

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOENZİM<sub>Q10</sub> NEFROPATİSİNDE KOENZİM<sub>Q10</sub> İÇERİKLİ  
NANOTERAPÖTİKLERİN TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI VE *İN VİTRO* MODELDE MİTOKONDRIYAL  
FONKSİYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**Ecz. Hamide Sena ÖZBAY**

**Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2022**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOENZİM<sub>Q</sub><sub>10</sub> NEFROPATİSİNDE KOENZİM<sub>Q</sub><sub>10</sub> İÇERİKLİ  
NANOTERAPÖTİKLERİN TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI VE *İN VİTRO* MODELDE MİTOKONDRIYAL  
FONKSİYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**Ecz. Hamide Sena ÖZBAY**

**Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ**

**ANKARA  
2022**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KOENZİM Q10 NEFROPATİSİNDE KOENZİM Q10 İÇERİKLİ NANOTERAPÖTİKLERİN  
TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI VE İN VİTRO MODELDE MİTOKONDRIYAL  
FONKSİYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI  
Hamide Sena ÖZBAY  
Danışman: Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ

Bu tez çalışması 06.04.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Biyokimya Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Gülberk UÇAR*  
*Hacettepe Üniversitesi*

Üye: *Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ*  
*Gazi Üniversitesi*

Üye: *Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN*  
*Hacettepe Üniversitesi*

Üye: *Doç. Dr. Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKİLİNÇ*  
*Hacettepe Üniversitesi*

Üye: *Doç. Dr. Güliz ARMAĞAN*  
*Ege Üniversitesi*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

*Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN*  
Enstitü Müdürü

13 Nisan 2022

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

..... / ..... / .....

Hamide Sena ÖZBAY

<sup>1</sup>“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU-ÇİFTÇİ danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Hamide Sena ÖZBAY

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, her türlü desteğiyle beni her zaman motive eden, anlayış ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye,

Fakülteye adım attığım andan beri beni her zaman destekleyen, engin tecrübelerini benimle paylaşan, akademinin ilke ve değerlerini bana öğreten saygıdeğer Eczacılık Fakültesi Dekan'ı Prof. Dr. Gülberk UÇAR'a,

Tez çalışmalarım boyunca fikirleri ile çalışmalarına verdiği katkılardan ötürü saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatih ÖZALTIN'a,

Nanopartikül çalışmalarında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan saygıdeğer Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölüm Başkanı Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

Analitik yöntemlerin uygulanması aşamasında yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya,

Polimer ve nanopartikül sentez aşamalarında katkılarından dolayı Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölüm Başkan Yardımcısı Dr. Öğr.Üyesi Merve GÜLTEKİNOĞLU BAYRAM'a,

Tez çalışmalarım sırasında analitik yöntemlerin uygulanmasında yardımlarından dolayı Cemil Can EYLEM'e,

Bilimsel bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmakla birlikte manevi desteğini de esirgemeyen kıymetli arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi İpek BAYSAL'a,

Hayatım boyunca hep yanımda olan, sevgi ve ilgilerini daima hissettiğim, benim için her türlü fedakarlığı yapan çok kıymetli aileme,

Doktora eğitimim boyunca sevgisiyle, sabrıyla beni her zaman destekleyen sevgili eşim Mustafa Bilal ÖZBAY'a ve bu süreçte bana varlığıyla mutluluk veren canım oğlum Yusuf Eymen'e sonsuz teşekkürler.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: TSA-2018-16993).

## ÖZET

**ÖZBAY, HS. KoenzimQ<sub>10</sub> Nefropatisinde KoenzimQ<sub>10</sub> İçerikli Nanoterapötiklerin Tedavi Etkinliğinin Araştırılması ve *In Vitro* Modelde Mitokondriyal Fonksiyonlarının Karşılaştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2022.**

