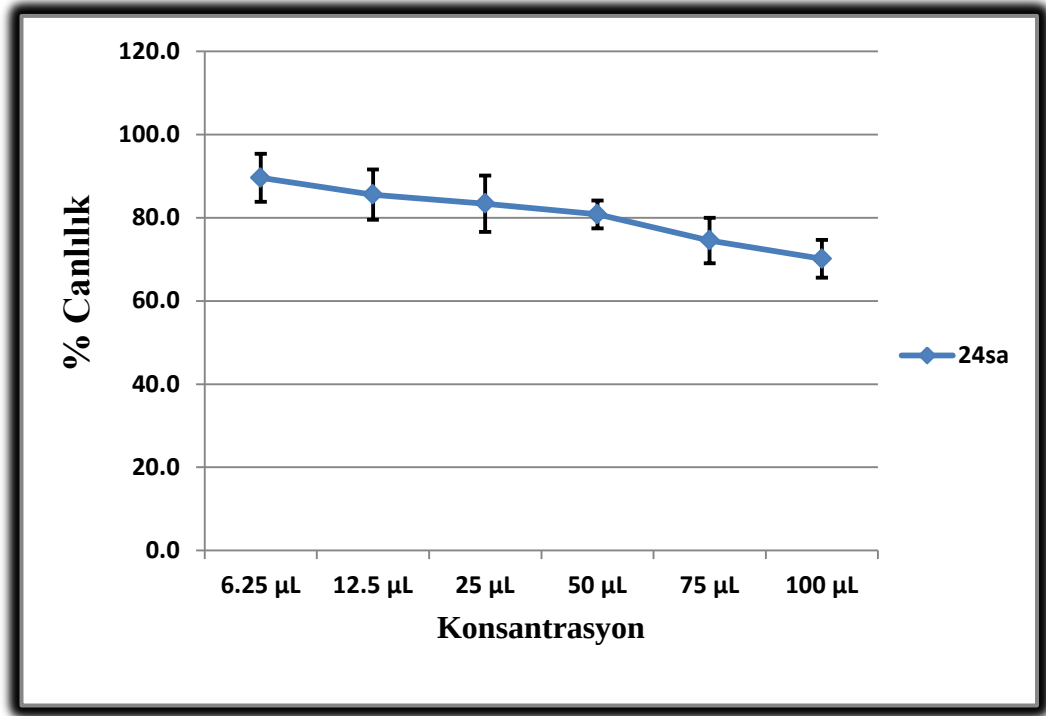
Şekil 50. K1'in 48 saatlik sitotoksitesi (n=3)



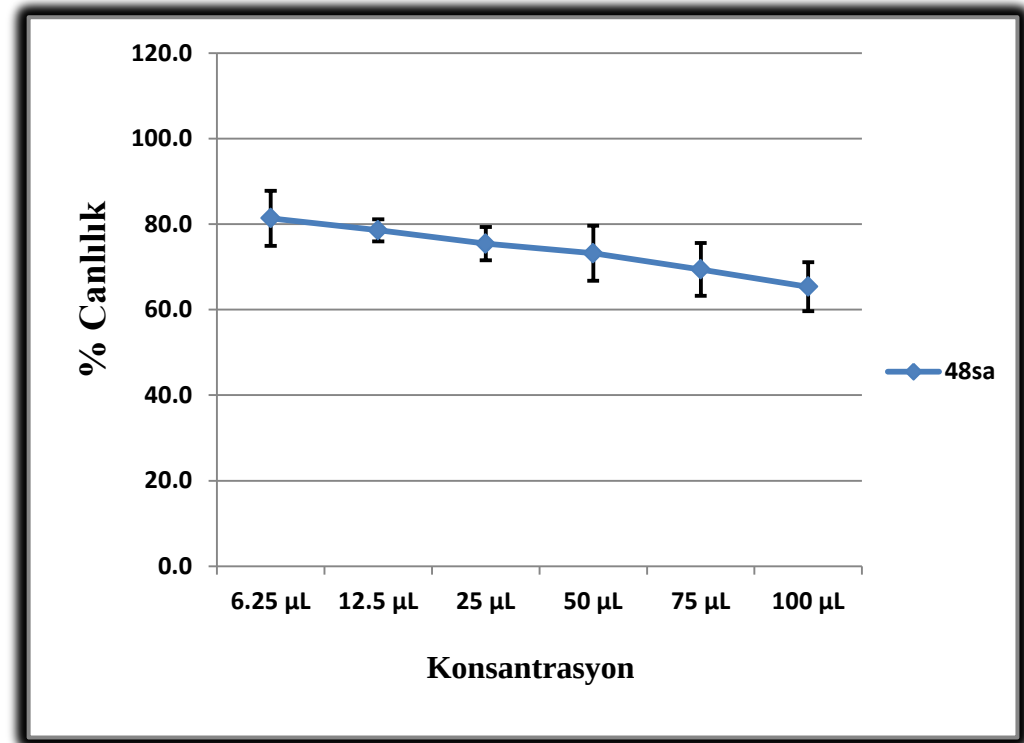
Şekil 51. K2'nin 24 saatlik sitotoksitesi (n=3)



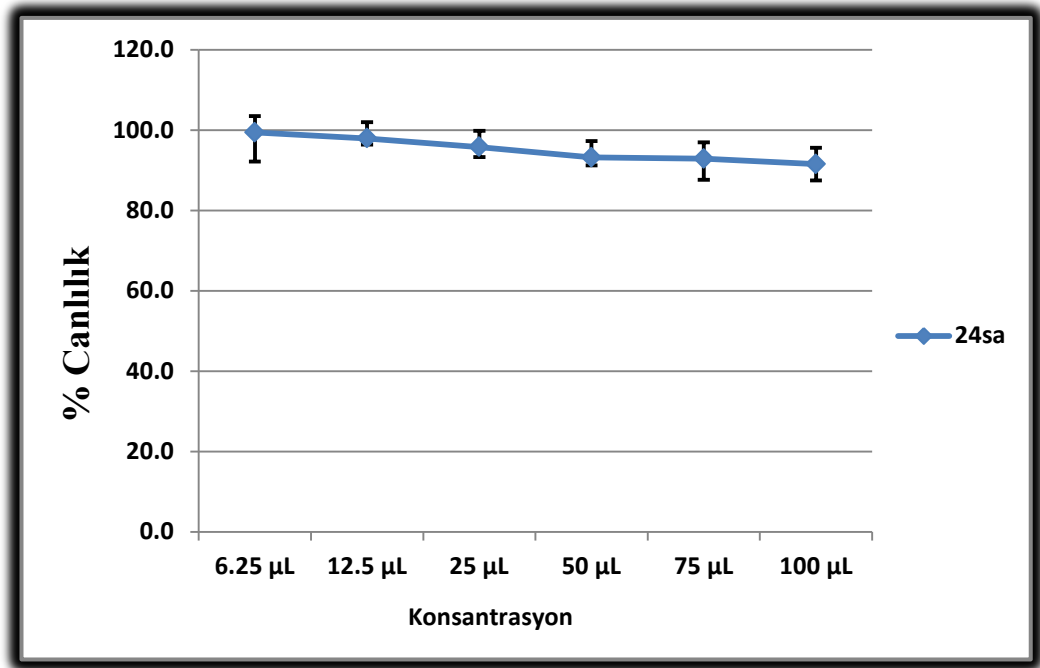
Şekil 52. K2'nin 48 saatlik sitotoksitesi (n=3)



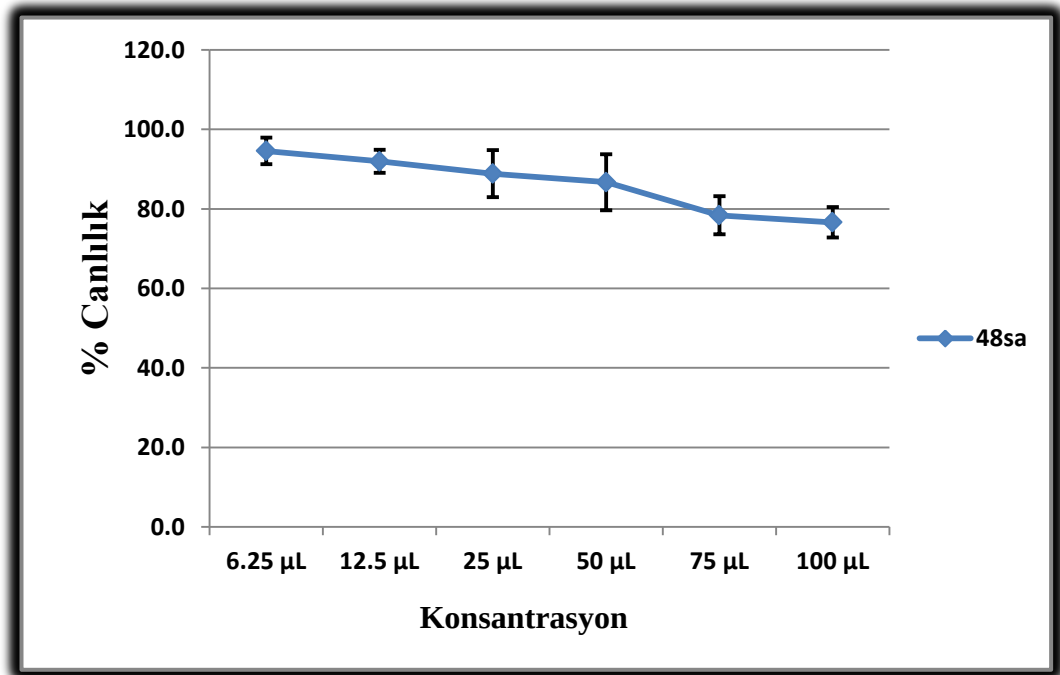
Şekil 53. K3'ün 24 saatlik sitotoksitesi (n=3)



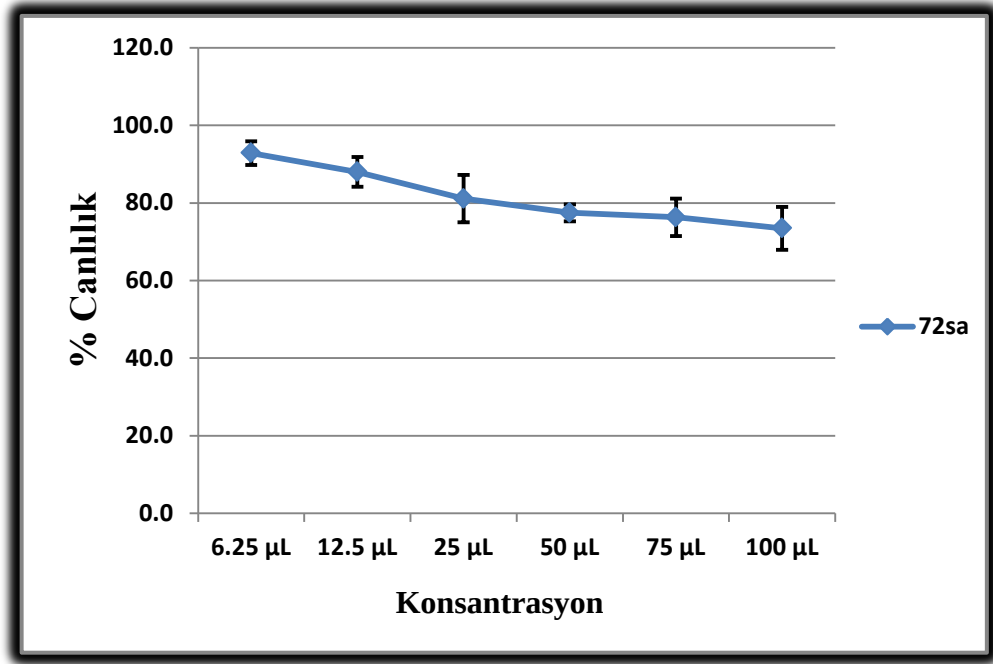
Şekil 54. K3'ün 48 saatlik sitotoksitesi (n=3)



Şekil 55. K4'ün 24 saatlik sitotoksitesi (n=3)



Şekil 56. K4'ün 48 saatlik sitotoksitesi (n=3)



Şekil 57. K4'ün 72 saatlik sitotoksitesi (n=3)

Kitosan formülasyonları için uygulanan en düşük konsantrasyon (6.25 µL/kuyu) en düşük KLN konsantrasyonu (1.56 ve 0.25µL/kuyu) ile karşılaştırıldığında daha yüksek olmasına karşın hücre canlılığında belirgin kayıba neden olmamıştır. Kitosanın toksik olmadığı literatür bilgilerinden bilinmektedir (Kumar ve ark., 2004; Venkatesan ve ark., 2010). Bu nedenle kitosan formülasyonlarının sitotoksite açısından KLN'lere göre üstün olduğu görülmektedir.

Genetik materyal bağlama ön çalışmaları sonucunda transfeksiyon için zeta potansiyeli ve parçacık boyutu en yüksek olan K4 formülasyonu en uygun polimerik formülasyon olarak seçilmiştir. Dolayısıyla K4 formülasyonu için 72 saatlik sitotoksite çalışması da yapılmıştır. Literatürde yüksek zeta potansiyel değerine sahip katyonik polimerlerin hücre üzerinde litik etkiye sahip ve bu nedenle sitotoksik olduğu rapor edilmiştir (Jiang ve ark., 2009). Başka bir çalışmada katyonik PEI formülasyonlarının aşırı pozitif yükünün membranın aşırı geçirgen olmasını sağladığı ve dolayısıyla hücre ölümüne sebebiyet verdiği saptanmıştır (Duan ve ark., 2008). Bu çalışmada en yüksek zeta potansiyele sahip K4 ile yapılan sitotoksite çalışmasında yüksek dozlarda dahi önemli hücre canlılığı kaybı görülmemiştir. K4 için ilk 24. saatte % 99, 48. saatte % 95 ve 72. saatte % 93 hücre canlılığı saptanmıştır.

Lipofectamin®2000 ile karşılaştırıldığında ise hücre canlılığı üzerinde çok daha fazla olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir.

Sitotoksite çalışmalarının sonucunda, yüksek hızda karıştırma tekniği kullanılarak hazırlanan KLN'lerden G2, sonikasyon ile hazırlanan diyaliz-filtrasyon uygulanmış S5 ve polimerik sistemlerden K4 transfeksiyon için uygun bulunan formülasyonlardır. G3 ve P4 yüksek toksisiteleri, K1, K2 ve K3 ise düşük zeta potansiyel değerine sahip olmaları nedeni ile transfeksiyon çalışmalarına dahil edilmemiştir.

KLN'lere siRNA Bağlanması

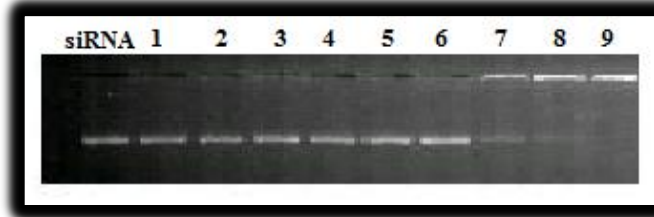
Yüksek Hızda Karıştırma Tekniği ile Hazırlanan KLN'ye siRNA Bağlanması

Transfeksiyon çalışmasında siRNA oranı sabit tutularak G2 formülasyonunun miktarı değiştirilmiştir. Genetik materyali bağlayabilecek en uygun G2 miktarı jel görüntüsü ile saptanmıştır. Örnekler hazırlanırken, **Çizelge 22**'de verilen oranlarda siRNA ve G2 elektrostatik etkileşimin sağlanabilmesi için 30 dak oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra % 1'lik agaroz jele uygulanmış ve 50 mV'da 1.5 saat elektroforez sisteminde yürütülmüştür. Jel görüntüleme sistemi ile görüntüleme işlemi yapılarak genetik materyali en iyi bağlayabilen formülasyon oranı saptanmaya çalışılmıştır (**Şekil 58**).

Çizelge 22. siRNA/G2 oranı

	siRNA	siRNA/G2 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)								
	1 μg	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:7.5	1:10	1:15	1:20
Uygulama alanı		1	2	3	4	5	6	7	8	9

Jel konsantrasyonu: %1, Uygulanan gerilim ve süresi: 50 mV, 1.5 saat



Şekil 58. G2'ye siRNA bağlanması

Şekil 58'de görüldüğü üzere G2'ye elektrostatik olarak bağlanan siRNA oranı 1:10'dur. Ancak siRNA'nın tümüyle bağlanamadığı jelle kalan siRNA görüntüsü ile belirlenmiştir. G2'nin bağlayamadığı siRNA'nın kontrol olarak kullanılan siRNA ile aynı hızda görülmesi, siRNA miktarının formülasyon içerisinde serbest halde kaldığını ve parçacıklara tutunamadığını göstermektedir.

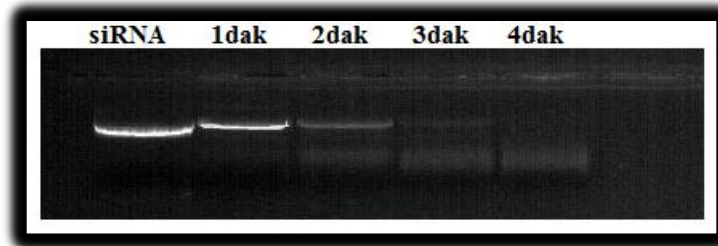
Aynı özellik 1:15 oranında da (8. alan) gözlenmiş ancak serbest siRNA miktarının 1:10 oranına göre daha düşük olduğu görülmüştür. 1:20 oranında (9. alan) ise G2 siRNA'yı tamamen hareketsiz hale getirebilmiştir. 1:10 oranından başlayarak formülasyon oranı arttıkça bağlanma oranı da kademeli olarak artmıştır. Literatürdeki çalışmalarda siRNA bağlayabilmek için farklı oranlarda DOTAP, kolesterol, lesitin ve stearik asit gibi katı lipidler kullanılmıştır. Bu oranlardaki artış ile siRNA'nın kompleks içerisinde daha fazla tutunabildiği gösterilmiştir (Yuan ve ark., 2008; Jacobson ve ark., 2010). G2 için bulunan sonuçlar literatür verileriyle benzer özelliktedir.

Sonikasyon Tekniği ile Hazırlanan KLN'ye siRNA Bağlanması

Yüksek hızda karıştırma tekniği ile hazırlanan formülasyonlarda zeta potansiyelin düşük olmasından dolayı siRNA'yı bağlayabilmek için yüksek miktarda

formülasyon kullanılması gerekmiştir. Yüksek miktarda formülasyon kullanılması oktadesilaminin yol açtığı toksisite nedeni ile transfeksiyon için uygun değildir. Ayrıca adsorbe edilmiş siRNA'nın serum ortamında formülasyondan ayrılması veya enzimler tarafından yıkılması gibi olumsuzluklar söz konusu olduğundan, siRNA'nın parçacık içerisine hapsedilme çalışması yapılmıştır. Sonikasyon tekniği ile hazırlanan KLN'lerin zeta potansiyel ve parçacık boyutlarının uygun olmasından dolayı siRNA'nın enkapsülasyonunun sağlanabileceği düşünülmüştür. Böylece daha yüksek miktarda siRNA daha az miktarda formülasyona enkapsüle edilerek hücre içerisine taşınması ve düşük konsantrasyon kullanılması nedeni ile toksisitenin azaltılması sağlanabilir.

Sonikasyon genetik materyalin kırılmasına neden olabilir. Sonikasyon şiddeti ve süresi genetik materyalin hasar görmesinde etkilidir (Gvili ve ark. 2006). Bu nedenle bu çalışmada kullanılan genetik materyalin hangi şiddette ve sürede sonikasyondan etkilendiği araştırılmıştır. Bu amaçla katı lipid ve yüzey etkin maddenin bulunmadığı formülasyon koşulları (500 µL DKM+1.5 mL distile su) içerisindeki genetik materyale sonikasyon işlemi uygulandıktan sonra çözücü uçurulmuştur. Su içerisindeki genetik materyal alkol ile çöktürülmüş ve jele yüklenerek siRNA'nın bütünlüğü incelenmiştir. Sonuç olarak % 20'den fazla güç uygulandığında genetik materyalin tamamen parçalandığı gözlenmiştir. Süre bakımından yapılan denemelerde ise % 20 güçte 2. dak'dan itibaren kırılmaların başladığı saptanmıştır (**Şekil 59**). Dolayısıyla formülasyonların hazırlanmasında % 20 güç ve 1 dak'nın kullanılmasına karar verilmiştir. Bu değerler ile hazırlanan KLN'lerin özellikleri daha önce tartışılmış ve S5'in uygun olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 59. 1 dak, 2 dak, 3 dak ve 4 dak sonikasyon uygulanmasının siRNA üzerine etkisi

Jel konsantrasyonu: %1, Uygulanan gerilim ve süresi: 50mV, 1.5 saat

Sonikasyon tekniği ile hazırlanan S5 jele yüklendiğinde yalnızca kontrol siRNA'nın jelde yürüdüğü, S5'in kuyucukta kaldığı gözlenmiştir. Sonuçlar ekstraksiyon çalışmalarına ait Bölüm'de verilmiştir (**Şekil 67**).

Kitosan Formülasyonlarına siRNA Bağlanması

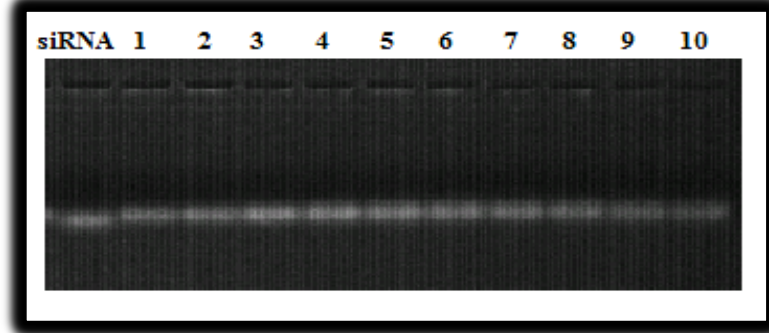
MTT testi sonucunda transfeksiyon için K4 seçilmesine karşın siRNA bağlama yetisi kitosanlı tüm formülasyonlar (K1, K2, K3) üzerinde denenmiştir.

Sonuçlar **Şekil 60**, **Şekil 61**, **Şekil 62**, **Şekil 63** ve **Çizelge 23**'de verilmiştir.

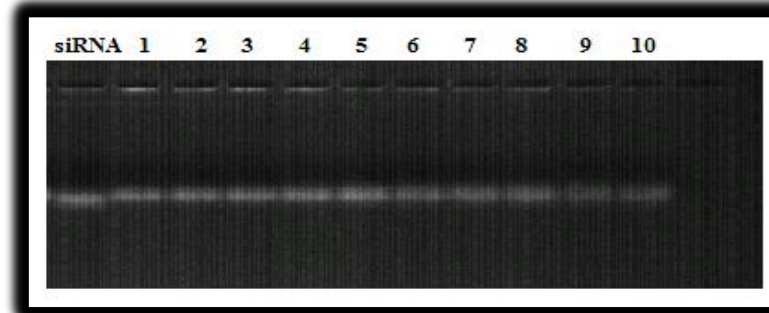
Çizelge 23. siRNA bağlama yetisi için çalışılan siRNA/formülasyon oranı

	siRNA	siRNA/Kitosan Formülasyonu ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)									
	1.5 μg	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:7.5	1:10	1:15	1:20	1:25
Uygulama alanı		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

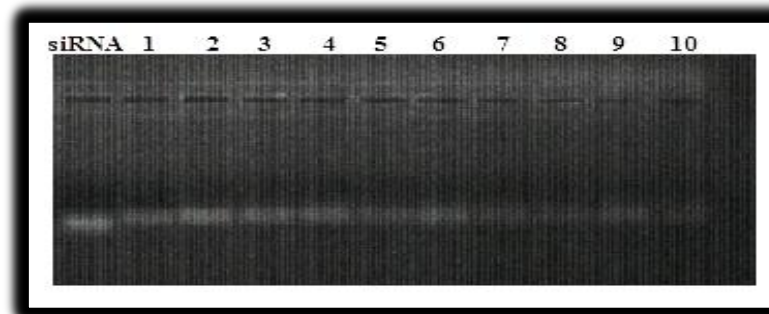
Jel konsantrasyonu: %1, Uygulanan gerilim ve süresi: 50mV, 1.5 saat



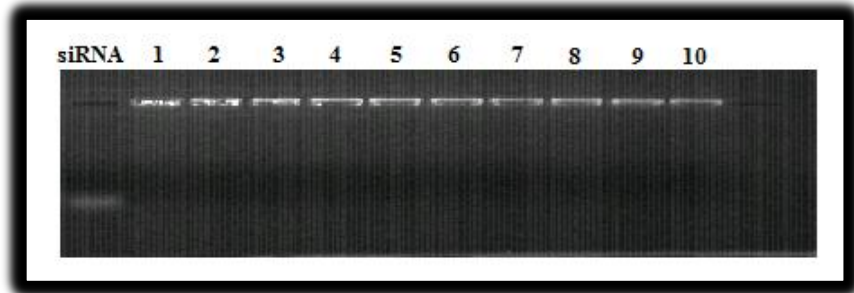
Şekil 60. K1'in siRNA bağlaması



Şekil 61. K2'nin siRNA bağlaması



Şekil 62. K3'ün siRNA bağlaması



Şekil 63. K4'ün siRNA bağlaması

Düşük molekül ağırlığındaki kitosanların taşıdığı az sayıdaki serbest amino grupları nedeniyle genetik materyal bağlayabilme oranının düştüğü belirtilmiştir (Choi ve ark., 2006). K4'de kullanılan kitosanın molekül ağırlığı kullanılan diğer kitosanlara göre daha yüksektir. Jel görüntülerinde K1, K2 ve K3'ün siRNA'yı bağlayamadığı görülmüştür. Oysa K4 siRNA'nın tamamını etkin şekilde bağlayabilmektedir.

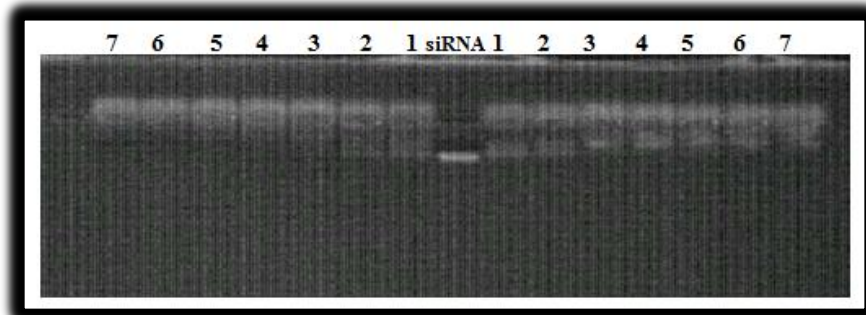
K1, K2 ve K3'ün siRNA'yı hangi oranlarda bağlayabildiğini saptamak için farklı oranlarda (1:50-1:300) bağlama çalışmaları yeniden yapılmış ve görüntüler elde edilmiştir (Çizelge 24). Bu oranlar K4 için denenmemiştir. Jele 30 dak. ve 2 saat akım uygulandıktan sonraki sonuçlar Şekil 64 ve Şekil 65'de gösterilmiştir.

Çizelge 24. K1, K2 ve K3'ün siRNA bağlama yetisi için çalışılan siRNA/formülasyon oranı

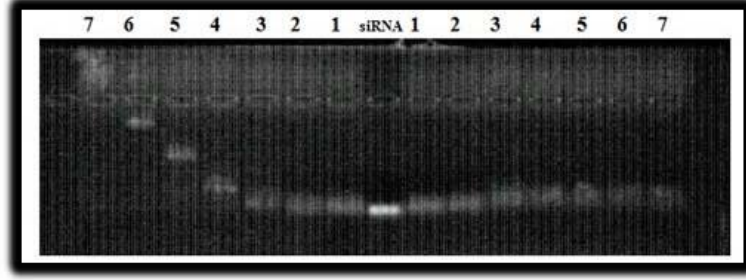
	siRNA	siRNA/Kitosan Formülasyonu (µg/µL)						
	1.5 µg	1:50	1:75	1:100	1:150	1:200	1:250	1:300
Uygulama alanı		1	2	3	4	5	6	7

Jel konsantrasyonu: % 1, Uygulanan gerilim ve süresi: 50 mV, 2 saat

30 dakika sonra:

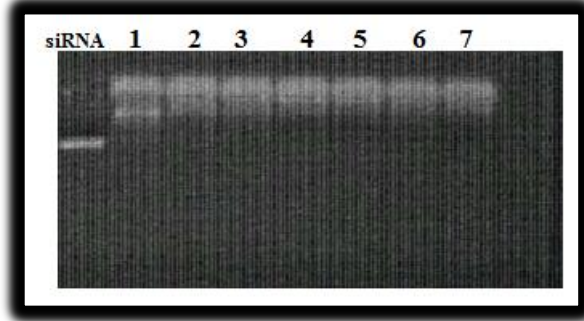


2 saat sonra:

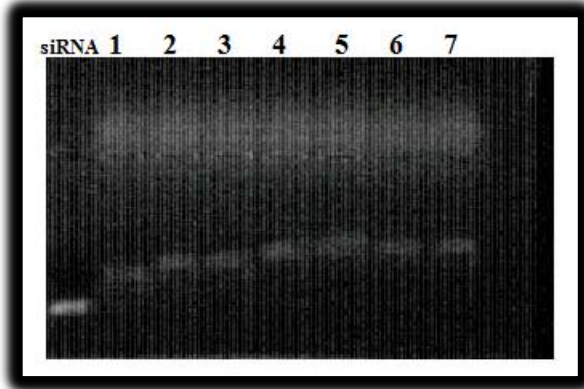


Şekil 64. K3 (sol) ve K1 (sağ) için farklı oranlarda siRNA bağlanması

30 dakika sonra:



2 saat sonra:



Şekil 65. K2 için farklı oranlarda siRNA bağlanması

Yüksek oranlarda yapılan siRNA bağlama çalışmasında, K2 ve K3'ün 30 dak'lık akım sonucunda siRNA'yı tutabildiği görülürken, akımın da etkisi ile daha uzun sürelerde siRNA'yı bıraktığı saptanmıştır. K1 için kuyucuk altında 30. dak'da görülen simir formülasyonun siRNA'yı tam olarak bağlayamadığını göstermektedir.

Uygulanan 2 saatlik akımdan sonra, K1, K2 ve K3 için yüksek oranlarda yapılan siRNA bağlama çalışmaları sonucunda K1'in en yüksek oranda bile siRNA'yı tam olarak bağlayamadığı bulunmuştur. K2'nin 1:150 ile 1:300 oranında siRNA'yı bağlamasında fark görülmemiştir; siRNA'yı belirli düzeyde tutabildiği jel görüntüsünden (**Şekil 65**) anlaşılmaktadır.

Genetik materyalin akım etkisiyle parçacık yüzeyinden belli bir süre sonunda sıyrılarak ayrıldığı ve kontrol siRNA'nın gerisinde kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca formülasyonların jel dokümantasyon analizinde kullanılan % 1'lik jelin gözenekleri arasından geçerek negatif kutuba doğru yöneldiği görülmektedir. Bununla birlikte pozitif uca doğru yol alan siRNA'nın kontrol olarak uygulanan siRNA'daki kadar ışıma göstermemesi negatif uca doğru yönelen formülasyonların az da olsa siRNA'yı bağlayabildiğini ve birlikte taşıdığını göstermektedir. K2'nin partikül boyutunun K1 ve K3'e göre daha ufak olması ile jelin gözenekleri arasından hareket etmesi beklenen bir durumdur.

K3'ün 1:150 oranına kadar siRNA'yı tam olarak bağlayamadığı ancak bu orandan sonra akım şiddeti ile siRNA'yı kademeli olarak bıraktığı gözlenmiştir. 1:300 oranında ise siRNA'yı ters yönde hareket ettirmiştir. Bu oranların transfeksiyon için oldukça yüksek olması nedeni ile K2 ve K3 değerlendirmeye alınmamıştır.

KLN Formülasyonlarında Ekstraksiyon Çalışmaları

Ekstraksiyon çalışması,

- G2 ve S5'in taşıdığı genetik materyal miktarının belirlenmesi,
- Formülasyonlarla birlikteki siRNA'nın serum içerisindeki kararlılığının belirlenmesi,
- Sonikasyon tekniği ile formülasyon oluşturulurken tekniğin siRNA üzerindeki etkisinin araştırılması,
- siRNA'nın geri kazanımının mümkün olup olmadığının belirlenmesi

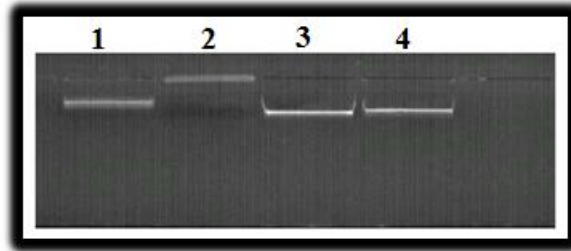
amacıyla yapılmıştır.

G2'ye siRNA bağlanmasının 1:10 (siRNA:G2) oranında gerçekleştiği saptanmıştır. 1:15 oranının 1:10'a göre daha iyi bağlanma özelliği gösterdiği ve transfeksiyon çalışmalarında bu oranın kullanılması söz konusu olduğundan, 1.5 µg siRNA ve 22.5 µL G2 içeren bileşime ekstraksiyon uygulanmıştır. Ekstraksiyon işleminin siRNA üzerindeki etkisini belirlemek üzere aynı işlem çıplak siRNA (1.5 µg) üzerinde de gerçekleştirilmiştir. Kontrol için 1.5 µg siRNA jele yüklenerek görüntülenmiştir (**Çizelge 25**).

Ekstraksiyon işlemi daha önce Yöntemler bölümünde (**sayfa 40**) anlatıldığı gibi DKM ve % 99'luk etanol ile yapılmıştır. En son TE içerisinde dağıtılan örnekler agoraz jele yüklenerek görüntü alınmıştır. Jel görüntüsü **Şekil 66**'de verilmiştir.

Çizelge 25. G2'ye uygulanan ekstraksiyon işleminde kullanılan miktarlar ve jeldeki kuyu numarası

	siRNA (μg)	siRNA/G2 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Eks-siRNA (μg)	Eks-siRNA/G2 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
	1.5	1:15	1.5	1:15
Ekstraksiyon	-	-	+	+
Kuyucuk No	1	2	3	4

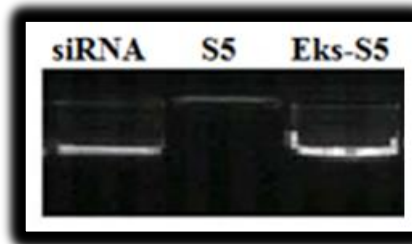


Şekil 66. G2'nin ekstraksiyon sonrası

Jel konsantrasyonu: % 2, Uygulanan gerilim ve süresi: 50 mV, 2 saat

Çıplak siRNA'nın ekstraksiyon işleminden etkilenmediği gözlenmiştir. Formülasyona adsorbe olan siRNA'nın ekstraksiyon sonrasında, kontrol siRNA ve ekstre edilmiş çıplak siRNA bantları ile aynı düzeyde olması belirgin kayıp olmadan elde edildiğini göstermiştir. siRNA'nın G2'den ayrılmadığı ikinci bantta kuyu dışında bant görülmemesi ile belirlenmiştir. Böylece formülasyona genetik materyal adsorbe edilmesinin siRNA bütünlüğü üzerinde olumsuz etki yaratmadığı ve formülasyondan kayıp olmadan geri kazanılabildiği saptanmıştır.

Sonikasyon ile hazırlanan S5'e 62.5 μg , 125 μg ve 250 μg siRNA'nın enkapsülasyonu denenmiştir. Transfeksiyon işleminde formülasyona 125 μg genetik materyal yüklendiğinden ekstraksiyon işlemi bu formülasyon üzerinde yapılmıştır (Şekil 67).



Şekil 67. S5'in ekstraksiyon sonrası

siRNA: 3 μg , Jel konsantrasyonu: %2, Uygulanan gerilim ve süresi: 50 mV, 2 saat

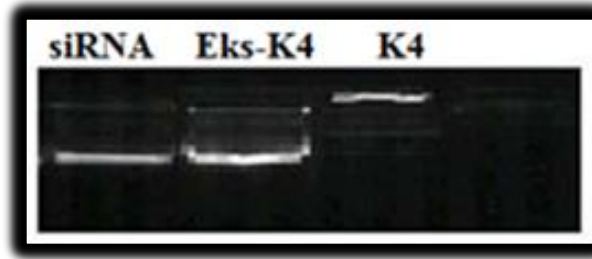
50 μL S5'e Yöntemler bölümünde (sayfa 40) G2 için kullanılan aynı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak jel görüntüsü elde edilmiştir. 50 μL S5 içinde enkapsüle edilen siRNA miktarının ~3 μg olduğu düşünüldüğünden, kontrol için de 3 μg

siRNA alınmıştır. Jel görüntüsünde formülasyondan ekstre edilen siRNA bandının ışıma şiddetinin kontrol siRNA'ya göre daha yoğun olduğu saptanmıştır. Bu bulgu formülasyonun içerisine amaçlanan miktarın hapsedilebildiğini ifade etmektedir. Tüm siRNA'nın enkapsülasyonu söz konusu olabilir ancak formülasyon aşamasında sulu fazda serbest haldeki (enkapsüle olmamış) siRNA'nın parçacıklara adsorbe olabilme olasılığı da mevcuttur. S5'den ekstre edilmiş siRNA bandında simir görülmemesi sonikasyon sırasında genetik materyalin hasar görmediğini göstermektedir.

siRNA'nın KLN'lere adsorbsiyonu ve enkapsülasyonunun gerçekleştirildiği ve bileşiklerin disperse halde iken kararlı olduğu belirlenmiştir.

Kitosan Formülasyonunda Ekstraksiyon Çalışması

Yöntemler bölümünde (sayfa 41) anlatılan Ekstraksiyon II yöntemi siRNA'yı en etkin şekilde bağlayan K4 formülasyonuna uygulanmıştır. K4 formülasyonuna siRNA en düşük konsantrasyonda (1:1) bile etkin şekilde bağlanabilmiştir. Transfeksiyon çalışmasında da kullanılacağı için 1.5 µg siRNA ve 1:2 siRNA/formülasyon oranına ekstraksiyon yapılmış ve jel görüntüsü **Şekil 68**'de verilmiştir.



Şekil 68. K4'ün ekstraksiyon sonrası

Jel görüntülerinde ekstraksiyon sonucu elde edilen siRNA'nın ışıma şiddetinin kontrole göre daha yoğun olduğu ve simir görüntüsünün bulunmadığı saptanmıştır. Yapılan ekstraksiyon çalışmasının siRNA üzerinde olumsuz etki yaratmadığı ve formülasyondan siRNA'nın tümünün kazanılabildiği belirlenmiştir.