KoenzimQ<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) biyosentezinde rol alan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan CoQ<sub>10</sub> eksikliği başta böbrekler olmak üzere birçok sistemi etkilemektedir. Bunlardan COQ8B mutasyonları, adölesan yaş grubunda ortaya çıkan kronik böbrek yetmezliğinin önemli bir nedeni olarak tanımlanmıştır. COQ8B mutasyonu olan hastalar proteinüri evresinde iken teşhis edilip ekzojen oral CoQ<sub>10</sub> tedavisine başlandığında proteinürinin azaldığı ve böbrek fonksiyonlarının korunabildiği ortaya konmuştur. Ancak CoQ<sub>10</sub>, yüksek molekül ağırlığı ve lipofilik özelliği nedeniyle biyoyararlanımı düşük ve doku dağılımı yüksek bir moleküldür. CoQ<sub>10</sub>'un mitokondrideki lokal konsantrasyonunun artırılması daha etkin bir tedavi sağlama ve bu hastalarda böbrek yetmezliğini tamamen önleyebilme potansiyeline sahiptir. Bu tez kapsamında, CoQ<sub>10</sub> eksikliğine neden olan mutasyonlara ikincil gelişen CoQ<sub>10</sub> nefropatisinin önlenmesi/iyileştirilmesi için mitokondrilere hedeflendirilmiş CoQ<sub>10</sub> içerikli poli (laktid-ko-glikolik asit)-blok-poli (etilen glikol)-(5-karboksipentil) trifenil fosfonyum bromür nanopartiküller (CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP) geliştirilmiştir. Geliştirilen bu NP'ler boyut, yüzey yükü, partikül dağılımı, ilaç enkapsülasyon etkinliği ve morfolojik özellikleri bakımından karakterize edilmiştir. CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'ler yaklaşık 150 nm boyut ve +20 mV yüzey yükü ile aktif hedeflendirme için uygun özelliklere sahiptir. Bu NP'lerin ilaç yükleme etkinliği yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenmiş ve yaklaşık %40 oranında CoQ<sub>10</sub> enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu bulunmuştur. *In vitro* ortamda insan böbrek proksimal tübül epitel hücre hattına (HK-2) uygulanan bu NP'lerin (NP11) hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığı XTT deneyi ile gösterilmiştir. HK-2 hücrelerinde siRNA aracılığı ile COQ8B geni susturularak (COQ8B<sup>-/-</sup> hücre hatları) *in vitro* hastalık modeli oluşturulmuş, bunun için farklı doz ve sürelerde siRNA uygulaması yapılmıştır. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (PCR) deneyleri ile en etkili gen inhibisyonu 100 nM siRNA ile 48 saat sürenin sonunda elde edilmiş ve Western Blot analizleri ile bu sonuç doğrulanmıştır. Formüle edilen NP'lerin COQ8B<sup>-/-</sup> hücreleri üzerindeki etkinliği metabolomik analizler yapılarak mitokondri fonksiyonları üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, siRNA uygulanan hücre grubuna uygulanan CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'nin trikarboksilik asit (TCA) döngüsü hızını artırmada serbest CoQ<sub>10</sub>'a kıyasla daha etkili olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** KoenzimQ<sub>10</sub>, COQ8B, polimerik nanopartikül, mitokondri, aktif hedefleme, metabolomiks

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: TSA 2018-16993).

## ABSTRACT

**ÖZBAY, HS. Investigation of the Treatment Efficacy of CoenzymeQ<sub>10</sub> Loaded Nanotherapeutics in CoenzymeQ<sub>10</sub> Nephropathy and Comparison of Mitochondrial Functions in *In Vitro* Model. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2022.** CoQ<sub>10</sub> deficiency caused by genetic mutations affects many organs, especially the kidneys. Among these genetic mutations, *COQ8B* mutations have been identified as an important cause of chronic renal failure in the adolescent age group. Oral CoQ<sub>10</sub> supplementation at the early stage of failure can reduce proteinuria and stabilize kidney function. However, CoQ<sub>10</sub> is a molecule with low bioavailability and high tissue distribution due to its high molecular weight and lipophilic characteristics. More effective treatment can be provided by increasing the local CoQ<sub>10</sub> concentration in the mitochondria, and renal failure can be prevented entirely in these patients. In this study, mitochondria-targeted CoQ<sub>10</sub> loaded PLGA-b-PEG-TPP nanoparticles (CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs) have been formulated to prevent/cure CoQ<sub>10</sub> nephropathy secondary to mutations causing CoQ<sub>10</sub> deficiency. These nanoparticles were characterized by determining surface charge, particle distribution, drug entrapment efficiency and morphological properties. CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs were found to have a size of approximately 150 nm and a zeta potential of +20 mV. The entrapment efficiency of the nanoparticles was determined as 40% by the HPLC method. Cytotoxicity studies with the XTT assay have shown no effect on the viability of the human kidney proximal tubule epithelial cells (HK-2) exposed to CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs. An *in vitro* disease model was developed in HK-2 cells by silencing the *COQ8B* gene (*COQ8B*<sup>-/-</sup> cell lines) with different doses of siRNA for 48 and 72 hours. According to the results of real-time polymerase chain reaction (rt-PCR) experiments, the most effective gene inhibition was obtained by 100 nM siRNA after 48 hours. This result was confirmed by Western Blot analysis. The efficacy of the formulated nanoparticles on *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells was evaluated through mitochondrial functions by metabolomic analyzes. The findings have shown that the treatment of *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells with CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs is more effective in increasing the TCA cycle rate compared to free COQ<sub>10</sub>.