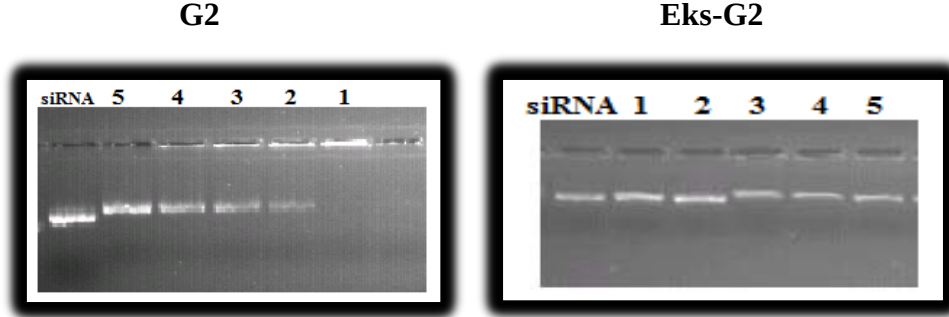
G2, S5 ve K4'ün Serumdaki Kararlılığı

Tranfeksiyon çalışmalarında dikkat edilmesi gereken parametreler arasında hücre yoğunluğu ve serumsuz/antibiyotiksiz besiyeri ile çalışmak bulunmaktadır. Formülasyonların siRNA ile inkübasyonunun serumsuz/antibiyotiksiz besiyerinde yapılmasının nedeni serumun genetik materyal ile lipit arasındaki elektrostatik etkileşimi inhibe etmesi olasılığıdır (Yuan, 1997).

Bu çalışmada siRNA/formülasyon bileşiklerinin serum varlığındaki kararlılığı karşılaştırmalı olarak araştırılarak genetik materyalin serum ortamındaki formülasyona bağlanma oranının veya taşıyıcı sistemin genetik materyali ortamdaki ne kadar koruduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu inceleme için transfeksiyon işleminde kullanılacak oranlarda siRNA/formülasyon bileşiği % 10 FBS içeren DMEM ile 37°C'de 1, 4, 10, 24 ve

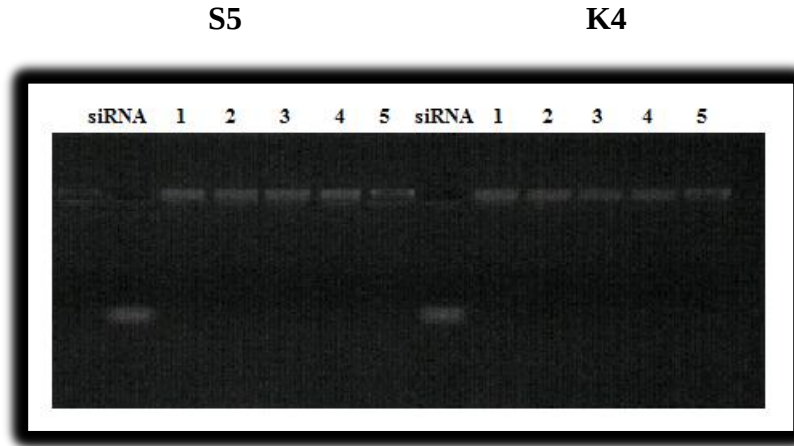
48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol siRNA ve formülasyon ile birlikte uygulanan siRNA konsantrasyonu 1 µg'dır. Sürelerin sonunda örnekler ekstraksiyonun ardından jel dokümantasyon sistemi ile görüntülenmiştir (Şekil 69 ve Şekil 70).



Şekil 69. G2'nin serumda bekletilmesinden ve ekstraksiyondan sonrası

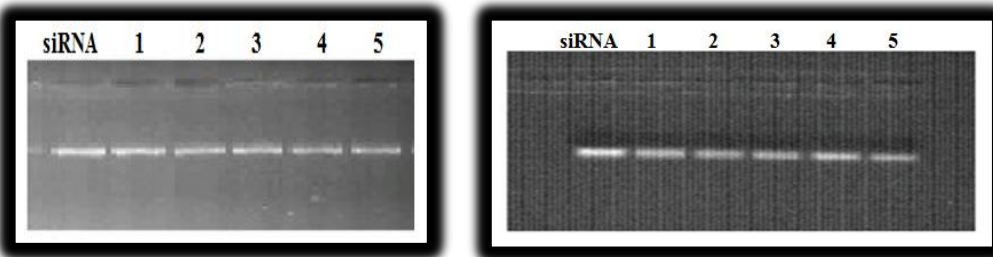
1: 1 saat, 2: 4 saat, 3: 10 saat, 4: 24 saat, 5: 48 saat

siRNA: 1 µg, Jel konsantrasyonu: % 1, Uygulanan gerilim ve süresi: 50 mV, 1.5 saat



Eks-S5

Eks-K4



Şekil 70. S5 ve K4'ün serumda bekletilmesinden ve ekstraksiyondan sonrası

1: 1 saat, 2: 4 saat, 3: 10 saat, 4: 24 saat, 5: 48 saat

siRNA: 1 µg, Jel konsantrasyonu: % 1, Uygulanan gerilim ve süresi: 50 mV, 1.5 saat

G2'nin 1. saatte genetik materyali bırakmadığı, 4. saatte bir kısmını serbest bıraktığı ve kademeli olarak artarak 48. saatte tamamen bıraktığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak G2'nin siRNA'yı serum varlığında 1 saatten fazla bağlayamadığı belirlendiğinden serum ortamının G2 ile siRNA arasındaki elektrostatik etkileşimi etkilediği düşünülmüştür.

Çıplak siRNA ile enkapsüle edilmiş siRNA'nın kararlılığı karşılaştırıldığında, enkapsüle edilen siRNA'nın serum degradasyonuna daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Gary ve ark., 2007). Benzer şekilde S5'de enkapsüle edilmiş siRNA'nın belirtilen saatler süresince tamamıyla korunduğu gözlenmiştir.

Serum içerisinde bulunan çeşitli lipazlar, nükleazlar ve yüksek yoğunluktaki lipoproteinler taşıma sistemleri ile etkileşebilir. Bu maddeler lipidik taşıma sistemlerindeki lipit içeriğin dışarı çıkmasına neden olmaktadır (Rao, 2010). Lipidik özellikteki S5'in çalışma süresi boyunca genetik materyali açığa çıkarmadığı ve korunmasını sağladığı görülmüştür. Transfeksiyon sırasında parçacığın hücre tarafından alım süresi bilinmediğinden, genetik materyali serum içerisinde hasar görmeden ve parçacıktan ayırmadan en az 48 saat saklayabileceği sonucu çıkarılmıştır. Bu sonuç G2 için geçerli değildir.

K4'e adsorbe edilmiş genetik materyalin belirtilen süreler içinde serum varlığında herhangi bir hasara uğramadığı gözlenmiştir. K4 siRNA'yı adsorbe etmesine karşın serum degradasyonundan korumaktadır. Oysa genetik materyali adsorbe edebilen G2 genetik materyali belli bir süreden sonra kararlı olarak bağlayamamaktadır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda etkin transfeksiyon için K4 ve S5'in uygun genetik materyal taşıyıcısı olabileceği düşünülmüştür.

Formülasyonların Transfeksiyon Çalışması

Karakterizasyon ve siRNA bağlama yetisinin değerlendirilmesi sonucu, transfeksiyon çalışmaları için siRNA'yı hücreye taşıyabilecek özellikte olduğu düşünülen G2, S5 ve K4 kullanılmıştır.

G2, S5, K4/siRNA Bileşimlerinin Parçacık Büyüklüğü

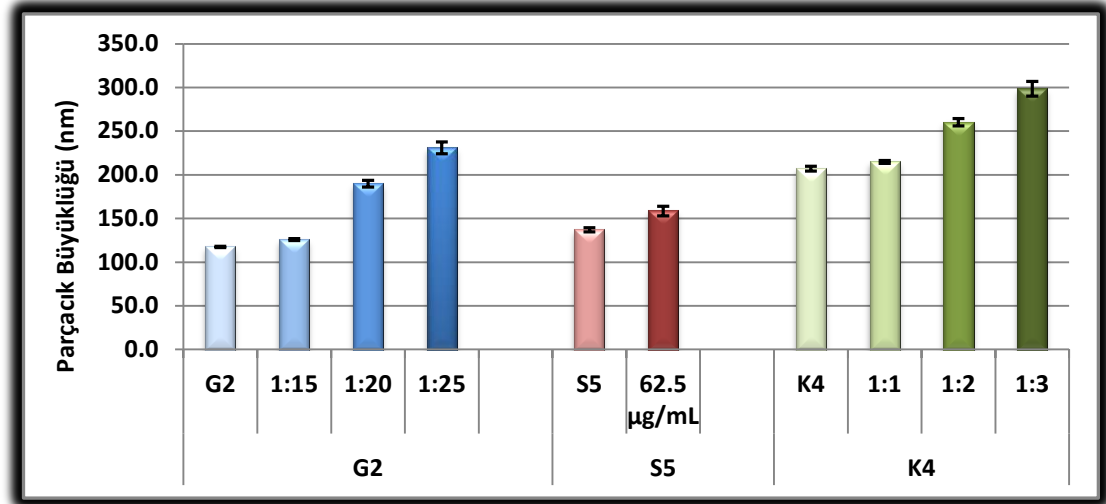
Literatürdeki transfeksiyon çalışmalarında formülasyonların genellikle endositoz yoluyla alındığı rapor edilmiştir. Özellikle 300 nm altında parçacık büyüklüğüne sahip lipit yapıdaki komplekslerin klatriin-aracılı endositoz ile, 500 nm üzerindeki komplekslerin ise kaveol-ilişkili endositoz ile hücreye alındığı belirtilmiştir (Rejman ve ark., 2004). Bu bilgiye göre transfeksiyon için kullanılacak olan genetik materyal/formülasyon kompleksinin parçacık boyutu önem taşımaktadır. Bu nedenle, daha önce partikül boyutu belirlenmiş olan G2, S5 ve K4'e siRNA eklendikten sonra partikül boyutundaki değişim incelenmiştir.

Kullanılan siRNA ve formülasyon oranı ve partikül boyutu **Çizelge 26**'de ve **Şekil 71**'de verilmiştir.

Çizelge 26. siRNA/formülasyon oranı ve ortalama parçacık büyüklüğü

	G2	siRNA/G2			S5	siRNA/S5	K4	siRNA/K4		
		1:15	1:20	1:25		62.5µg/ mL		1:1	1:2	1:3
Parçacık Büyüklüğü (nm) ± SH	117.43 ± 0.87	125.90 ± 1.06	189.83 ± 3.68	230.75 ± 6.78	137.03 ± 2.24	158.63 ± 5.50	207.07 ± 2.79	214.70 ± 1.67	260.30 ± 4.30	298.50 ± 8.30

SH: Standart Hata, n=3



Şekil 71. siRNA/formülasyon oranı ve ortalama parçacık büyüklüğü

siRNA adsorbe edilmemiş G2'nin parçacık boyutu 117.43 nm olarak bulunmuştur. siRNA oranı sabit tutularak formülasyon miktarının artırılmasıyla parçacık boyutunda kademeli olarak artış gözlenmiştir. Bu artışın nedeni parçacığın yüzeyine adsorbe olmuş siRNA'nın diğer parçacığın yüzeyine de adsorbe olarak parçacıkların bir arada tutulmasını sağlaması ve dolayısıyla birkaç parçacığın birlikte hareket etmesi olabilir. siRNA/G2 bileşimi için ölçülen en yüksek değer 230.75 nm'dir. K4 formülasyonunda da aynı etmenler nedeniyle parçacık boyutunda artış gözlenmiştir. Her iki formülasyon için saptanan parçacık boyutu transfeksiyon için uygun sınırlar içerisindeydir. Transfeksiyon işlemi sırasında G2 için 1:20 oranı, K4 için de 1:2 oranı kullanılmıştır.

Genetik materyal içermeyen S5'in parçacık boyutu 137.03 nm iken siRNA enkapsülasyonu sonucunda parçacık boyutunun 158.63 nm olduğu saptanmıştır. G2 ve K4 ile karşılaştırıldığında bu artışın anlamlı olmadığı düşünülmüştür. Enkapsüle edilen siRNA'nın G2'deki gibi başka parçacıklarla teması söz konusu olmadığından parçacık boyutunda belirgin artış gözlenmemiştir. Azaltılmış büyüklük ve nükleik asit vektörünün biyofiziksel davranışı ökaryotik hücrelerin transfeksiyonunda avantaj sağlayabilmektedir (Uddin, 2007). Dolayısıyla elde edilen boyut transfeksiyon için uygun bulunmuştur.

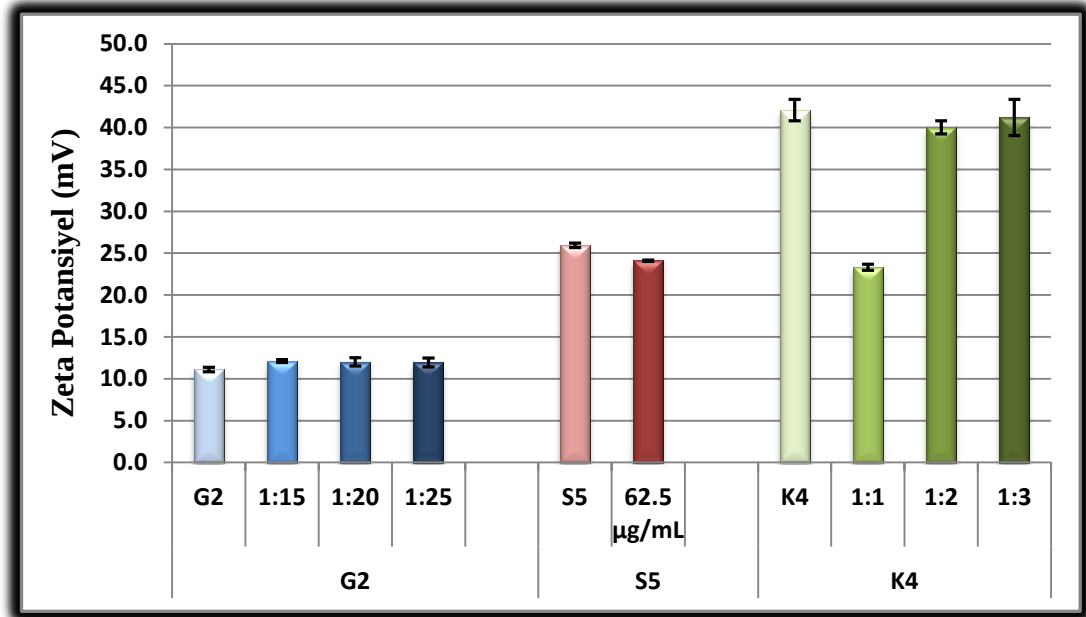
G2, S5, K4/siRNA Bileşimlerinin Zeta Potansiyeli

Membran kompozisyonu, transfekte edilecek hücre veya komplekslerin parçacık boyutu ve yüzey yükleri hücre giriş yollarından birini veya birkaçını etkilemektedir (Rejman ve ark., 2004; Khalil ve ark., 2006). Genetik materyal/taşıyıcı sistem bileşimlerinin negatif yüklü hücre zarları ile etkileşim sağlayabilmesi için net pozitif değer taşıması gerekmektedir (Uddin, 2007). siRNA içermeyen formülasyonların net yüzey yükleri G2 için 11.10 mV, S5 için 25.93 mV ve K4 için 42.07 mV olarak saptanmıştır (Çizelge 27 ve Şekil 72).

Çizelge 27. siRNA/formülasyonların zeta potansiyeli

	G2	siRNA/G2			S5	siRNA/S5 62.5 µg/mL	K4	siRNA/K4		
		1:15	1:20	1:25				1:1	1:2	1:3
Zeta Potansiyel (mV) ± SH	11.10 ± 0.28	12.13 ± 0.18	12.01 ± 0.49	11.95 ± 0.53	25.93 ± 0.28	24.10 ± 0.09	42.07 ± 1.28	23.30 ± 0.36	40.03 ± 0.78	41.20 ± 2.15

SH: Standart Hata



Şekil 72. siRNA/formülasyonların zeta potansiyeli

siRNA'nın adsorbsiyonu ve enkapsülasyonu sonucunda G2 ve S5'in zeta potansiyelinde belirgin değişim gözlenmemiştir. K4'ün siRNA ile 1:1 oranında % 50'ye yakın düşme görülmüştür. Ancak K4 oranı arttıkça bileşimin zeta potansiyelinin K4'ün siRNA yüklenmemiş zeta potansiyeline ulaştığı görülmüştür. Formülasyon miktarı artırıldıkça sabit miktardaki siRNA'ya düşen parçacık sayısı da artmaktadır. Parçacık boyutu analizi sırasında belirtildiği gibi siRNA'nın birkaç parçacığa bağlanması ve birlikte hareket etmesi nedeniyle zeta potansiyel de yükselmektedir. Formülasyon oranı düşürüldükçe parçacık yüzeyine adsorbe olan siRNA miktarı arttığı için zeta potansiyel değeri de düşmektedir.

Bu durumun G2 için geçerli olmamasının nedeni yüksek G2 konsantrasyonu dolayısıyla siRNA başına düşen parçacık sayısının fazla olması ve bu parçacıkların siRNA'ya bağlı olarak birlikte hareket etmesidir.

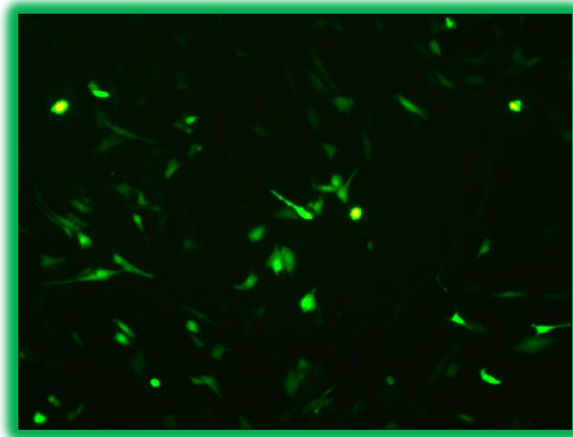
G2, S5, K4/siRNA bileşimleri transfeksiyon için uygun nanoboyutta ve hücre membranı ile etkileşmek için net pozitif yüktedir.

G2, S5, K4/siRNA Bileşimlerinin Transfeksiyonu

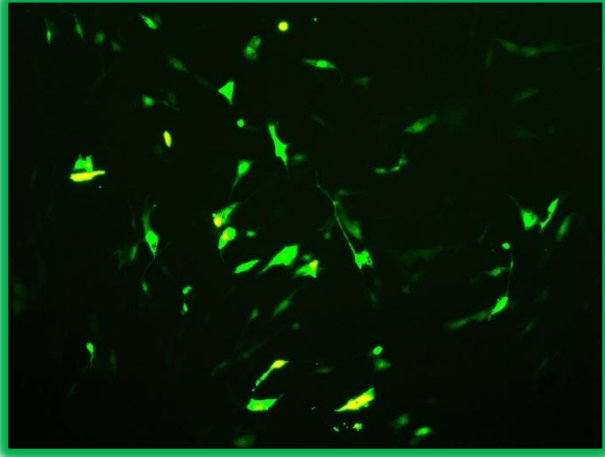
1980'lerin sonlarına doğru DOTMA'nın yalnızca DNA değil RNA taşıdığının da belirlenmesiyle, genetik materyalin taşınmasında katyonik lipozomlar yeni araştırma alanı oluşturmuştur. Bundan sonra genetik materyalin lipozom ve nanoyapıda lipid ve polimer içeren katyonik bileşikler yoluyla taşınmasının denendiği birçok çalışma yapılmıştır. Bu amaçla katyonik lipozom/lipid sistemi, Lipofectamin® 2000, DOTAP® ve DOTMA® gibi sayısız ticari ürün arasından seçim yapılabilirdiği gibi, yeni lipid sentezi ve tasarımı sürdürülmektedir. Örneğin, Lipofectamin® 2000 yüksek transfeksiyon etkinliği sağlayan ve *in vitro* olarak geniş alandaki memeli hücre tiplerinde yüksek düzeyde transfeksiyon sağlayan katyonik lipozom ajanıdır. Lipofectamin® 2000 aynı zamanda RNAi çalışmaları için memeli hücrelerine sentetik siRNA'nın transfeksiyonu için de başarıyla kullanılmaktadır (Reynolds ve ark., 2004; Ossovskaya ve ark., 2009). Lipofectamin® 2000 bu çalışmada kontrol olarak kullanılmış ve hazırlanan formülasyonların etkinliği karşılaştırılmıştır.

Transfeksiyon için hücre yoğunluğu önemlidir. Düşük yoğunluktaki ortamda transfeksiyon etkinliği daha yüksek olduğundan bu çalışmada yaklaşık % 60-70 yoğunluğa ulaşan hücre popülasyonu kullanılmıştır (Yang ve Huang, 1997). Transfeksiyon deneyinde formülasyonun hücreler üzerinde uzun süreli kalmasının etkisinin araştırılması için formülasyon bileşimleri iki ayrı plakaya aynı anda uygulanmıştır.

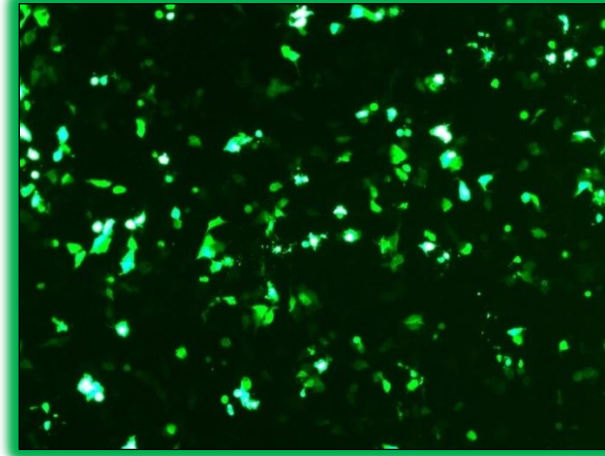
Transfeksiyon çalışmaları 24. ve 48. saatlerde görsel olarak değerlendirilmiş ve 10 X, 20 X ve 40 X büyütmeyle incelenmiştir. Çalışılan hücrelere göre ayrılan görüntüler Lipofectamin® 2000 için Şekil 73-Şekil 77'de, S5 için Şekil 78-Şekil 86'de, G2 için Şekil 88 ve Şekil 89'da ve K4 için Şekil 89-Şekil 99'de gösterilmiştir.



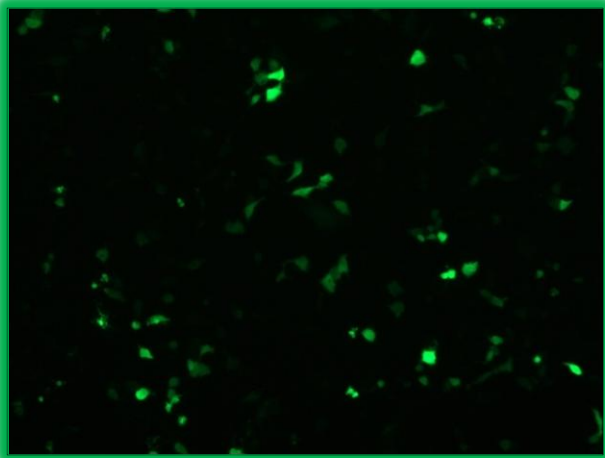
Şekil 73. A549 hücrelerinde Lipofectamin® 2000'in 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



Şekil 74. A549 hücrelerinde Lipofectamin® 2000'in 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



Şekil 75. MCF-7 hücrelerinde Lipofectamin® 2000'in 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)

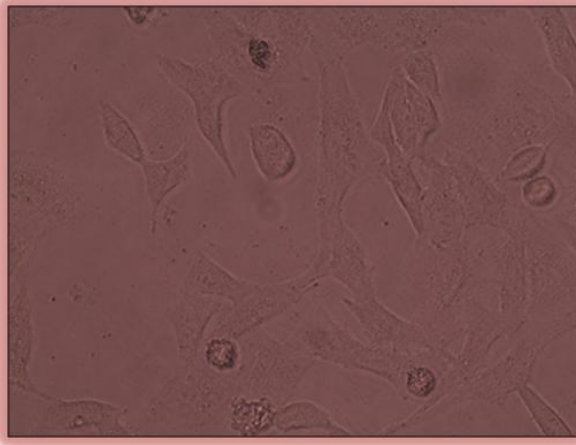


Şekil 76. MCF-7 hücrelerinde Lipofectamin® 2000'in 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)

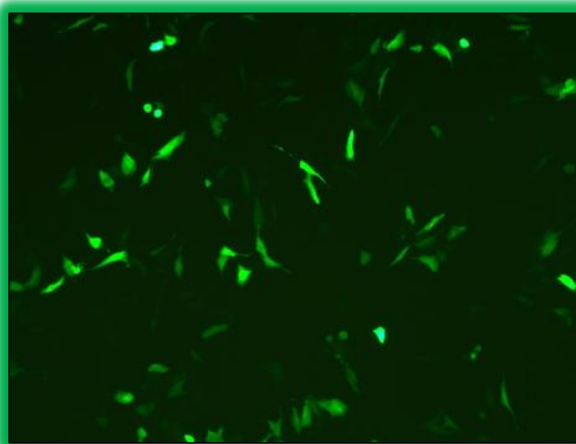
A549 ve MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik transfeksiyonlar karşılaştırıldığında MCF-7 hücrelerindeki transfeksiyonun görsel olarak çok daha iyi gerçekleştiği görülmektedir.

S5'in Transfeksiyonu

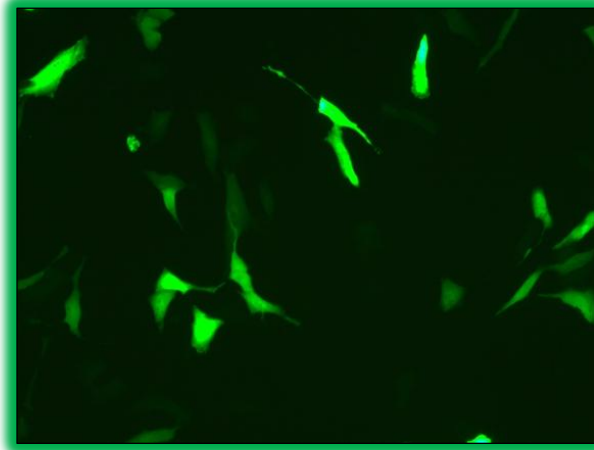
Katyonik KLN'ler lipozomal transfeksiyon ajanları gibi benzer katyonik lipidler kullanılarak gen transferi için formüle edilmektedir. Katı lipid ve lipozom arasındaki yapısal ve performans benzerlik ve farklılık araştırılmış ve parçacık boyutunun lipozomlara göre daha ufak ve genetik materyal bağlamada farklılık olduğu görülmüştür. Bu nedenle katyonik KLN'ler avantajlı ve farklı teknolojik özellikleri ile potansiyel nonviral transfeksiyon ajanı olarak uygulama alanını genişletmektedir (Ekambaram ve ark., 2012). S5 ile yapılan transfeksiyon sonuçları **Şekil 77-85**'de verilmiştir.



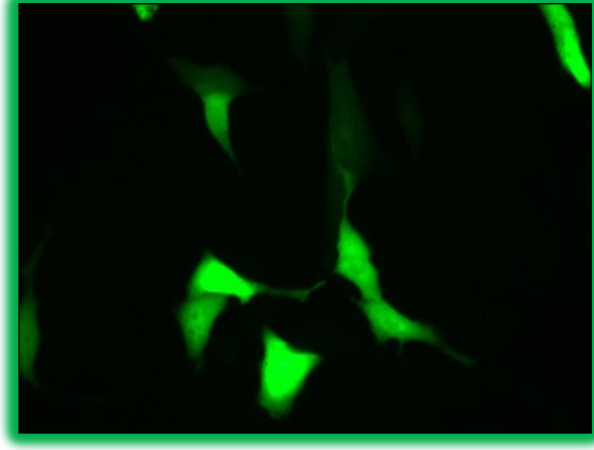
Şekil 77. S5'in A549 hücrelerinde 24 saatlik invert mikroskop görüntüsü (40 X büyütme)



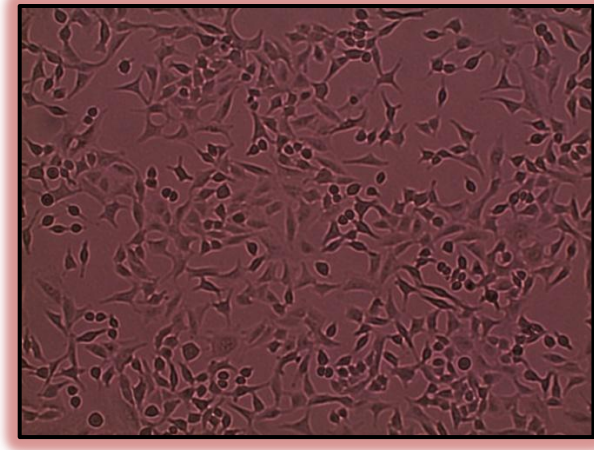
Şekil 78. S5'in A549 hücrelerinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)



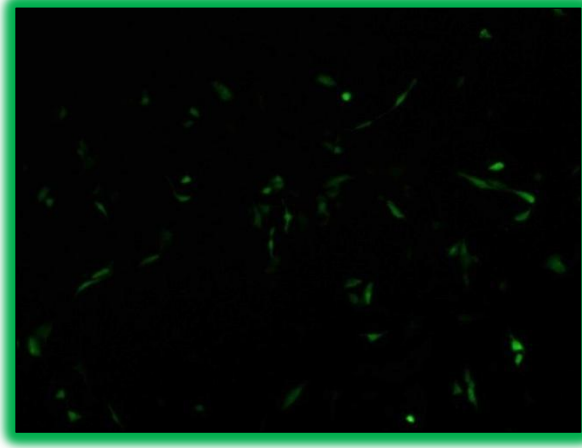
Şekil 79. S5'in A549 hücresinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



Şekil 80. S5'in A549 hücresinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (40 X büyütme)



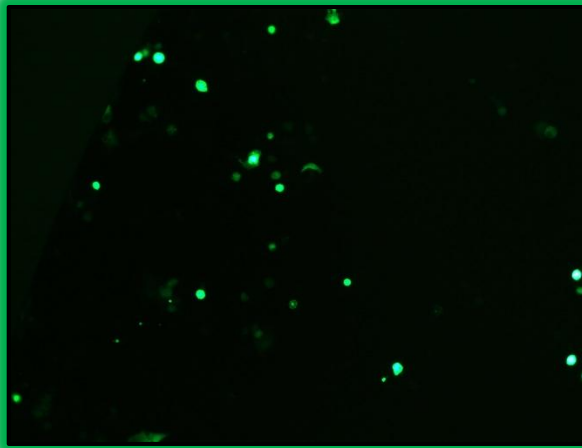
Şekil 81. S5'in A549 hücresinde 48 saatlik invert mikroskop görüntüsü (10 X büyütme)



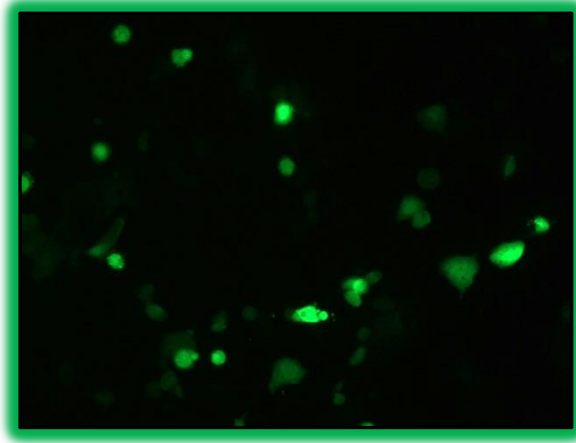
Şekil 82. S5'in A549 hücresinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)



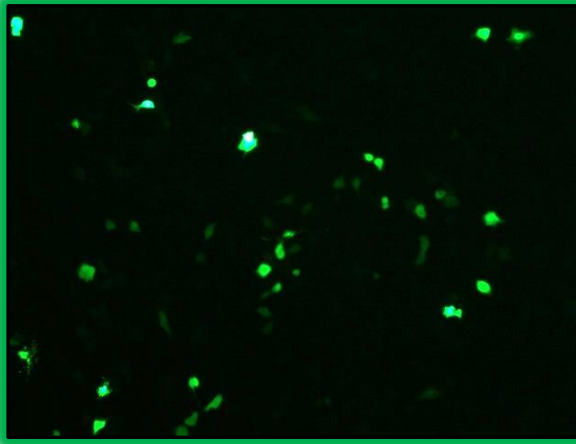
Şekil 83. S5'in A549 hücresinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



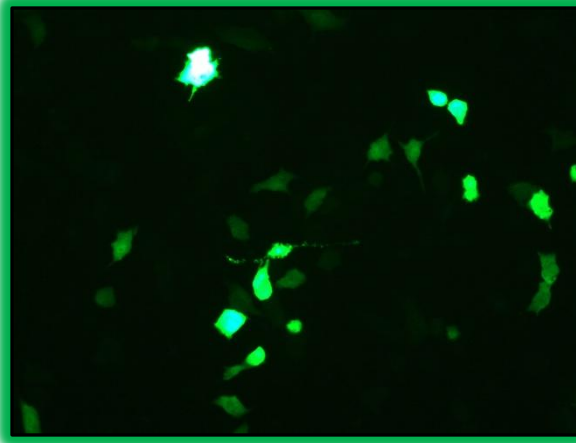
Şekil 84: S5'in MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)



Şekil 85: S5'in MCF-7 hücrelerindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



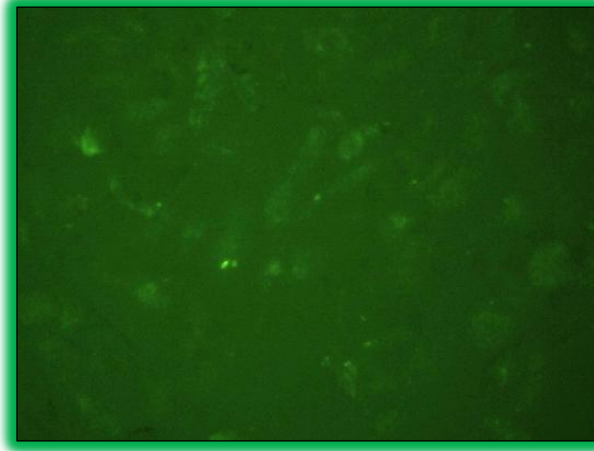
Şekil 86. S5'in MCF-7 hücresinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)



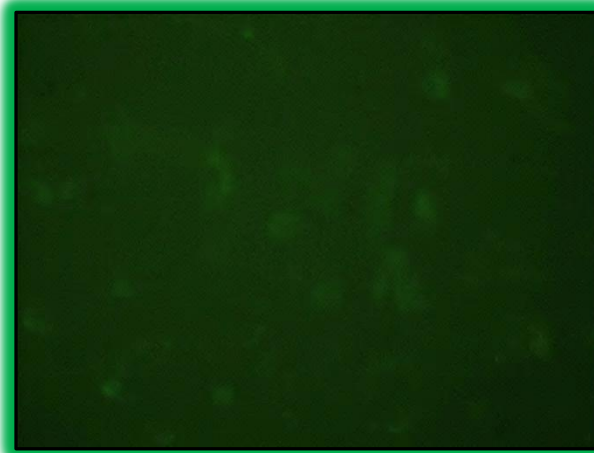
Şekil 87. S5'in MCF-7 hücresinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)

G2'nin Transfeksiyonu

Floresan mikroskop analizinde diğer formülasyonlarda görülen ışımların G2'de görülmediği saptanmıştır. Daha önce yapılan serum içindeki kararlılık çalışmasında G2'nin siRNA'yı belli bir süreden sonra bıraktığı belirlenmiştir. Transfeksiyon çalışmasında 6. saat sonunda eklenen besiyeri içindeki serumun G2 ile siRNA arasındaki elektrostatik etkileşimin kaybına neden olduğu ve genetik materyali besiyeri içinde serbest bıraktığı düşünüldüğünden transfeksiyon işleminin gerçekleşmediği kanısına varılmıştır (**Şekil 88 ve 89**). Buna ek olarak, siRNA adsorbe edilmiş parçacığın yüzey yükünün düşük olması ve parçacığın hücre yüzeyine tutunmasının etkilenmesi de transfeksiyonun gerçekleşmeme nedeni olabilir.



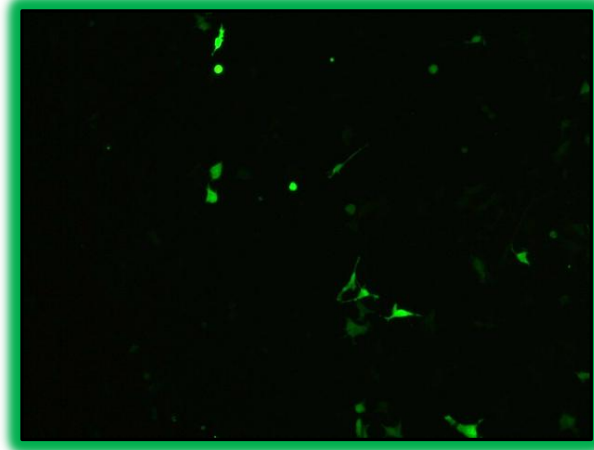
Şekil 88. G2'nin A549 hücresinde 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



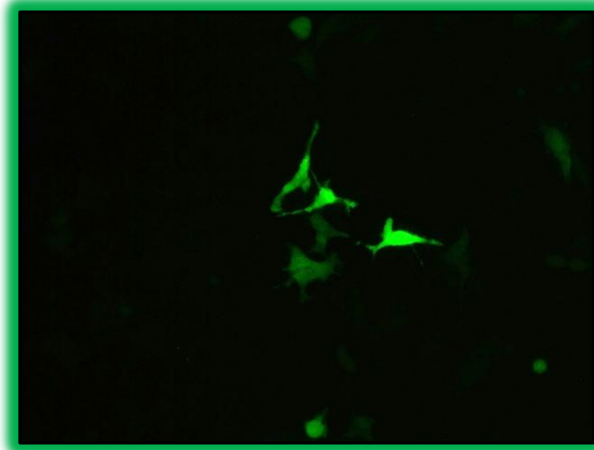
Şekil 89. G2'nin A549 hücresinde 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)

K4'ün Transfeksiyonu

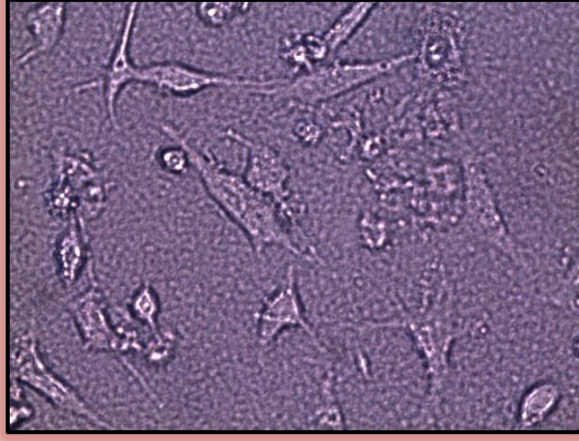
Bcl-2 siRNA'nın polimerlerle farklı hücrelere taşınması çalışılmış ve PEG, PEI ve asetik asitte çözünen kitosan gibi polimerik formülasyonlar ile ekspresyonun başarılı şekilde azaldığı floresan veya konfokal mikroskopla gösterilmiştir (Chen ve ark, 2010; Andersen ve ark. 2010). K4 formülasyonu ile yapılan çalışmalar **Şekil 90-100**'da verilmiştir.