**Keywords:** CoQ<sub>10</sub>, *COQ8B*, polymeric nanoparticle, targeting mitochondria, metabolomics

This thesis was supported by Hacettepe Scientific Research Project Coordination Unit (Project number: TSA 2018-16993)

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                        |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ONAY SAYFASI                                                                           | iii  |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI                                             | iv   |
| ETİK BEYAN                                                                             | v    |
| TEŞEKKÜR                                                                               | vi   |
| ÖZET                                                                                   | vii  |
| ABSTRACT                                                                               | viii |
| İÇİNDEKİLER                                                                            | ix   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR                                                                | xiii |
| ŞEKİLLER                                                                               | xvii |
| TABLolar                                                                               | xx   |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                        | 1    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                                               | 3    |
| 2.1. Nefrotik Sendrom                                                                  | 3    |
| 2.1.1. Nefrotik Sendromun Sınıflandırılması                                            | 3    |
| 2.1.2. SRNS ve <i>COQ8B</i> Gen İlişkisi                                               | 3    |
| 2.2. CoQ <sub>10</sub>                                                                 | 5    |
| 2.2.1. CoQ <sub>10</sub> 'un Fonksiyonları                                             | 5    |
| 2.2.2. CoQ <sub>10</sub> Biyosentezi                                                   | 7    |
| 2.2.3. CoQ <sub>10</sub> 'un Kaynakları, Biyoyararlanımı ve Farmakokinetik Özellikleri | 9    |
| 2.3. CoQ <sub>10</sub> Eksiklikleri                                                    | 10   |
| 2.3.1. Primer CoQ <sub>10</sub> Eksiklikleri                                           | 10   |
| 2.3.2. Sekonder CoQ <sub>10</sub> Eksiklikleri                                         | 12   |
| 2.4. <i>COQ8B</i> Geni ile CoQ <sub>10</sub> İlişkisi                                  | 12   |
| 2.4.1. <i>COQ8B</i> Gen Mutasyonu ve CoQ <sub>10</sub> Eksikliği                       | 12   |
| 2.4.2. Ekzojen CoQ <sub>10</sub> Takviyesinin Etkisi                                   | 12   |

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5. CoQ <sub>10</sub> Yüklü İlaç Taşıyıcı Sistemler                                                                              | 15 |
| 2.5.1. Lipozomlar                                                                                                                 | 16 |
| 2.5.2. Polimerik Nanopartiküller                                                                                                  | 16 |
| 2.5.3. Polimerik Miseller                                                                                                         | 17 |
| 2.5.4. Katı Lipit Nanopartiküller                                                                                                 | 17 |
| 2.5.5. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar                                                                                               | 18 |
| 2.5.6. Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen Sistemler                                                                                | 18 |
| 2.5.7. Siklodekstrinler                                                                                                           | 19 |
| 2.6. Mitokondriye Hedeflendirilmiş Nanopartiküler Sistemler                                                                       | 19 |
| 2.7. Mitokondri Fonksiyonunun Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan Deneysel Yaklaşımlar                                               | 21 |
| 2.7.1. Mitokondriyal Respirometri                                                                                                 | 21 |
| 2.7.2. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi                                                                                | 21 |
| 2.7.3. Biyosensörler                                                                                                              | 22 |
| 2.7.4. Fluksomik Analizler                                                                                                        | 22 |
| 2.7.5. Metabolomik Analizler                                                                                                      | 25 |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                                                                         | 28 |
| 3.1. Gereçler                                                                                                                     | 28 |
| 3.2. Hücre Kültürü                                                                                                                | 28 |
| 3.3. siRNA Transfeksiyonu                                                                                                         | 29 |
| 3.4. Gerçek zamanlı PCR                                                                                                           | 30 |
| 3.5. Western Blot Analizleri                                                                                                      | 30 |
| 3.6. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu                                                                           | 31 |
| 3.6.1. Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartikül Hazırlanması                                                                         | 31 |
| 3.6.2. Çift Emülsiyon-Çözücü Uçurma Yöntemi ile Nanopartikül Hazırlanması                                                         | 33 |
| 3.6.3. PLGA- <i>b</i> -PEG-NH <sub>2</sub> Polimeri ile Hazırlanan CoQ <sub>10</sub> yüklü Nanopartiküllerin TPP ile Konjugasyonu | 33 |

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6.4. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü                                                                                            | 34 |
| 3.6.5. Morfolojik Analiz                                                                                                                    | 34 |
| 3.6.6. Nanopartiküllere Yüklenen CoQ <sub>10</sub> Miktarının Tayini                                                                        | 34 |
| 3.6.7. CoQ <sub>10</sub> Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi                                                                            | 36 |
| 3.6.8. CoQ <sub>10</sub> Salım Çalışmaları                                                                                                  | 36 |
| 3.6.9. XTT Deneyi                                                                                                                           | 36 |
| 3.7. Hücre Kültüründe Nanopartikül Uygulaması                                                                                               | 37 |
| 3.8. Metabolomik ve Fluksomik Analizler                                                                                                     | 37 |
| 3.8.1. Hücrelerin Toplanması                                                                                                                | 37 |
| 3.8.2. GC-MS Temelli Metabolomik ve Fluksomik Analizler                                                                                     | 38 |
| 3.8.3. İstatistiksel Analizler                                                                                                              | 39 |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                                                                          | 40 |
| 4.1. siRNA Transfeksiyonu Sonrasında HK-2 Hücrelerinde COQ8B Gen Ekspresyon Düzeyleri                                                       | 40 |
| 4.2. siRNA Transfeksiyonu Sonrasında HK-2 Hücrelerde COQ8B Protein Düzeyleri                                                                | 40 |
| 4.2.1. PLGA- <i>b</i> -PEG-NH <sub>2</sub> Polimeri ve Nanoçöktürme Yöntemi ile Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu               | 41 |
| 4.2.2. Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Dağılımının İncelenmesi                                                                         | 41 |
| 4.2.3. Nanopartiküllere Yüklenen CoQ <sub>10</sub> Miktarının ELISA Yöntemi ile Tayini                                                      | 45 |
| 4.2.4. CoQ <sub>10</sub> Etken Madde Salım Çalışmaları                                                                                      | 45 |
| 4.3. PLGA- <i>b</i> -PEG-NH <sub>2</sub> Polimeri ve Çift Emülsiyon-Çözücü Uçurma Yöntemi ile Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu | 45 |
| 4.3.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının İncelenmesi                                                                      | 45 |
| 4.3.2. Nanopartiküllerin STEM Görüntüleri                                                                                                   | 46 |
| 4.3.3. Nanopartiküllerin FT-IR Spektrumu                                                                                                    | 47 |