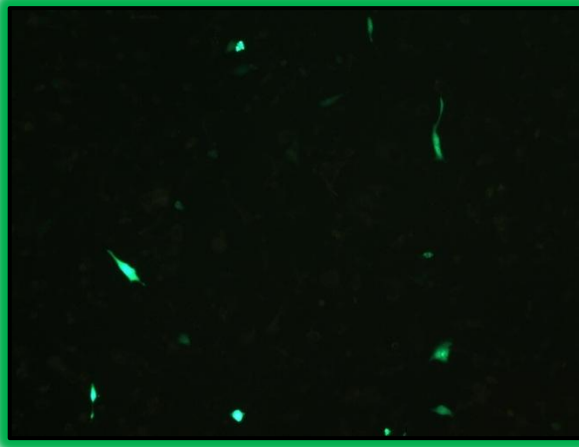
Şekil 90. K4'ün A549 hücresindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)



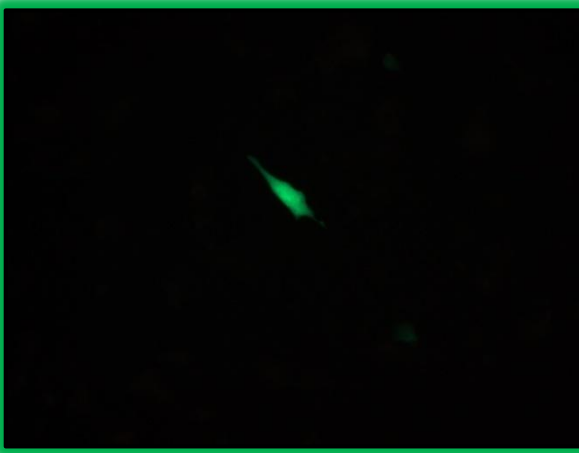
Şekil 91. K4'ün A549 hücresindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



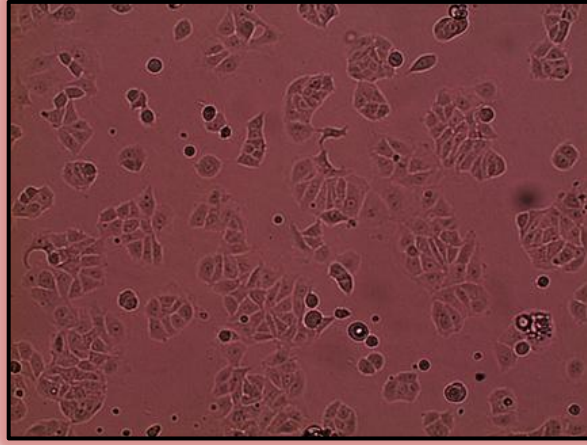
Şekil 92. K4'ün A549 hücresindeki 48 saatlik invert mikroskop görüntüsü (40 X büyütme)



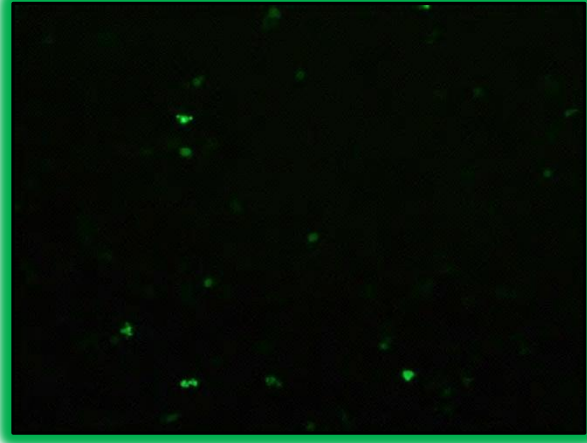
Şekil 93. K4'ün A549 hücresindeki 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)



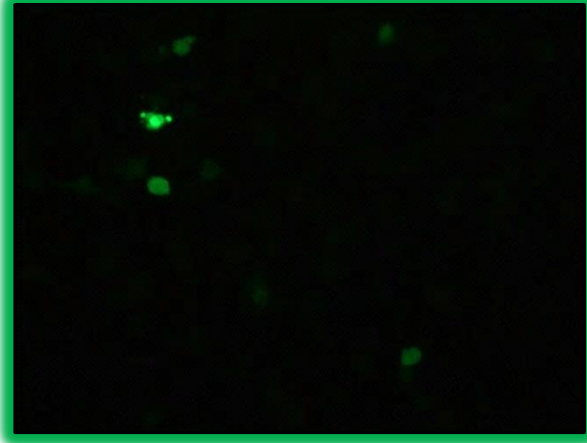
Şekil 94. K4'ün A549 hücresindeki 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



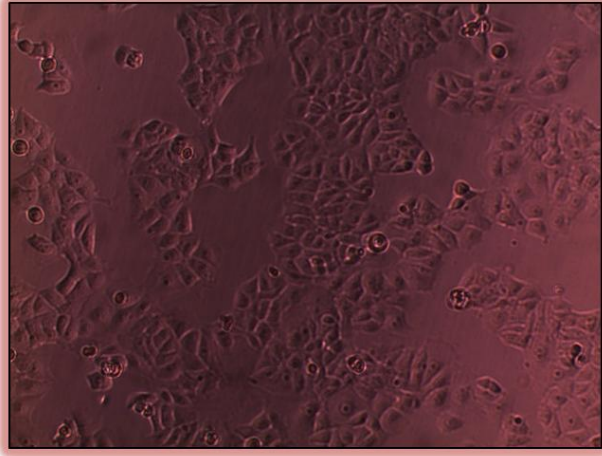
Şekil 95. K4'ün MCF-7 hücresindeki 24 saatlik invert mikroskop görüntüsü (20 X büyütme)



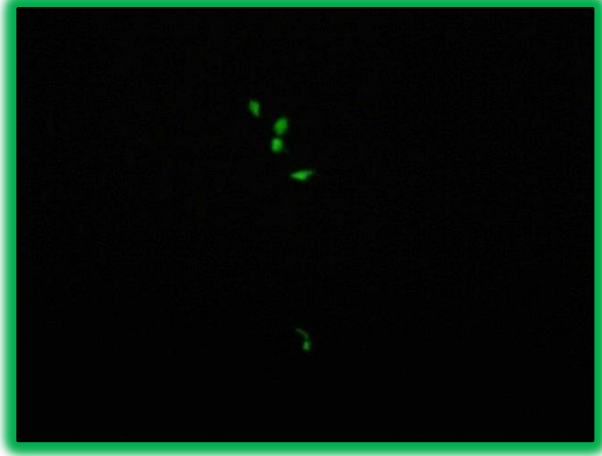
Şekil 96. K4'ün MCF-7 hücresindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)



Şekil 97. K4'ün MCF-7 hücresindeki 24 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)



Şekil 98. K4'ün MCF-7 hücresindeki 48 saatlik invert mikroskop görüntüsü (20 X büyütme)



Şekil 99. K4'ün MCF-7 hücresindeki 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (10 X büyütme)



Şekil 100. K4'ün MCF-7 hücresindeki 48 saatlik transfeksiyon görüntüsü (20 X büyütme)

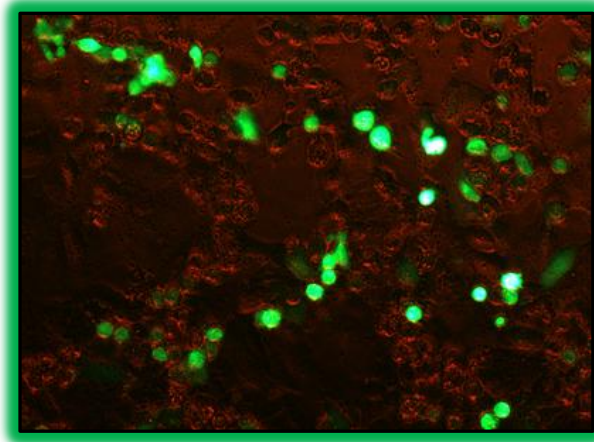
Yapılan tüm transfeksiyon çalışmalarında bileşimler alınmadan transfeksiyona devam edilen plakalarda daha yoğun transfeksiyon olduğu gözlenmiştir. Bunun sonucunda sitotoksikite sorunu olmaması durumunda komplekslerin alınmamasının transfeksiyonu arttırabileceği görüşüne varılmıştır. Hücreler özellikle % 50-60 oranında yoğunluk olacak şekilde ekildiğinde transfeksiyonun daha iyi gerçekleştiği görülmüştür.

Mikroskop incelemelerinde S5'in K4'e göre çok daha iyi transfeksiyon etkinliği gösterdiği saptanmıştır. K4'ün transfekte olup ışımaya yaydığı hücreler çok azdır. Görsel olarak değerlendirildiğinde S5'in Lipofectamin® 2000'e yakın etkinlik gösterdiği düşünülmüştür.

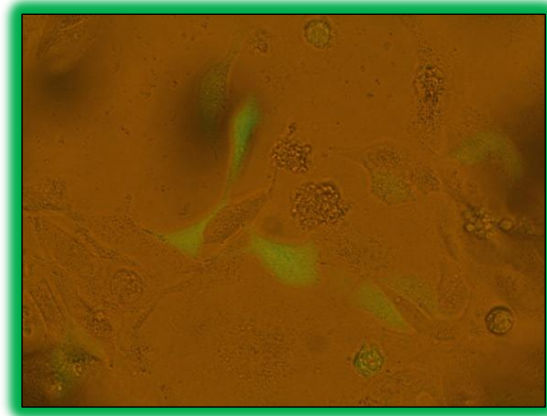
Etkinliğin sayısal ve protein miktarı düzeyinde de incelenmesi formülasyonların gerçek etkinliği hakkında fikir verecektir.

Transfeksiyonun Hücreler Üzerinde Sayısal Olarak Değerlendirilmesi

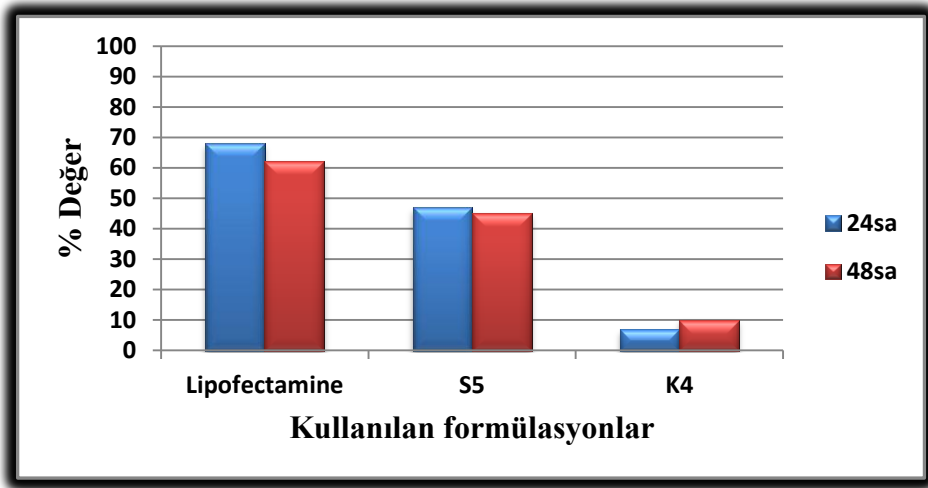
Bu çalışmada transfeksiyon yapılan hücrelerde mikroskopta 40 X büyütmede 20 alan belirlenmiştir. Belirlenen alanda her bir deney için toplam yaklaşık 500 hücre (transfekte olmayan ve transfekte olan hücreler) sayılmıştır. Hücreler mikroskopta floresan ve aydınlık filtrede ve floresan+aydınlık filtrede incelenmiştir (**Şekil 101 ve Şekil 102**). Sayılan hücreler Yöntemler Bölümü'nde (**sayfa 43**) verilen eşitlik ile % hesabı yapılarak değerlendirilmiş ve grafik haline getirilmiştir (**Şekil 103 ve Şekil 104**).



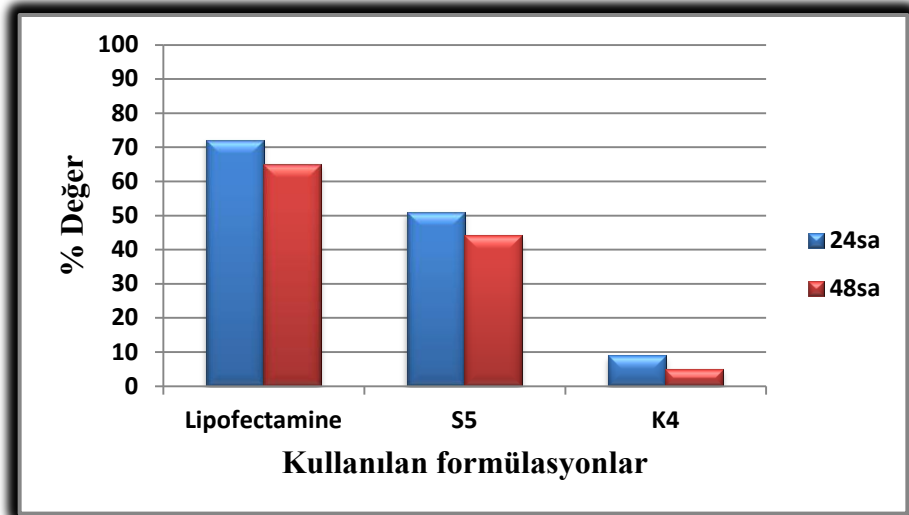
Şekil 101. MCF-7 hücresinin floresan/aydınlık filtrede görüntüsü (20 X büyütme)



Şekil 102. A549 hücresinin floresan/aydınlık filtrede görüntüsü (40 X büyütme)



Şekil 103. Formülasyonların A549 hücresinde 24 ve 48 saatlik hücre sayımı yüzdesi



Şekil 104. Formülasyonların MCF-7 hücresinde 24 ve 48 saatlik hücre sayımı yüzdesi

A549 hücresinde yapılan 24 ve 48 saatlik transfeksiyonda hücrelerin sayımı ile hesaplanan sonuçlara göre transfeksiyon oranı, sırasıyla, S5 için % 47 ve % 45,

Lipofectamin® 2000 için % 68 ve % 62, K4 için ise % 7 ve 10 olarak bulunmuştur. G2 formülasyonunda ışıma görülemediği için hesaplama yapılmamıştır.

Lipofectamin® 2000, S5 ve K4 istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 24. saatte Lipofectamin® 2000 ile S5 arasında önemli bir fark yokken ($p>0.05$), K4 ile Lipofectamin® 2000 ve K4 ile S5 arasında ileri düzeyde fark görülmüştür ($p\leq 0.001$). 48. saatler karşılaştırıldığında da bütün formülasyonların aralarında ileri düzeyde fark olduğu saptanmıştır ($p\leq 0.001$).

Literatürde siRNA ile yapılan transfeksiyon çalışmalarında yüksek polimer içeriğinin, diğer bir deyişle yüksek N/P oranının, nanoparçacık kararlılığında ve *in vivo* ve *in vitro* gen susturumunda artışa yol açtığı belirtilmiştir (Grayson ve ark., 2006; Liu ve ark., 2007). Bu çalışmada hazırlanan KLN sistemlerinden S5'in G2'ye göre daha başarılı transfeksiyon gösterdiği saptanmıştır.

MCF-7 hücresinde yapılan 24 ve 48 saatlik transfeksiyonda hücrelerin sayımı ile hesaplanan sonuçlara göre transfeksiyon oranı, sırasıyla, S5 için % 51 ve % 44, Lipofectamin® 2000 için % 72 ve % 65, K4 için ise % 9 ve % 5 olarak bulunmuştur. G2 formülasyonunda hiçbir ışıma görülmediği için hesaplama yapılmamıştır.

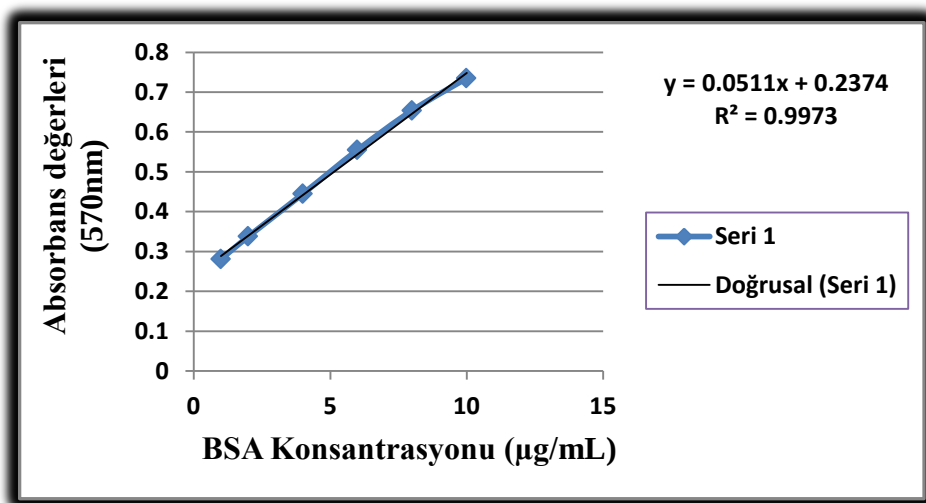
A549 hücrelerinde görülen istatistiksel sonuçların aynısı bu hücrelerde için de belirlenmiştir.

Transfeksiyon Yapılan Hücrelerden Protein Elde Edilmesi

Protein Miktar Tayini

Örneklerden elde edilen toplam protein özütü ve BSA standardı Micro BCA protein testi çözeltisi karışımlarının absorbansı UV-spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Standard eğri oluşturulduğunda bulunan $r = 0.997$ değeri doğrusal ilişkinin güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Elde edilen standart eğri Şekil 105'de verilmiştir.



Şekil 105. BSA proteinlerinin standart eğrisi

Bu çalışmada her bir formülasyon için 6 kuyucuklu hücelere 2'li ekim yapılmış ve bu hücrelerden toplam protein elde edilmiştir. BSA proteini için hazırlanan standart eğri kullanılarak protein miktarı hesaplanmış ve **Çizelge 28'**de verilmiştir.

Çizelge 28. Formülasyonlar için hesaplanan protein konsantrasyonu

	S5			K4			Kontrol			Lipofectamine® 2000		
Saat	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Protein miktarı µg/5 µL	8.43	8.17	6.98	8.43	11.21	12.91	9.05	13.07	14.71	8.80	11.25	5.80

SDS ve Western Blot Çalışması

Lipofectamin® 2000, S5 ve K4'ün A549 hücrelerinde yapılan transfeksiyon çalışması sonucunda 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerden elde edilen toplam proteindeki Bcl-2 proteini için önce SDS daha sonra *Western Blot* çalışması yapılmıştır.

SDS elektroforez çalışmasında toplam proteinde var olabilecek azalma 24., 48. ve 72. saatte gözle görülmemiştir. SDS elektroforezin ardından yapılan *Western Blot* çalışması Bcl-2 proteininin miktarı için fikir oluşturmıştır. Bu çalışmada Bcl-2 proteinin tespiti için kullanılan antikor Bcl-2(C-2) (*Santa Cruz Biotechnology*) fare monoklonal antikorudur ve insan orjinli Bcl-2 proteininde 1-205 aminoasitlik kısmına karşılık gelmektedir.

Buna göre protein analizinde 24. ve 48. saatlerde herhangi bir artma veya azalma görülmemiştir. 72. saatte siRNA/Lipofectamin® 2000 bileşimi S5 ve K4'e göre, S5 de K4'e göre daha fazla etkinlik göstererek Bcl-2 proteininin azaltıldığı belirlenmiştir. Yapılan değerlendirmede çalışmaların 72 saatten daha fazla sürdürülmesi ile etkinin daha iyi görülebileceği kanısına varılmıştır.

*Western Blot*lama ve antikorlama işlemi Yöntemler Bölümü'nde (**sayfa 47**) anlatıldığı gibi yapılmıştır. Kullanılan antikor dilüsyonları arasında en uygun dilüsyonun A549 hücrelerinden elde edilen proteinlerle yapılan çalışmalarda 1:200, MCF-7 proteinleri ile yapılan çalışmalarda ise 1:500 olduğu belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonucu elde edilen proteinlerin *Western Blot*lama sonuçları **Şekil 107-110'**da verilmiştir.

Formülasyonların MCF-7 hücrelerindeki etkisinin belirlenebilmesi için yapılan SDS ve *Western Blot* çalışmalarında, elde edilen proteinlerde 24 ve 48 saatlik bantlarında gözle görülen bir değişiklik yoktur. Ancak 48 ve 72 saatlik bantlarda S5 Lipofectamin® 2000'e yakın etkinlik gösterirken (protein azalması) K4'ün etkisi görülmemiştir (**Şekil 109 ve Şekil 110**).

Kanser hücrelerinde çok fazla görülen anti-apoptotik faktörler ile hücre ölümünün önlenmesi anormal hücre büyümesi ve kemo-radyo-dirence yol açmaktadır. Bu nedenle hücrelerin fonksiyonunun düzenlenmesi önemli tedavi girişimleri arasında yer almaktadır. Anti-apoptotik faktörler arasında sayılan Bcl-2, Bcl-xL,

survivin, X-kromozom ilişkili IAP (XIAP) ve Fas ilişkili ölüm *domain*'leri bir çok çalışmada RNAi teknolojisinde hedef gösterilmektedir (Masiero ve ark., 2007).

Bcl-2 akciğer, *non-Hodgkin* lenfoma ve prostat kanseri gibi birçok tümörde aşırı derecede eksprese olmaktadır. Bcl-2'ye karşı kullanılan katyonik lipozom ilişkili siRNA'nın güçlü antitümör etkisi karaciğer metastazlı fare modellerinde gösterilmiştir (Yano ve ark., 2004).

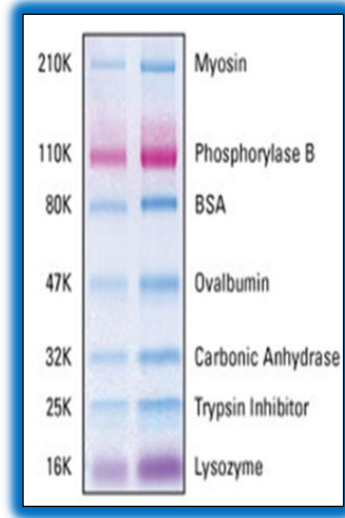
Sonoke ve ark.'nın (2008) yaptığı çalışmada, PEG-katyonik lipozom kompleksinin insan prostat kanseri ksenograft modelinde yan etkisi olmadan tümör hücreleri tarafından alındığı ve güçlü antitümör etkisinin görüldüğü bildirilmiştir.

Feng-Fu ve ark.'ı (2005) insan (HelaB2 ve BGC-823) hücrelerinde ve fare karaciğer tümörü üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, Lipofectamin® 2000 ile kompleks oluşturulmuş Bcl-2 siRNA'sının Bcl-2 proteinini % 66.5 oranında inhibe ettiğini göstermiştir.

Bcl-2 genine ait siRNA ile yapılan bir diğer çalışmada, Bcl-2 siRNA'sının gastrik kanser hücreleri üzerinde hem mRNA hemde protein düzeyinde zaman ve doza bağlı olarak belirgin inhibisyon gösterdiği saptanmıştır (Hao ve ark., 2007). Kanser hücrelerinin apoptozunda yaklaşık % 40 oranında artış ve tümör büyümesinde azalma olduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, Bcl-2 geninin gastrik karsinogenezde önemli rol oynadığı ve gelecekte Bcl-2 geninin siRNA ile inhibe edilme mekanizmasının yeni ve etkin gen terapisi yöntemi olabileceği açıklanmıştır.

Lipofectamin® 2000'in taşıyıcı olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada ise köpek meme bezi tümör hücrelerinde doksorubisin'in etkinliğinin artırıldığı saptanmıştır (Nagamatsu ve ark., 2008). Aynı şekilde Lima ve ark.'ı (2004) Lipofectamin® 2000 ile MCF-7 hücresinde gerçekleştirdikleri çalışmada Bcl-2 siRNA'sının etoposid ve doksorubisin etkinliğini % 50 oranında arttırdığını bildirmiştir.

Bu çalışmada yapılan transfeksiyon çalışmalarına göre, G2'de gözle görülebilen ışıma olmaması nedeniyle SDS ve *Western Blot* çalışmaları yapılmamıştır. siRNA'yı bağlayabilen ve transfeksiyonu gerçekleştiren S5 ve K4'ün *Western Blot* öncesinde SDS jelde görüntülerine bakılmıştır. Kontrol olarak hiçbir formülasyon uygulanmamış hücre popülasyonundan elde edilen total protein kullanılmıştır. Her bir formülasyondan ve kontrolden elde edilen total protein kütlelerinden 20'şer µL örnek 1 X yükleme tamponu ile karıştırılmış ve 95°C'de 2 dak sürede protein yapısı bozulduktan sonra kuyucuklara yüklenmiştir. Ayrıca proteinlerin molekül ağırlığını belirlemek için protein işaretleyici yüklenmiştir. Protein işaretleyici belli molekül ağırlığındaki proteinler için farklı renkte bant olarak görülmektedir (Şekil 106).

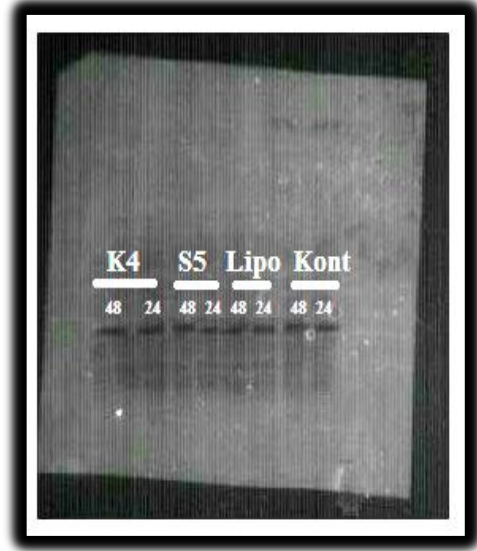
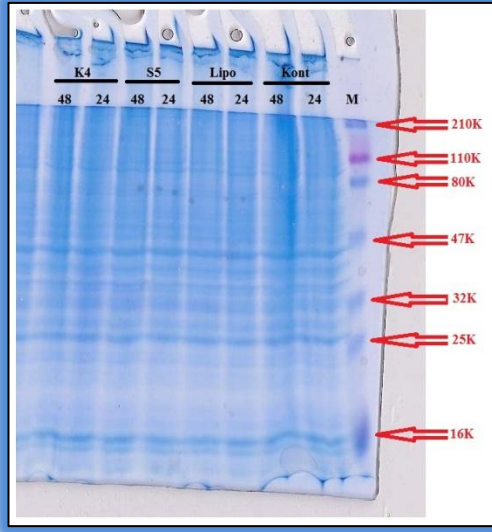


Şekil 106. Proteinlerin moleköl ağırlığını gösteren 3 renkli bant

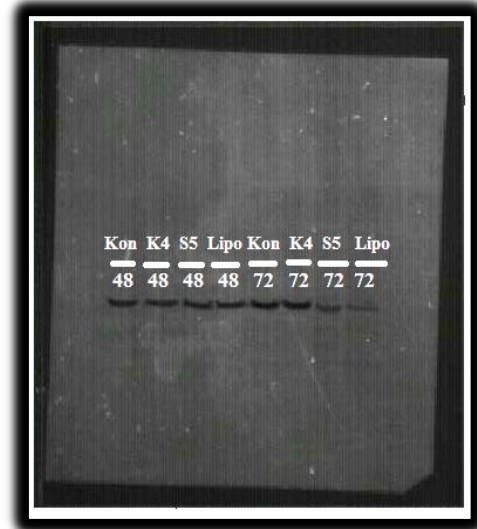
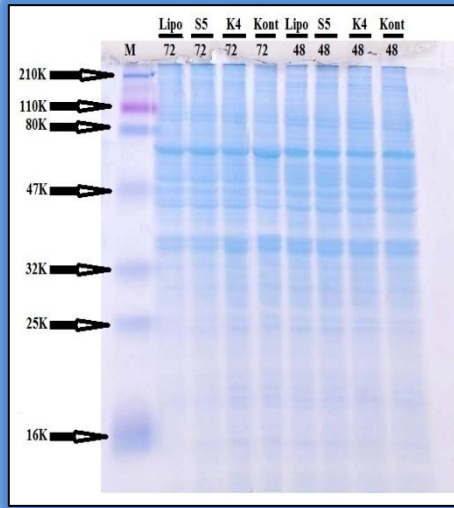
SDS çalışması sırasında tank içerisindeki iki kasette poliakrilamit jel yürütülmüştür. Bu jellerden birisi *brillant blue* boyası ile boyanmış, diğeri ise *Western Blot*'a aktarılarak proteinler membrana yüklenmiştir. SDS jelde 2.5 saat, 100 Volt ve 25 mA güçte elektroforez gerçekleştirilmiştir.

Komessie brilliant boyasında jel bir gece bekletilmiştir. Bir gece sonunda bantların daha net görülebilmesi için jeldeki fazla boya distile suyla yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan Bcl-2 proteini 26kDa moleköl ağırlığına sahiptir. Bu nedenle SDS jeli üzerinde görülen 25kDa'luk tripsin inhibitör proteinin bizim proteinimizin yaklaşık yeri hakkında bilgi vermektedir.

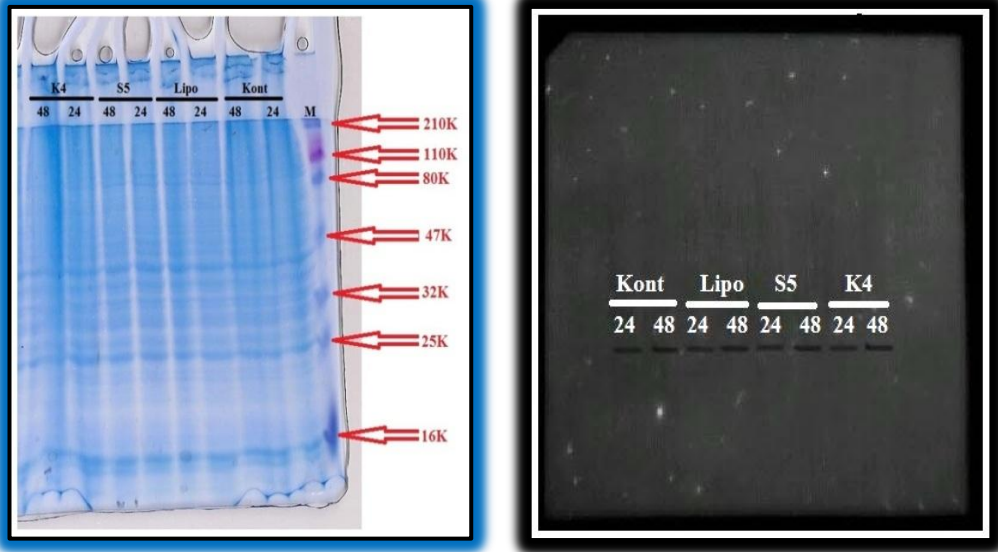
Western Blot çalışması için aynı tanka yüklenen ikinci jel hiçbir boyama işlemi görmeden membrana aktarılmıştır. Primer antikor olarak Bcl-2 monoklonal antikoru uygulandıktan sonra HRP substratı ve ECL çözeltileri bantların görüntülenebilmesi için uygulanmıştır. Membran daha sonra CCD kamera ile görüntülenmiştir. **Şekil 107-110**'da örneklerin 24, 48 ve 72 saatlik sonuçları verilmiştir.



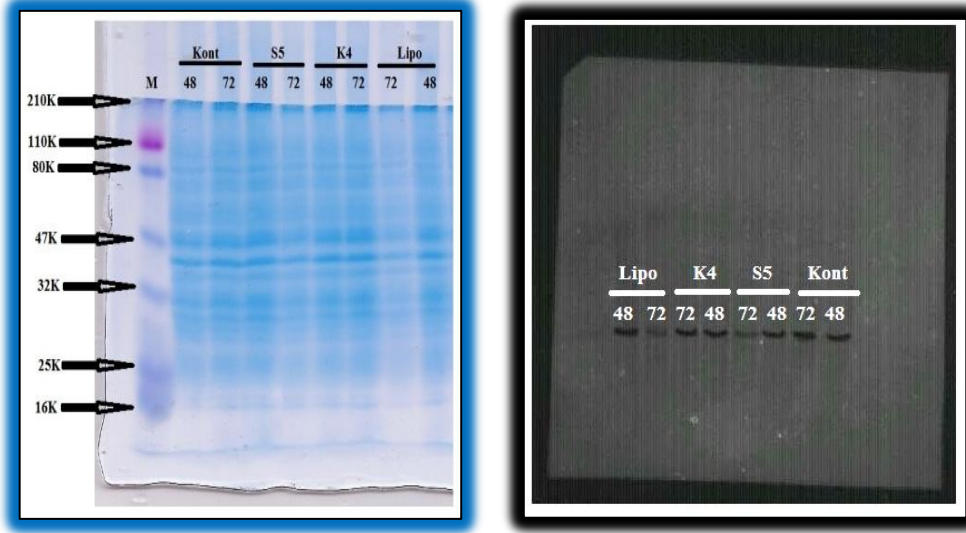
Şekil 107. A549 hücrelerinden 24 ve 48 saat sonunda elde edilen proteinlerin SDS jel ve *Western Blot* sonucu PVDF membrandaki görüntüsü



Şekil 108. A549 hücrelerinden 48 ve 72 saat sonunda elde edilen proteinlerin SDS jel ve *Western Blot* sonucu PVDF membrandaki görüntüsü



Şekil 109. MCF-7 hücrelerinden 24 ve 48 saat sonunda elde edilen proteinlerin SDS jel ve Western Blot sonucu PVDF membrandaki görüntüsü



Şekil 110. MCF-7 hücrelerinden 48 ve 72 saat sonunda elde edilen proteinlerin SDS jel ve Western Blot sonucu PVDF membrandaki görüntüsü

Lipofectamin® 2000 gibi birçok ticari katyonik lipid *in vitro* yüksek transfeksiyon etkinliğine sahiptir. Bununla birlikte yüksek toksisite ve serum içindeki kararlılık sorunu *in vivo* kullanımı sınırlandırmaktadır (Sato ve ark., 2001). Bu çalışmada hazırlanan formülasyonların sitotoksitesinin düşük olması avantajı olarak görülmüştür. Lipofectamin® 2000 ile yapılan sitotoksite çalışmalarında da bu lipozomal formülasyonların sitotoksitesilerinin yüksek olduğu bizim analizlerimizde de saptanmıştır.

Transfeksiyon açısından bakıldığında S5 transfeksiyonda K4'e göre özellikle 72. Saate bakıldığında daha başarılı ve Lipofectamin® 2000'e yakın etkinlik göstermiştir. Ancak transfeksiyon etkinliğinin Lipofectamin® 2000'in önüne geçebilmesi için formülasyonların daha da geliştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada yer alan bulguların kitosan ve katı lipit taşıyıcı sistemlerin transfeksiyonu ve etkinliğin gösterilmesi açısından literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında siRNA yüklü kitosan ve katyonik KLN taşıyıcı sistemleri hazırlanmış ve enkapsülasyon/adsorbsiyon, sitotoksisite ve transfeksiyon etkinlikleri değerlendirilmiştir.

İki farklı katı lipid kullanılarak yüksek hızda karıştırma ve basit emülsiyon ile hazırlanan farklı oranlardaki formülasyonlarda ortalama parçacık boyutunun **Precirol® ATO5** için 100 nm, **Gelucire® 50/13** için 52 nm olduğu ve hazırlanan KLN'lerin yüzey yükünün negatiflik gösterdiği (**Precirol® ATO5** için -16 mV, **Gelucire® 50/13** için -20 mV) saptanmıştır. Formülasyonlara katyonik özellik kazandırmak için eklenen oktadesilamin gerekli pozitif yükü sağlamış (**Precirol® ATO5** için $\sim +13$, **Gelucire® 50/13** için $\sim +17$) ancak artan miktarla birlikte parçacık boyutunu (**Precirol® ATO5** için $\sim 101-556$ nm, **Gelucire® 50/13** için $55-388$ nm) ve sitotoksisiteyi arttırdığı gözlenmiştir. Formülasyon için gerekli miktar belirlendikten sonra yapılan transfeksiyon işlemlerinde **Gelucire® 50/13** için etkin transfeksiyon gözlenirken, **Precirol® ATO5**'in yüksek sitotoksisitesi bu çalışmayı engellemiştir.

KLN hazırlamak amacıyla kullanılan diğer yöntemde siRNA S5 formülasyonu içerisine sonikasyon yöntemi ile enkapsüle edilmiştir. Bu yöntemde nanometre düzeyinde parçacık boyutu (~ 200 nm) ve diğer hazırlama yöntemine göre daha yüksek zeta potansiyel değeri ($+26$ mV) elde edilmiştir. Formülasyon sitotoksisite açısından değerlendirildiğinde transfeksiyon için uygun olduğu saptanmıştır.

Farklı molekül ağırlığına sahip ve suda çözünen kitosan ile hazırlanan formülasyonlarda nanometre düzeyinde parçacık büyüklüğü ($\sim 70-207$ nm) ve pozitif yüzey yükü ($\sim 7-42$ mV) elde edilmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında ise hücre canlılığının yüksek olması ve siRNA'yı yüksek oranda tutabilme özelliği nedeniyle **K4**'ün potansiyel taşıyıcı sistem olduğu düşünülmüştür.