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3.4. Nanopartiküllere Yüklenen CoQ <sub>10</sub> Miktarının ELISA Yöntemi ile Tayini                                                               | 47 |
| 4.3.5. Nanopartiküllere Yüklenen CoQ <sub>10</sub> Miktarının HPLC Yöntemi ile Tayini                                                                | 48 |
| 4.4. Mitokondri Hedefli, PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP Polimeri ile Hazırlanan CoQ <sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu                  | 50 |
| 4.4.1. PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP Polimerinin FT-IR ve NMR Spektrumu                                                                                    | 50 |
| 4.4.2. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının İncelenmesi                                                                               | 53 |
| 4.5. CoQ <sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin Morfolojisi                                                                                           | 55 |
| 4.6. CoQ <sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllere Yüklenen CoQ <sub>10</sub> Miktarı                                                                     | 56 |
| 4.6.1. CoQ <sub>10</sub> ’ a ait Kalibrasyon Doğrusu                                                                                                 | 56 |
| 4.6.2. CoQ <sub>10</sub> Enkapsülasyon Etkinliği                                                                                                     | 57 |
| 4.7. CoQ <sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi                                                                    | 59 |
| 4.8. CoQ <sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin COQ8B <sup>-/-</sup> HK-2 Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin Metabolomik Yaklaşımla Değerlendirilmesi | 60 |
| 4.9. CoQ <sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin Krebs Döngüsü Metabolitlerinin Döngü Hızına Etkisi                                                    | 73 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                                                                                                   | 76 |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                                                                                          | 85 |
| <b>7. KAYNAKLAR</b>                                                                                                                                  | 86 |
| <b>8. EKLER</b>                                                                                                                                      |    |
| <b>EK-1:</b> Tez çalışması orjinallik raporu                                                                                                         |    |
| <b>EK-2:</b> Turnitin dijital makbuz                                                                                                                 |    |
| <b>EK-3:</b> Tezden üretilen yayın                                                                                                                   |    |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                                                   |    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                         |                                                            |
|-------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>ACTN4</b>            | Alfa-4 aktinin                                             |
| <b>ADCK4</b>            | AarF Domain Containing Kinase-4                            |
| <b>ADP</b>              | Adenozin difosfat                                          |
| <b>AMP</b>              | Adenozin monofosfat                                        |
| <b>APOL1</b>            | Apolipoprotein L1                                          |
| <b>ART</b>              | Anti-retroviral tedavi                                     |
| <b>ATP</b>              | Adenozin trifosfat                                         |
| <b>BCA</b>              | Bikinkoninik asit                                          |
| <b>BSA</b>              | Sığır serum albümin                                        |
| <b>CD2AP</b>            | CD2 ile ilişkili protein                                   |
| <b>cDNA</b>             | Komplementer DNA                                           |
| <b>COL4A3-5</b>         | Kollajen alfa 3-5(IV)                                      |
| <b>CoQ<sub>10</sub></b> | KoenzimQ <sub>10</sub>                                     |
| <b>COQ2</b>             | Koenzim2 geni                                              |
| <b>COQ4</b>             | Koenzim4 geni                                              |
| <b>COQ6</b>             | Koenzim6 geni                                              |
| <b>COQ7</b>             | Koenzim7 geni                                              |
| <b>COQ8B</b>            | Koenzim Q8B geni                                           |
| <b>COQ9</b>             | Koenzim9 geni                                              |
| <b>CRP</b>              | C-reaktif protein                                          |
| <b>CUBN</b>             | Kübilin                                                    |
| <b>DCC</b>              | Disikloheksilkarbodiimid                                   |
| <b>DCM</b>              | Diklorometan                                               |
| <b>DGKE</b>             | Diaçilgliserol kinaz                                       |
| <b>DMAP</b>             | 4-Dimetilaminopiridin                                      |
| <b>DMEM</b>             | Dulbecco's Modified Eagle Medium                           |
| <b>DMF</b>              | Dimetilformamid                                            |
| <b>EDC</b>              | N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid<br>hidroklorür |
| <b>eGFH</b>             | Tahmini glomerüler filtrasyon hızı                         |