Antiapoptotik protein, hücre döngü düzenleyicisi, transkripsiyon faktörü, sinyal transdüksiyon proteini ve kanser hücrelerinin malign biyolojik davranışlarıyla ilişkili faktörleri içeren genler kanser hastalarının tedavilerinde çok önemli yere sahiptir. Kansere karşı nükleer tıbbın gelişmesi için uygun gen hedeflerinin seçilmesi önemlidir. Gen taşıyıcı sistemlere bağlanmadaki yüksek spesifiklik ve etkinlik nedeniyle RNAi kanser tedavilerinde önemli bir tedavi stratejisi olarak görülmektedir.

Yapılan literatür araştırmasında KLN'ler ile siRNA çalışmalarının yok denecek kadar az olduğu belirlenmiştir. KLN'lere genetik materyal yüklenebileceği laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarla belirlenmiş olduğundan 'Antisens Teknolojisi' için kullanılabilir özellikte olabileceği düşünülerek siRNA ile çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada hazırlanan kitosan partikülünün ve katyonik KLN'lerin siRNA'yı taşıyabilecek özellikte olduğu saptanmıştır. Yapılan transfeksiyon çalışmasında sonikasyon işlemi uygulanan ve siRNA'nın enkapsüle edildiği formülasyonunun etkinliği (S5) A549 akciğer kanser ve MCF-7 meme kanser hücrelerinden elde edilen protein miktarlarının Western blot analizinde Bcl-2'ye ait antikörlerle muamelesi ile araştırılmıştır. Analiz sonucu membran üzerinde Bcl-2'ye ait bantlardaki zayıf ışıma ile transfeksiyonun gerçekleştiği ve kullanılan Bcl-2 siRNA'sının hücre içerisindeki Bcl-2 mRNA'sını susturarak yine hücre içerisindeki Bcl-2 proteininin azalmasına neden olduğu sonucuna

varılmıştır. Transfeksiyon çalışması yapılan kitosan formülasyonlarında (K4) bu etkinlik tam olarak belirlenememiştir. Ancak hazırladığımız formülasyonların kullanılan miktarlarda hücreler üzerindeki düşük sitotoksitesi çalışma süresince transfeksiyonun kontrolü olarak kullanılan Lipofectamin®2000'e göre bir avantaj olarak görülmüştür. Bundan sonraki çalışmalarda bu taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon etkinliğinin geliştirilerek *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi düşünülmektedir. Ayrıca geliştirilen formülasyonlarda kararlılık süresinin uzatılabilmesi için liyofilizasyon ve püskürterek kurutma yöntemlerinin kullanımı da planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aalbers, C.J., Tak, P.P. and Vervoordeldonk, M.J., Advancements in adeno-associated viral gene therapy approaches: exploring a new horizon, *F1000 Med Reports*, 3(17), (2011).
- Aboul-Fadl, T., Antisense oligonucleotides: The state of the art, *Curr. Med. Chem.*, 12(19), 763-771 (2005).
- Aigner, A., Nonviral in vivo delivery of therapeutic small interfering RNAs, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 9(4), 345–352 (2007)
- Almeida, A.J., Souto, E., Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 59(6), 478–490 (2007).
- Altunkaynak, B.Z., Özbek, E., Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir?, *derleme, Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6 (2), 93 -104 (2008).
- Alves, N.M., Mano, J.F., Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications, *Int. J. Biol. Macromol.*, 43(5), 40-41 (2008).
- Andersen, M., Lichawskaa, A., Arpanaei, A., Jensen, S.M.R., Kaurc, H., Oupicky, D., Besenbacher, F., Kingshott, P., Kjems, J., Howard, K.A., Surface functionalisation of PLGA nanoparticles for gene silencing, *Biomaterials*, 31(21), 5671–5677 (2010).
- Arora, M.P., Kanta, C.(Ed), *Biotechnology*, Global Media, Mumbai, 292-309, (2007).
- Asasutjarit, R., Lorenzen, S.I., Sirivichayakul, S., Ruxrungtham, K., Ruktanonchai, U. and Ritthidej, G.C., Effect of solid lipid nanoparticles formulation compositions on their size, zeta potential and potential for in vitro pHIS-HIV-Hugag transfection, *Pharm. Res.*, 24(6), 1098-1107 (2007).
- Ashihara, E., Kawata, E., Maekawa, T., Future prospect of RNA interference for cancer source therapies, *Curr. Drug Targets*, 11(3), 345-360 (2010).
- Ashkenaz, A., Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer, *Cytokine Growth F. R.*, 19(3–4), 325–331 (2008).
- Baker, B.F., Lot, S.S., Con don, T.P., Cheng-Flournoy, S., Lesnik, E.A., Sasmor, H.M. & Bennett, C.F., 2'-O-(2-methoxy) ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, 272(18), 119 94–12000, (1997).
- Baker, J.R., Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy, *ASH Education Book*, 2009(1), 708-719 (2009).
- Balasubramaniam, R.P., Bennett, M.J., Aberle, A.M., Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: the hydrophobic domain, *Gene Ther.*, 3(2), 163–3172 (1996).

Boujrad, H., Gubkina, O., Robert, N., Krantic, S., Susin, S.A., AIF-Mediated programmed necrosis a highly regulated way to die, *Cell Cycle*, 6(21), 2612-2619 (2007).

Bulut, M.O., Akar, E., Dendrimerlerin önemi ve kullanım alanları, *SDU Teknik Bilimler Dergisi*, 2(1), 5-11 (2012).

Büyükköroğlu, G., Farmasötik Biyoteknolojide Gen Tedavisi Amaçlı Plazmit DNA Bağlanabilecek Katyonik Katı Lipit Nano- ve Mikropartiküllerin Hazırlanması ve Tanınması Çalışmaları, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye, (2005).

Candotti, F., Blaese, R.M., Gene therapy of primary immunodeficiencies, Springer, *Semin. Immunopathol.*, 19, 493-508 (1998).

Caplen, N.J., Gene therapy progress and prospects, downregulating gene expression: the impact of RNA interference, *Gene Ther.*, 11(16), 1241–1248 (2004).

Carter, M., Shieh, J., Guide the research techniques in neuroscience, Chapter 10, Standford University, School of Medicine, Standford, Academic Press, (2010).

Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J., Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs, *Cell*, 136(4), 642-655 (2009).

Chen, W., Turro, N.J., Tomalia, D.A., Using ethidium bromide to probe the interactions between DNA and dendrimers, *Langmuir*, 16, 15–19 (2000).

Chen, Y., Lin, M.C., Yao, H., Wang, H., Zhang, A.Q., Yu, J., Hui, C.K., Lau, G.K., He, M.L., Sung, J., Kung, H.F., Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin. *Hepatology*, 46(1), 200-208 (2007).

Chen, Z.Y., Liang, ., Qiu, R.X., Targeted gene delivery in tumor xenografts by the combination of ultrasound-targeted microbubble destruction and polyethylenimine to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis, *J. Experim.Clin. Cancer Res.*, 29(152), 1-9 (2010).

Choi,C., Kim, D.G., Jang, M.J., Kim, T.H., Jang, M.K., Nah, J.W., DNA delivery using low molecular water-soluble chitosan nanocomplex as a biomedical device, *J. Appl. Polym. Sci.*, 102(4), 3545–3551 (2006).

Çelebi, N., Koloitler , Kontrollü Salım Sistemleri, A.Z. Gürsoy (ed), *Kontrollü Salım Derneği Yayını No:1*, İstanbul, 245-255 (2002).

Dallas, A., Vlassov, A.V., RNAi: A novel antisense technology and its therapeutic potential, *Med. Sci. Monit.*, 12(4), 67-74 (2006).

Dal-Maso, A.D., Dellacasagrande, J., Legendre, F., Tiraby, G., Blonski, C., Hoffmann, P., Synthesis and evaluation of new phosphonolipid compounds for gene delivery, *Eur. J. Med. Chem.*, 43(8), 1758-1766 (2008).

Dass, C.R., Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids:factors affecting in vivo transfection, *J. Mol. Med.*, 82(9), 579–591 (2004).

David, S., Pitard, B., Benoît, J.B., Passirani, C., Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery, *Pharmacol. Res.*, 62(2), 100–114 (2010).

- Davis, M.A., Apoptosis methods in pharmacology and toxicology: Approaches to measurement and quantitation, Section 1:Introduction, Humana Press, 1-2 (2002).
- De Martimprey, H., Vauthier, C., Malvy, C., Couvreur, P., Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA., Eur. J. Pharm. Biopharm., 71(3), 490-504 (2009).
- Demirel, M., Yazan, Y., Müller, R.H., Kılıç, F. and Bozan, B., Formulation and *in vitro-in vivo* evaluation of priedil solid lipid micro-and nanoparticles, J. Microencapsul., 18(3), 359-371 (2001).
- Demirel, M. and Yazan, Y., Katı lipit nanopartiküller (SLN) FABAD, J. Pharm. Sci., 25, 167-179 (2000).
- Dias, N., Stein, C.A.; Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms, Mol. Cancer Ther., 1, 347–55 (2002).
- Domb, A.J., Tabata, Y., Kumar M.N.V.R. and Farber, S., Nanoparticles for pharmaceutical applications, Chapter 5: Lipid nanoparticles (SLN and NLC) for drug delivery, American Scientific Publishers, 103-117 (2007).
- Duan, Y., Guan, X., Ge, J., Quan, D., Zhuo, Y., Ye,H., Shao, T., Cationic nanocopolymers mediated IKK β targeting siRNA inhibit the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in vitro, Molecular Vision,14, 2616-2628(2008).
- Dufès, C., Uchegbu, I.F., Schätzlein, A.G., Dendrimers in gene delivery, Adv. Drug Deliver. Rev., 57(15), 2177–2202 (2005).
- Ekambaram, P., Sathali, A.H. and Priyanka, K., Solid lipid nanoparticles: A review, Sci. Revs. Chem. Commun., 2(1), 80-102 (2012).
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl,T., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature, 411, 494-498 (2001).
- Even-Chen, S., Cohen, R.,Barenholz, Y., Factors affecting DNA binding and stability of association to cationic liposomes, Chem. Phys. Lipids, 165(4), 414–423 (2012).
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84(21), 7413–7417 (1987).
- Feng, J., Zhao, L. and Yu, Q., Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages, Biochem. Bioph. Res. Co., 317(2), 414–420 (2004).
- Feng-Fu, G., Lin, X.E., Han, Q.W., Fan, Y.R., Xu, Y.F., Guo, D., Xu, G.X., Hou Y., RNA interference remarkably suppresses Bcl-2 gene expression in cancer cells *in vitro* and *in vivo*, Cancer Biol. Ther., 4(8), 822-829 (2005).
- Floch, V., Loisel, S., Guenin, E., Cation substitution in cationic phosphonolipids: a new concept to improve transfection activity and decrease cellular toxicity, J. Med. Chem., 43(24), 4617–4628 (2000).
- Fulda,S., Tumor resistance to apoptosis, Int. J. Cancer: 124(3), 511–515 (2009).

Fulton, A., Peters, S.T., Perkins, G.A., Jarosinski, K. W., Damiani, A., Brosnahan, M., E.L. Buckles, N. Osterrieder, G.R. Van de Walle, Effective treatment of respiratory alphaherpesvirus infection using RNA interference, PloS ONE, 4(1), 1-10 (2009).

Gambhire, M.S., Bhalekar, M.R., Gambhire, V.M., Statistical optimization of dithranol-loaded solid lipid nanoparticles using factorial design, Braz. J. Pharm. Sci. 47(3), 503-512 (2011).

Gary, D., Puri, N., Won, Y.Y., Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery, J. Control. Release, 121(1-2), 64–73 (2007).

Gasco, M.R., Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, United states patent, USS , Patent no:188837 (1993).

Ge, Q., Filip, L., Bai, A.L., Nguyen, T., Eisen, H.N., Chen, J., Inhibition of influenza virüs production in virüs-infected mice by RNA interference , Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 8676–8681 (2004).

Gewirtz A.M., On Future’s Doorstep: RNA Interference and the pharmacopeia of tomorrow, J. Clin. Invest., 117(12), 3612- 3614 (2007).

Ghaffari, S., Varshosaz , J., Haririan, I. , Khoshayand, M.R., Azarmi, S. & Gazori, T., Ciprofloxacin loaded alginate/chitosan and solid lipid nanoparticles, preparation, and characterization, J. Disper. Sci. and Technol., 33, 685–689 (2012).

Ghosh, Y.K., Visweswariah, S.S., Bhattacharya, S., Nature of linkage between the cationic headgroup and cholesteryl skeleton controls gene transfection efficiency, FEBS Let , 473(3), 341–344 (2000).

Ghosh, S.S., Gopinath, P. and Ramesh, A., Adenoviral vectors a promising tool for gene therapy, Appl. Biochem. Biotech., 133(1), 9-29 (2006).

Gong, F., Sun, L., Wang, Z., Shi, J., Li, W., Wang, S., Han, X. and Sun, Y., The BCL2 gene is regulated by a special AT-rich sequence binding protein 1-mediated long range chromosomal interaction between the promoter and the distal element located within the 3’-UTR, Nucleic Acids Res., 39(11), 4640–4652 (2011).

Gorbatyuk, M., Justilien, V., Liu, J., Hauswirth, W.W and Lewin, A.S., Suppression of mouse rhodopsin expression *in vivo* by AAV mediated siRNA delivery, Vision Res., 47(9), 1202–1208 (2007).

Grayson, A.C., Doody, A.M. and Putnam, D., Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery *in vitro*, Pharm. Res., 23, 1868–1876 (2006)

Grimm, D. and Kay, M.A., RNAi and gene therapy: A mutual attraction, ASH Education Book, 2007(1), 473-481 (2007).

Groves, M.J., Pharmaceutical biotechnology, second edition, Taylor&Francis Group, A CRC Press book, (2006).

Gutbier, B., Kube, S.M., Reppe, K., Santel, A., Lange, C., Kaufmann, J., Suttorp, N., Witzenrath, M., RNAi-mediated suppression of constitutive pulmonary gene expression by small interfering RNA in mice, *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 23(4), 334–344 (2010).

Gürsoy, A.Z., *Lipozomlar, Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy(Ed), *Kontrollü Salım Derneği Yayını No:1*, İstanbul, 1103-1116 (2002).

Gvili, K., Benny, O., Danino, D., Machluf, M., Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) Nanoparticles for DNA delivery:waiving preparation complexity and increasing efficiency, *Biopolymers*, 85(5-6), 379-391 (2006).

Hadjichristidis, N., Hirao, A., Tezuka, Y., Du Prez, F., *Complex macromolecular architectures: synthesis, characterization, and self –assembly*, Chapter 17: functional polymeric nanostructures prepared by self-assembly and beyond, John wiley &sons, Asia, Pte Ltd (2011).

Hao, J., Gu, Q., Liu, B., Li, J., Chen, X., Ji, Y., Zhu, Z. and Lin, Y., Inhibition of the proliferation of human gastric cancer cells SGC-7901 *in vitro* and *in vivo* using Bcl-2 siRNA, *Chinese Med. J-Peking*,120(23), 2105-2111 (2007).

Herbst, R.S. and Frankel, S.R., Oblimersen sodium (Genasense bcl-2 Antisense Oligonucleotide) a rational therapeutic to enhance apoptosis in therapy of lung cancer, *Clin. Cancer Res.*, 10(12pt2), 4245-4248 (2004).

Holmlund, J.T., Affinitak and other antisense,oligonucleotides in clinical development, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1002, 244-251 (2003).

Howard, K.A., Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61(9), 710-720 (2009).

Huang, R., Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K., Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitoooligosaccharides (COS), *Life Sci.*, 78(20), 2399–2408 (2006).

Hunter, A.C., Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 58(14), 1523–1531 (2006).

Hussain, M., Shchepinov, M., Sohail, M., Benter, I.F., Hollins, A.J., Southern, E.M., Akhtar, S., A novel anionic dendrimer for improved cellular delivery of antisense oligonucleotides, *J. Control. Release*, 99(1), 139–155 (2004).

İncesu, Z., Sivas, H., Ergene, E., Akalın, G., Kanserde apoptoza duyarlılık meanizmasında Ras-sinyal yolu integrin etkileşimi, *Anadolu Üniversitesi, Proje no:030326*, Eskişehir, 1-4 (2007).

Iorns, E., Lord, C.J., Turner, N. & Ashworth, A., Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6, 556-568 (2007).

Itakaa, K., Kataoka, K., Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 71(3), 475–483 (2009).

- Jacobson, G.B., Gonzalez, E., Spitler, R., Shinde, R., Leake, D., Kaspar, R.L., Contag, H.C., Zare, R.N., Biodegradable nanoparticles with sustained release of functional siRNA in skin, *J. Pharm. Sci.*, 99(10), 4261–4266 (2010).
- Jensen, D.M., Cun, D., Maltesen, M.J., Frokjaer, S., Nielsen, H.M., Foged, C., Spray drying of siRNA-containing PLGA nanoparticles intended for inhalation, *J. Control. Release*, 142(1), 138-145 (2010).
- Jiang, H.L., Kim, Y.K., Arote, R., Nah, J.W., Cho, M.H., Choi, Y.J., Akaike, T., Cho, C.S., Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier, *J. Control. Release*, 117(2), 273–280 (2007).
- Jiang, H.L., Xub, C.X., Kim, Y.K., Arote, R., Jere, D., Lim, H.T., Chob, M.H., Cho, C.S., The suppression of lung tumorigenesis by aerosol-delivered folate–chitosan-graft-polyethylenimine/Akt1 shRNA complexes through the Akt signaling pathway, *Biomaterials*, 30(29), 5844–5852 (2009).
- Jogdand, S.N., Medical biotechnology, *Global Media Mumbai*, 281-283 (2008).
- Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H. and Verma, I.M., Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors, *Nat. Genet.*, 17(3), 314 - 317 (1997).
- Kang, H., DeLong, R., Fisher, M.H. and Juliano, R.L., Tat-conjugated, PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides, *Pharm. Res.*, 22, 2099–2106 (2005).
- Kasibhatla, S. and Tseng, B., Why target apoptosis in cancer treatment?, *Mol. Cancer Ther.*, 2, 573-580 (2003).
- Kaş, H.S., İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler, A.Z. Gürsoy (ed), *Kontrollü Salım Sistemleri*, Kontrollü salım derneği yayını No:1, İstanbul, 65-88 (2002).
- Kataoka, K., Itaka, K., Nishiyama, N., Yamasaki, Y., Oishi, M. and Nagasaki, Y., Smart polymeric micelles as nanocarriers for oligonucleotides and siRNA delivery, *Nucleic Acids Symposium Series*, 49(1), 17-18 (2005).
- Katas, H., Alpar, H.O., Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery, *J. Control. Release*, 115(2), 216-225 (2006).
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R., Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics, *Br. J. Cancer.*, 26(4), 239–257 (1972).
- Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H., Harashima, H., Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery, *Pharmacol. Rev.*, 58(1), 32–45 (2006).
- Khosravi-Far, R. and White, E., Programmed cell death in cancer progression and therapy, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 615 (2007).
- Kim, D.G., Jeong, Y., Choi, C., Roh, S., Kang, S., Jang, M. and Nah, J., Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 319, 130–138 (2006).