|                   |                                                                                        |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ELISA</b>      | Enzim-ilintili İmmünSorben Yöntemi                                                     |
| <b>ETF/ETF:QO</b> | Elektron transfer flavoprotein/elektron transfer flavoprotein: ubikinon oksidoredüktaz |
| <b>ETZ</b>        | Elektron taşıma zinciri                                                                |
| <b>FAD</b>        | Flavin-adenin dinükleotid                                                              |
| <b>FDA</b>        | Gıda ve ilaç dairesi                                                                   |
| <b>FEP</b>        | Florlu etilen polipropilen                                                             |
| <b>FSGS</b>       | Fokal segmental glomeruloskleroz                                                       |
| <b>FT-IR</b>      | Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi                                            |
| <b>G1P</b>        | Glukoz-1-fosfat                                                                        |
| <b>G3P</b>        | Glukoz-3-fosfat                                                                        |
| <b>G6P</b>        | Glukoz-6-fosfat                                                                        |
| <b>GAPDH</b>      | Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz                                                    |
| <b>GAPVD1</b>     | GAPaz aktive edici protein                                                             |
| <b>GC-MS</b>      | Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi                                                |
| <b>GTP</b>        | Guanozin trifosfat                                                                     |
| <b>HK-2</b>       | İnsan böbrek proksimal tüp epitel hücre hattı                                          |
| <b>HMG-KoA</b>    | Hidroksimetil glutaril-KoA                                                             |
| <b>HPLC</b>       | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi                                                |
| <b>HPV-16</b>     | İnsan papilloma virüsü-16                                                              |
| <b>IL-6</b>       | İnterlökin-6                                                                           |
| <b>INF2</b>       | Ters formin-2                                                                          |
| <b>ITGA3</b>      | İntegrin alfa-3                                                                        |
| <b>kDa</b>        | Kilodalton                                                                             |
| <b>LAMB2</b>      | Laminin beta-2                                                                         |
| <b>LC-MS</b>      | Sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi                                               |
| <b>LDL</b>        | Düşük yoğunluklu lipoprotein                                                           |
| <b>LMX1B</b>      | LIM Homeobox transkripsiyon faktör 1-beta                                              |
| <b>MHY9</b>       | Miyozin-9                                                                              |
| <b>MSTFA</b>      | N-metil-N-trimetilsililtrifloroasetamit                                                |
| <b>MYO1E</b>      | Miyozin-1e                                                                             |
| <b>NaCl</b>       | Sodyum klorür                                                                          |

|                                         |                                                                                    |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NAD</b>                              | Nikotinamid adenin dinükleotid                                                     |
| <b>NADH</b>                             | Nikotinamid adenin dinükleotid H                                                   |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b>          | Nükleer faktör- $\kappa$ b                                                         |
| <b>NHS</b>                              | N-Hidroksisüksinimid                                                               |
| <b>NLT</b>                              | Nanoyapılı lipid taşıyıcılar                                                       |
| <b>NMR</b>                              | Nükleer manyetik rezonans                                                          |
| <b>NP</b>                               | Nanopartikül                                                                       |
| <b>NPHS1</b>                            | Nefrin1                                                                            |
| <b>NPHS2</b>                            | Nefrin2                                                                            |
| <b>NUP107</b>                           | Nükleoporin 107                                                                    |
| <b>NUP205</b>                           | Nükleoporin 205                                                                    |
| <b>NUP93</b>                            | Nükleoporin 93                                                                     |
| <b>PBS</b>                              | Fosfatla tamponlanmış salin                                                        |
| <b>PCA</b>                              | Temel bileşenler analizi                                                           |
| <b>PCL</b>                              | Polikaprolakton                                                                    |
| <b>PCR</b>                              | Polimeraz zincir reaksiyonu                                                        |
| <b>PDI</b>                              | Polidispersite indeksi                                                             |
| <b>PDSS1</b>                            | Dekaprenil difosfat sentaz alt birim 1                                             |
| <b>PDSS2</b>                            | Dekaprenil difosfat sentaz alt birim 2                                             |
| <b>PEG</b>                              | Polietilen glikol                                                                  |
| <b>PGA</b>                              | Poli (glikolik asit)                                                               |
| <b>P<sub>i</sub></b>                    | İnorganik fosfor                                                                   |
| <b>PLA</b>                              | Poli (laktik asit)                                                                 |
| <b>PLCE1</b>                            | 1-Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat fosfodiesteraz epsilon-1                        |
| <b>PLGA</b>                             | Poli (laktik-ko-glikolik asit)                                                     |
| <b>PLGA-<i>b</i>-PEG</b>                | Poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri                |
| <b>PLGA-<i>b</i>-PEG-OH</b>             | Hidroksil uçlu poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri |
| <b>PLGA-<i>b</i>-PEG-NH<sub>2</sub></b> | Amin uçlu poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri      |