- Kim, T.H., Jiang, H.L., Jere, D., Park, I.K., Cho, M.H., Nah, J.W., Choi, Y.J., Akaike, T., Cho, C.S., Chemical modification of chitosan as a gene carrier *in vitro* and *in vivo*, *Prog. Polym. Sci.*, 32(7), 726–753 (2007).
- Kim, H.R., Kim, I.K., Bae, K.H., Lee, S.H. , Lee, Y. , Park, T.G., Cationic solid lipid nanoparticles reconstituted from low density lipoprotein components for delivery of siRNA, *Mol. Pharm.*, 5 (4), 622–631 (2008).
- Kim, S.S., Garg, H., Joshi, A. and Manjunath,N., Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs *in vivo*, *Trends Mol. Med.*, 15(11), 491-500 (2009).
- Kim, W.J. and Kim, S.W., Efficient sirna delivery with non-viral polymeric vehicles, *Pharm. Res.*, 26(3), 657-666 (2009).
- Kim, T.K. and Eberwine, J.H., Mammalian cell transfection: the present and the future, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397(8), 3173–3178 (2010).
- Kirkham, M., Parton, R.G., Clathrin-independent endocytosis: new insights into and non-caveolar lipid raft carriers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1746(3), 349–363 (2005).
- Kumar, M.N.V.R., A review of chitin and chitosan applications, *React. Func. Polym.*, 46(1), 1–27 (2000).
- Kurreck, J., Antisense technologies improvement through novel chemical modifications, *Eur. J. Biochem.*, 270, 1628–1644 (2003).
- Lai, W.F., Chia-Mi Lin, M., Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives, *J. Control. Release*, 134(3), 158-168 (2009).
- Lam, J.K., Liang, W., Chan, H.K., Pulmonary delivery of therapeutic siRNA, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64(1), 1-15 (2012).
- Lee, M. and Kim, S.W., Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery, *Pharm. Res.*, 22(1), 1-10 (2005).
- Lee, S.H., Mok, H., Lee, Y., Park, T.G., Self-assembled siRNA–PLGA conjugate micelles for gene silencing, *J. Control. Release*, 152(1), 152–158 (2011).
- Legrand, P., Lesieur, S., Bochot, A., Gref, R., Raatjes, W., Barratt, G., Vauthier, C., Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation, *Int. J. Pharm.*, 344(1–2), 33–43 (2007).
- Leung R.K., Whittaker P.A., RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics, *Pharmacol. Ther.*, 107(2), 222-239 (2005).
- Li, C.X., Parker, A., Menocal, E., Xiang, S., Borodyansky, L., Fruehauf, J.H., Delivery of RNA interference, *Cell Cycle*, 5(18), 2103-2109 (2006).
- Lieskovan, S.H., Heidel, J.D., Bartlett, D.W., Davis, M.E. and Triche1, T.J., Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's Sarcoma, *Cancer Res.*, 65, 8984-8992 (2005).
- Lima, R.T., Martins, L.M., Guimarães, J.E., Sambade, C. and Vasconcelos, M.H., Specific downregulation of bcl-2 and xIAP by RNAi enhances the effects of

chemotherapeutic agents in MCF-7 human breast cancer cells, *Cancer Gene Ther.* 11(5), 309–316 (2004).

Ling, B., Zhou, Y., Feng, D., Shen, G., Gao, T., Shi, Y., Wei, H., Tian, Z., Down-regulation of EDAG expression by retrovirus-mediated small interfering RNA inhibits the growth and IL-8 production of leukemia cells, *Oncol. Rep.*, 18(3), 659-64 (2007).

Liu, J., Antonio, M., Sanchez, V., Hannon, G.J. and Parker, P., MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies, *Nat. Cell Biol.*, 7(7), 719–723 (2005).

Liu, X., Howard, K.A., Dong, M., Andersen, M.Ø., Rahbek, U.L., Johnsen, M.G., Hansen, O.C., Besenbacher, F., Kjems, J., The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing, *Biomaterials*, 28(6), 1280-1288 (2007).

Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., Göpferich, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 60(2), 247–266 (2005).

Ma, H., Chen, G., Gene transfer technique, *Nat. Sci.*, 3(1), 25-31 (2005).

Maitani, Y., Igarashi, S., Sato, M., Hattori, Y., Cationic liposome (DC-Chol/DOPE = 1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression, *Int. J. Pharm.*, 342(1-2), 33–39 (2007).

Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., Meijer, E.W., Paulus, W., Duncan, R., Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility *in vitro* and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers *in vivo*, *J. Control Release*, 65(1-2), 133-148 (2000).

Mao, S., Sun, W., Kissel, T., Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62(1), 12-27 (2010).

Martin, S.E. and Caplen, N.J., Applications of RNA interference in mammalian systems, *Annu. Rev. Genom. Hum. G.*, 8, 81-108 (2007).

Masiero, M., Nardo, G., Indraccolo, S., Favaro, E., RNA interference: implications for cancer treatment., *Mol. Aspects Med.*, 28(1), 143-66 (2007).

McManus, M.T. and Sharp, P.A., Gene silencing in mammals by small interfering RNAs, *Nat. Rev. Genet.*, 3, 737-747 (2002).

Merten, O.W., Al-Rubeai, M., Viral vectors for gene therapy, methods and protocols, Chapter 1: Introduction to viral vectors, Springer Science+Business Media, LLC, 1-25 (2011).

Mehnert, W., Mäder, K., Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 47(2–3), 165–196 (2001).

Merdan, T., Kunath, K., Fischer, D., Kopecek, J., Kissel, T., Intracellular processing of poly(ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments, *Pharm. Res.*, 19(2), 140-146 (2002).

Mitrović, T., Gene transfer systems, Facta Universitatis, Series: Medicine and Biology, 10(3), 101 – 105 (2003).

Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., Benoit, J.P., Progress in developing cationic vectors for non-viral, systemic gene therapy against cancer Biomaterials, 29(24-25), 3477–3496 (2008).

Mozafari, M.R., Nanocarrier Technologies, Frontiers of Nanotherapy; Chapter 3: Solid lipid nanoparticles, Springer, 41-43 (2006).

Mukherjee, S., Ray, S., Thakur, R.S., Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system, Indian J. Pharm. Sci., 71(4), 349-358 (2009).

Müller, R.H., Mehnert, W., Lucks, J.S., Solid lipid nanoparticles (SLN) – An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, Eur. J. Pharm. Biopharm, 41(1), 62–9 (1995).

Müller, R.H., Mader, K., Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art, Eur. J. Pharm. Biopharm., 50(1), 161-177 (2000).

Nagamatsu, K., Tsuchiya, F., Oguma, K., Maruyama, H., Kano, R., Hasegawa, A., The effect of small interfering RNA (siRNA) against the Bcl-2 gene on apoptosis and chemosensitivity in a canine mammary gland tumor cell line., Res. Vet. Sci., 84(1), 49-55 (2008).

Nidhin, M., Indumathy, R., Sreeram, K.J. and Nair, B.U., Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates, Bull. Mater. Sci., 31(1), 93–96 (2008).

NIH Report Assessment of Adenoviral Vector Safety and Toxicity: Report of the National Institutes of Health Recombinant DNA Advisory Committee Human Gene Ther., 13, 3–13 (2002).

Niidome, T. and Huang, „Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors, Gene Ther., 9(24), 1647-1652 (2002).

Numanoğlu, U., Tarımcı, N., Katı lipid nanopartiküllerin (SLNTM) özellikleri, farmasötik ve kozmetik alandaki uygulamaları, Ankara Ecz. Fak., 35(3), 211 - 235 (2006).

Oh, Y.K., Park, T.G., siRNA delivery systems for cancer treatment, Adv. Drug Deliver. Rev., 61(10), 850–862 (2009).

Olbrich, C., Bakowsky, U., Lehr, C.M., Müller, R.H., Kneue, C., Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA, J. Control. Release, 77(3), 345–355 (2001).

Ossovskaya, V.S., Dolganov, G., Basbaum, A.I., Loss of function genetic screens reveal MTGR1 as an intracellular repressor of beta1 integrin-dependent neurite outgrowth., J. Neurosci. Meth., 15;177(2), 322-33 (2009).

Öner, F., Süspansiyonlar, Farmasötik Teknoloji, Temel Kavramlar, A.Z. Gürsoy(Ed), Kontrollü Salım Derneği Yayını No:2, İstanbul, 26-269 (2004).

Özvaran, M.K., Malign mezotelyomada gen tedavisi ,Toraks Dergisi, 5(2), 110-115 (2004).

Park, P.J., Je, J.Y. and Kim, S.K., Free radical scavenging activity of chitoooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry, J. Agric. Food Chem., 51 (16), 4624–4627 (2003).

Park, B.K. and Kim M.M., Applications of chitin and its derivatives in biological medicine, Int. J. Mol. Sci., 11(12), 5152-5164 (2010).

Patil, Y. and Panyam, J., Polymeric Nanoparticles for sirna delivery and gene silencing, Int. J. Pharm., 367(1-2), 195–203 (2009).

Pedersen, C.D., Fang , J.J. and Pedersen, A.E., A comparative study of transfection methods for rna interference in bone marrow-derived murine dendritic cells, Scand. J. Immunology, 70(5), 447-456 (2009).

Pedroso de Lima, M.C., Simões, S., Pires, P., Faneca, H., Düzgüneş, N., Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications, Adv. Drug Deliver. Rev., 47, 277–294 (2001).

Rao, N. M., Cationic lipid-mediated nucleic acid delivery: beyond being cationic, Chem. Phys. Lipids, 163(3), 245–252 (2010).

Read, M.L., Singh, S., Ahmed, Z., Stevenson, M., Briggs, S.S., Oupicky, D., Barrett, L.B., Spice, R., Kendall, M., Berry, M., Preece, J.A., Logan, A. and Seymour, L.W., A versatile reducible polycation-based system for efficient delivery of a broad range of nucleic acids, Nucleic Acids Res., 33(9), 1-16 (2005).

Reischl, D., Zimmer, A., Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems, Nanomed. Nanotech., 5(1), 8-20 (2009).

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D., Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis, Biochem. J., 377(1), 159–69 (2004).

Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., Khvorova, A., Rational siRNA design for RNA interference, Nature Biotech., 22(3), 326-30, (2004).

Rosas-Taraco, A.G., Higgins, D.M., Sanchez-Campillo, J., Lee, E.J., Orme, I.M., Gonzalez-Juarrero, M., Intrapulmonary delivery of XCL1-targeting small interfering RNA in mice chronically infected with mycobacterium tuberculosis, Am. J. Resp. Cell Mol., 41(2), 136–145 (2009).

Rosca, I.D., Watari,F., Uo, M., Microparticleformation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation, J. Control. Release, 99(2), 271–280 (2004).

Ross, J.S., Carlson, J.A., Brock, G., miRNA: The new gene silencer, Am. J Clin. Pathol., 128(5), 830-836 (2007).

Rudolph, C., Schillinger, U., Ortiz, A., Tabatt, K., Plank, C., Müller, R.H. and Rosenecker, J., Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide *in vitro* and *in vivo*, Pharm. Res., 21(9), 1662-1669 (2004).

- Sato, T., Ishii, T., and Okahata, Y., 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 (2001).
- Sahoo, S.K., Parveen, S., Panda, J.J., The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomed. Nanotech.*, 3(1), 20- 31 (2007).
- Sioud, M., Sørensen, D.R., Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice., *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 312(4), 1220-1225 (2003).
- Sonoke, S., Ueda, T., Fujiwara, K., Sato, Y., Takagaki, K., Hirabayashi, K., Ohgi, T., Yano, J., Tumor regression in mice by delivery of Bcl-2 small interfering RNA with pegylated cationic liposomes, *Cancer Res.*, 68(21), 8843-8851 (2008).
- Soutoa, E.B., Wissinga, S.A., Barbosa, C.M., Müller, R.H., Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery, *Int. J. Pharm.*, 278(1), 71-77 (2004).
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavine, G., Pandey, R.K., Racie, T., Rajeev, K.G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S., Bumcrot, D., Koteliensky, V., Limmer, S., Manoharan, M. and Vornlocher, H.P., Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs, *Nature*, 432, 173-178 (2004).
- Stefani G., Slack F.J., Small non-coding RNAs in animal development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(3), 219-230 (2008).
- Stephens, A.C., Clinical applications of gene therapy, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 5(5), 454-455 (2003).
- Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Canete, M., Horobin, R.W., Villanueva, A., MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochem.* [Epub ahead of print] (2012).
- Strachan, T. and Read, A.P., Chapter 22: . Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches, *Human Molecular Genetics*, 2nd edition, New York: Wiley-Liss (1999).
- Takabatake, Y., Isaka, Y., Mizui, M., Kawachi, H., Takahara, S. and Imai, E., Chemically modified siRNA prolonged RNA interference in renal disease, *BBRC*, 363(2), 432-437 (2007).
- Tang, G., siRNA and miRNA: an insight into RISCs, *Trends Biochem. Sci.*, 30(2), 106-114 (2005).
- Templeton, N.S., Gene and cell therapy: therapeutic mechanisms and strategies, third edition, Taylor&Francis Group, A CRC Press book (2009).
- Tseng, Y.C., Mozumdar, S., Huang, L., Lipid-based systemic delivery of siRNA, *Adv., Drug Deliver. Rev.*, 61(9), 721–731 (2009).
- Tsujimoto, Y., Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria, *J. Cell. Physiol.*, 195(2), 158–167 (2003).

Üner, M. and Yener, G., Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives, *Int. J. Nanomedicine*, 2(3), 289–300 (2007).

Uchida, H., Tanaka, T., Sasaki, K., Kato, K., Dehari, H., Ito, Y., Kobune, M., Miyagishi, M., Taira, K., Tahara, H., Hamada, H., Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo, *Mol. Ther.*, 10(1), 162–171 (2004).

Uchida, M., Wei Li, X., Mertens, P., Alpar, H.O., Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun, *Biochim. Biophys. Acta*, 1790(8), 754–764 (2009).

Uddin, S.N., Cationic lipids used in non-viral gene delivery systems, *BMB Rev.*, 2 (3), 58–67 (2007).

Upadhyay, S.U., Patel, A.V., Patel, K.J., Upadhyay, U.M., Saluja, A.K., Fabrication of solid lipid nanoparticles containing tamoxifen citrate and impact of process parameters on formulation, *Int. J. Bio. Pharm. Res.*, 3(3), 422–430 (2012)

Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubyko, F., Aigner, A., RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo, *Gene Ther.*, 12(5), 461–466 (2005).

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J., Cloos, J., Cell sensitivity assays: the MTT assay, *Methods Mol. Biol.*, 731(1), 237–245 (2011).

Venkatesan, J., Pangestuti, R., Qian, Z.J., Ryu, B. and Kim, S.K., Biocompatibility and alkaline phosphatase activity of phosphorylated chitooligosaccharides on the osteosarcoma MG63 cell line, *Funct. Biomater.*, 1(1), 3–13 (2010).

Vergaro, V., Scarlino, F., Bellomo, C., Rinaldi, R., Vergara, D., Maffia, M., Baldassarre, F., Giannelli, G., Zhang, X., Lvov, Y.M., Leporatti, S., Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 63(9), 847–864 (2011).

Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H., Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 56, 1257–1272 (2004).

Weng, D.E., Masci, P.A., Radka, S.F., Jackson, T.E., Weiss, P.A., Ganapathi R., Elson, P.J., Capra, W.B., Parker, V.P., Lockridge, J.A., Cowens, J.W., Usman, N., Borden, E.C., A phase I clinical trial of a ribozyme-based angiogenesis inhibitor targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 for patients with refractory solid tumors, *Mol. Cancer Ther.*, 4(6), 948–955 (2005).

Wenk, M. R., Fernandis, Z. A., *Manual For Biochemistry Protocols*, World Scientific, River Edge, NJ, USA 21–27 (2007)

Watts, J.K., Deleavey, G.F., Damha, M.J., Chemically modified siRNA: tools and applications, *Drug Discov. Today*, 13(19–20), 842–855 (2008).

Wang, T., Upponi, J.R., Torchilin, V.P., Design of multifunctional non-viral gene vectors to overcome physiological barriers: Dilemmas and strategies, *Int. J. Pharm.*, 427(1), 3–20 (2012).

Wilson, J.F., Gene Therapy Yields to RNA Interference, *Ann. Intern. Med.*, 143(2), 161-164 (2005).

Winkler, J., Nanomedicines based on recombinant fusion proteins for targeting therapeutic siRNA oligonucleotides, *Ther. Deliv.*, 2(7), 891–905 (2011).

Wonga, S.Y., Peletb, J.M., Putnam, D., Polymersystems for genedelivery—Past, present, and future *Prog. Poym. Sci.*, 32(8-9), 799-837 (2007).

Yang, J.P., Huang, L., Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA, *Gene Ther.*, 4, 9 950–960 (1997).

Yano, J., Hirabayashi, K., Nakagawa, S.I., Yamaguchi, T., Nogawa, M., Kashimori, I., Naito, H., Kitagawa, H., Ishiyama, K., Ohgi, T., and Irimura, T., Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer, *Clin. Cancer Res.*, 10,7721-7726 (2004).

Yoo, H.S., Kwon, S.M., Kim, Y.J., Chung, H., Kwon, I.C., Kim, J., Jeong, S.Y., Cationic lipid emulsions containing heavy oils for the transfection of adherent cells, *J. Control. Release*, 98(1), 179–188 (2004).

Yuan, H., Miao, J., Du, Y.Z., You, J., Hu, F.Q., Zeng, S., Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells, *Int. J. Pharm.*, 348(1–2), 137–145 (2008).

Zhang, S., Zhao, B., Jiang, H., Wang, B., Ma, B., Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA, *J. Control. Release*, 123(1), 1-10 (2007).

Zhao, Q.Q., Chen J.L., Lva, T.F., He, C.X., Tang, G.P., Liang, W.Q., Tabata, Y.K. and Gao, J.Q., N/P ratio significantly influences the transfection efficiency and cytotoxicity of a polyethylenimine/chitosan/DNA complex, *Biol. Pharm. Bull.*, 32(4), 706-710 (2009).

Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D., Li, Z., Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery, *J. of Control. Release*, 100(2), 165–180 (2004).

Zhdanov, R.I., Podobed, O.V., Vlassov, V.V., Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy, *Bioelectrochemistry*, 58(1), 53-64, (2002).

Zhu, L., Xie, S., Dong, Z., Wang, X., Wang, Y., Zhou, W., Effects of poly(lactic-co-glycolic acid) on preparation and characteristics of plasmid DNA-loaded solid lipid nanoparticles, *IET Nanobiotechnol.*, 5(3), 79–85 (2011).

Zintchenko, A., Philipp, A., Dehshahri, A. and Wagner, E., Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity, *Bioconjug. Chem.*, 19(7), 1448–1455 (2008).

Zuhorn, I.S., Kalicharan, R., Hoekstra, D., Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis, *J. Biol. Chem.*, 277(20), 18021–18028 (2002).

http-1

<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture25/Lecture25.html>

http-2

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2009/10/WC500005661.pdf

http-3

<http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1243>

http-4

<http://www.sigmaaldrich.com/materialsscience/nanomaterials/dendrimers/dendrons.html>

http-5

http://www.nature.com/nrm/journal/v9/n1/fig_tab/nrm2308_F2.html

http-6

<http://www.cellsignal.com/products/9803.html>

http-7

<http://biyokure.org/proteinlerin-elektroforetik-saflastirilmesi-6/7419>

http-8

http://www.leinco.com/general_wb

http-9

http://amicogen.en.ec21.com/Enzyme_Hydrolyzed_Chitosan_oligosaccharides--2604726_2606805.html