|                                  |                                                                                                             |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PLS-DA</b>                    | En küçük kareler farklılaştırma analizi                                                                     |
| <b>PTP</b>                       | Geçirgenlik geçişi gözenegi                                                                                 |
| <b>PVA</b>                       | Polivinil alkol                                                                                             |
| <b>RNAi</b>                      | RNA interferans                                                                                             |
| <b>ROS</b>                       | Reaktif oksijen türleri                                                                                     |
| <b>SCARB2</b>                    | Lizozomal integral membran proteini 2                                                                       |
| <b>SDS-PAGE</b>                  | Sodyumdodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi                                                         |
| <b>SEDDS</b>                     | Kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemler                                                                 |
| <b>SLN</b>                       | Katı lipid nanopartikül                                                                                     |
| <b>SMARCA1</b>                   | Kromatin alt familyası A-benzeri protein 1'in SWI / SNF ile ilişkili matrikse bağlı aktine bağlı regülatörü |
| <b>SRNS</b>                      | Steroide dirençli nefrotik sendrom                                                                          |
| <b>SSS</b>                       | Santral sinir sistemi                                                                                       |
| <b>STEM</b>                      | Taramalı Geçirmeli Elektron Mikroskopu                                                                      |
| <b>TBS</b>                       | Trisile tamponlanmış salin                                                                                  |
| <b>TCA</b>                       | Trikarboksilik asit                                                                                         |
| <b>TMCS</b>                      | Trimetilklorosilan                                                                                          |
| <b>TMRM</b>                      | Tetrametilrodamin trimetil ester                                                                            |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>   | Tümör nekroz faktör- $\alpha$                                                                               |
| <b>TPP</b>                       | (5-karboksipentil) trifenilfosfonyum bromür                                                                 |
| <b>TRPC6</b>                     | Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, alt familya C, üye 6                                              |
| <b>UCP</b>                       | Eşleşme bozucu protein                                                                                      |
| <b>VIP</b>                       | Projede önemli değişken                                                                                     |
| <b>WT1</b>                       | Wilms tümör proteini                                                                                        |
| <b><math>\Delta\Psi_m</math></b> | Mitokondri membran potansiyeli                                                                              |

## ŞEKİLLER

| Şekil                                                                                                                                                                                                                                                                    | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.1. CoQ <sub>10</sub> ' un redoks formları.                                                                                                                                                                                                                             | 5     |
| 2.2. Memeli hücresinde CoQ <sub>10</sub> biyosentez basamakları.                                                                                                                                                                                                         | 8     |
| 2.3. CoQ <sub>10</sub> içeren taşıyıcı sistemler.                                                                                                                                                                                                                        | 15    |
| 2.4. <sup>18</sup> O işaretleme mekanizmasının ve işaretlenen metabolitlerin hangi yolak analizlerinde kullanıldığının şematik gösterimi.                                                                                                                                | 23    |
| 2.5. Normal (HEP) ve AK2 <sup>-/-</sup> transgenik (HEP KO) hücre modellerinde farklı metabolitlerin <sup>18</sup> O ile işaretlenme yüzdeleri.                                                                                                                          | 25    |
| 2.6. Caco-2 ve FHC hücre hatlarında Krebs döngüsünün <sup>18</sup> O ile işaretlenme yüzdeleri.                                                                                                                                                                          | 25    |
| 2.7. Metabolomik analiz basamakları.                                                                                                                                                                                                                                     | 26    |
| 3.1. PLGA- <i>b</i> -PEG-OH polimerinin TPP ile konjugasyon reaksiyonu.                                                                                                                                                                                                  | 32    |
| 3.2. CoQ <sub>10</sub> yüklü NP yapılarının şematik gösterimi. <b>A)</b> PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP polimeri ile hazırlanan NP'ler <b>B)</b> PLGA- <i>b</i> -PEG-OH polimeri ile hazırlanan NP'ler.                                                                         | 33    |
| 4.1. Farklı konsantrasyonlarda siRNA ile transfekte edilen HK-2 hücrelerinin COQ8B gen ekspresyon düzeyleri.                                                                                                                                                             | 33    |
| 4.2. siRNA ile 72 ve 96 saat süreli transfeksiyon sonrası HK-2 hücrelerinde COQ8B proteinine ait Western Blot görüntüsü.                                                                                                                                                 | 41    |
| 4.3. NP'lerin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımını gösteren grafikler. <b>A)</b> NP1, <b>B)</b> NP2, <b>C)</b> NP3, <b>D)</b> NP4'e ait partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımını gösteren grafik.                                                                  | 43    |
| 4.4. NP'lerin zeta potansiyel grafikleri. <b>A)</b> NP1, <b>B)</b> NP2, <b>C)</b> NP3, <b>D)</b> NP4'e ait zeta potansiyel grafiği.                                                                                                                                      | 44    |
| 4.5. NP'lere ait STEM görüntüleri: <b>A)</b> NP7'ye ait STEM görüntüsü <b>B)</b> NP8'e ait STEM görüntüsü.                                                                                                                                                               | 46    |
| 4.6. PLGA- <i>b</i> -PEG ve PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP polimerlerinin FT-IR spektrumları.                                                                                                                                                                                   | 47    |
| 4.7. CoQ <sub>10</sub> 'a ait kalibrasyon doğrusu.                                                                                                                                                                                                                       | 48    |
| 4.8. CoQ <sub>10</sub> standart çözeltilerine ait HPLC kromatogramları. <b>A)</b> 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 mg.mL <sup>-1</sup> CoQ <sub>10</sub> içeren <b>B)</b> 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 mg.mL <sup>-1</sup> CoQ <sub>10</sub> içeren standart çözeltilere ait HPLC kromatogramı. | 49    |
| 4.9. PLGA- <i>b</i> -PEG-NH <sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan CoQ <sub>10</sub> yüklü NP'lerin (NP7) kromatogramı.                                                                                                                                                    | 50    |
| 4.10. PLGA- <i>b</i> -PEG-OH ve PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP polimerlerinin ve TPP molekülünün FT-IR spektrumları.                                                                                                                                                            | 51    |

- 4.11.** PLGA-*b*-PEG-OH polimeri, TPP molekülü ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimerinin NMR spektrumları. **A)** PLGA-*b*-PEG-OH polimerinin NMR spektrumu. **B)** TPP molekülünün NMR spektrumu. **C)** PLGA-*b*-PEG-TPP polimerinin NMR spektrumu. 52
- 4.12.** PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait partikül büyüklüğü ve dağılımını gösteren grafikler. **A)** NP9, **B)** NP10, **C)** NP11'e ait partikül büyüklüğü ve dağılımını gösteren grafik. 53
- 4.13.** PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait zeta potansiyel grafikleri. **A)** NP9, **B)** NP10, **C)** NP11'e ait partikül büyüklüğü ve dağılımını gösteren grafik. 54
- 4.14.** PLGA-*b*-PEG-OH polimeri ile hazırlanan **A)** yüklü olmayan ve **B)** CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait STEM görüntüleri. 55
- 4.15.** PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan **A)** yüklü olmayan ve **B)** CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait STEM görüntüleri. 56
- 4.16.** CoQ<sub>10</sub>'a ait kalibrasyon doğrusu. 56
- 4.17.** CoQ<sub>10</sub> içeren standartlara ait HPLC kromatogramları. **A)** 0,005; 0,0125; 0,05; 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> içeren, **B)** 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg.mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> içeren standart çözeltilere ait kromatogram. 57
- 4.18.** CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lerin HPLC kromatogramları. **A)** PLGA-*b*-PEG-OH polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait (NP9), **B)** PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere **C)** ait, **C)** PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü **D)** NP'lere ait (NP11) kromatogramı. 58
- 4.19.** PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'ler (NP11) ile muamele edilen HK-2 hücre hattına ait canlılık grafiği. 59
- 4.20.** HK-2 hücrelerine ait metabolomiks verilerine ait PCA skor grafiği 64
- 4.21.** HK-2 hücrelerinde gerçekleştirilen metabolomiks analiz verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği, **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği. 65
- 4.22.** HK-2 kontrol grubu ile siRNA uygulaması yapılan hücre grubunun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. PLS-DA skor grafiği (R<sup>2</sup>:0,9 ve Q<sup>2</sup>:0,99), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** siRNA grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler. 67
- 4.23.** siRNA uygulaması yapılan hücre grubu ile mitokondriye hedefli NP (NP11) uygulanan grubun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği (R<sup>2</sup>:0,99 ve Q<sup>2</sup>:0,99), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11) grubunda siRNA grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler. 68

- 4.24.** HK-2 kontrol grubu ile mitokondriye hedefli NP (NP11) uygulaması yapılan hücre grubunun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0,99 ve  $Q^2$ :0,99), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler. 69
- 4.25.** HK-2 kontrol grubu ile serbest CoQ<sub>10</sub> uygulaması yapılan hücre grubunun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0,99 ve  $Q^2$ :0,99), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** Serbest CoQ<sub>10</sub> grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler. 70
- 4.26.** siRNA uygulanan grup ile serbest CoQ<sub>10</sub> uygulaması yapılan hücre grubunun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2$ :0,99 ve  $Q^2$ :0,96), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** Serbest CoQ<sub>10</sub> grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler. 71
- 4.27.** Serbest CoQ<sub>10</sub> uygulaması yapılan hücre grubu ile mitokondriye hedefli NP (NP11) uygulanan grubun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0,99 ve  $Q^2$ :0,99), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11) grubunda serbest CoQ<sub>10</sub> grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler. 72
- 4.28.** HK-2 hücre hattı metabolitlerinin *heatmap* grafiği. 73
- 4.29.** HK-2 hücrelerinde Pi, süksinat, fumarat, sitrat, malat ve G1P metabolitlerinin <sup>18</sup>O işaretlenme yüzdeleri. 74
- 4.30.** HK-2 hücrelerinde glutamat, serin, aspartat, gliserol, palmitat ve oleat metabolitlerinin <sup>18</sup>O işaretlenme yüzdeleri 75

## TABLOLAR

| Tablo                                                                                                                                                                       | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 2.1. Maya ve memeli hücrelerinde CoQ biyosentezinde rol oynayan genler.                                                                                                     | 9     |
| 3.1. Gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primer dizileri.                                                                                                            | 30    |
| 3.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri.                                                                                                                                     | 31    |
| 3.3. GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.                                                                                                                         | 39    |
| 4.1. Nanoçöktürme yöntemi ve PLGA- <i>b</i> -PEG-NH <sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan NP'lerin ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel değerleri.                           | 42    |
| 4.2. PLGA- <i>b</i> -PEG-NH <sub>2</sub> polimeri kullanılarak çift emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP'lerin ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel değerleri. | 46    |
| 4.3. PLGA- <i>b</i> -PEG-OH ve PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP NP'lerin ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel değerleri.                                                             | 54    |
| 4.4. Nanopartiküllere CoQ <sub>10</sub> enkapsülasyon etkinliği.                                                                                                            | 59    |
| 4.5. GC-MS sonucunda tanımlanan metabolitler ve bağıl derişimleri.                                                                                                          | 60    |
| 4.6. Yabanıl tip ve COQ8B <sup>-/-</sup> HK-2 hücre hatlarından elde edilen grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait P değerleri.                           | 62    |

## 1. GİRİŞ

Steroide dirençli nefrotik sendrom (SRNS) çocukluk yaş grubunun en sık görülen glomerüler hastalıklarından birisi olup son dönem böbrek yetmezliğinin de ikinci nedenidir. Steroide direnç bir klinik gözlem olup bu duruma yol açan çok sayıda kalıtsal neden vardır. Bu nedenlerden birisi de endojen koenzimQ<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) sentez defektine neden olan genetik bozukluklardır. Elektron transportu için kritik öneme sahip bu molekülün eksikliği dışarıdan verilmek suretiyle giderilebilir ve böylelikle kalıtsal bir böbrek hastalığı olan “CoQ<sub>10</sub> nefropatisinde” tedavi edici olabilir (1).

CoQ<sub>10</sub> özellikle mitokondride yoğun olmak üzere hücre membranlarında bulunan lipofilik bir moleküldür. Mitokondriyal solunum zincirinde CoQ<sub>10</sub>, elektronların kompleks I ve II'den kompleks III'e ve elektron transfer-flavoprotein dehidrogenaz'dan kompleks III'e taşınmasında önemli rol oynamaktadır. Primer CoQ<sub>10</sub> eksikliği klinik ve genetik açıdan heterojen bir bozukluktur. Bugün itibariyle insanda endojen CoQ<sub>10</sub> biyosentezine katılan 16 gen olduğu bilinmektedir. CoQ<sub>10</sub> biyosentezinde rol alan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan endojen CoQ<sub>10</sub> eksikliği başta böbrekler olmak üzere birçok sistemi etkilemektedir. Bunlardan *COQ8B* mutasyonları adölesan yaş grubunda ortaya çıkan kronik böbrek yetmezliğinin önemli bir nedeni olarak tanımlanmıştır. Bu hastalarda çocukluk yaş grubunda sinsi seyirli proteinüri, adölesan yaşa ulaşınca böbrek yetmezliği gelişmesine neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada ilk kez, *COQ8B* mutasyonu olan ailelerin asemptomatik aile bireylerinde mutasyon taraması ile daha proteinüri evresinde iken teşhis edilip ekzojen oral CoQ<sub>10</sub> tedavisine başlanan hastalarda proteinürinin bu tedavi ile azaldığı ve böbrek fonksiyonlarının korunabildiği ortaya konmuştur (2). Ancak oral yolla alınan ekzojen CoQ<sub>10</sub>'un biyoyararlanımı düşük olup ne kadarının etki yeri olan mitokondriye ulaştığı belli değildir. CoQ<sub>10</sub>'un mitokondrideki lokal konsantrasyonunun artırılması daha etkin bir tedavi sağlama ve belki de bu hastalarda böbrek yetmezliğini tamamen önleyebilme potansiyeline sahiptir. Ticari olarak piyasada mevcut olan formülasyonların farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri arasında çok büyük farklar vardır; CoQ<sub>10</sub>'un dokulara

dağılımı fazla ve biyoyararlanımı düşüktür. Bu nedenle daha etkin tedavi için yeni farmasötik dozaj formlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez kapsamında, CoQ<sub>10</sub> eksikliğine neden olan mutasyonlara ikincil gelişen CoQ<sub>10</sub> nefropatisinin önlenmesi/iyileştirilmesi için CoQ<sub>10</sub>'un aktif farmasötik içerik olarak kullanıldığı mitokondriye hedefli PLGA-*b*-PEG nanopartiküllerin (NP) geliştirilmesi, proksimal tübül hücre hattında siRNA temelli *COQ8B*'ün susturulması (*COQ8B*<sup>-/-</sup> hücre hatları) ile *in vitro* hastalık modelinin oluşturulması, geliştirilen NP'lerin etkinliğinin oluşturulan *COQ8B*<sup>-/-</sup> hücre hatlarında değerlendirilmesi, oluşturulan *COQ8B*<sup>-/-</sup> hücre hatlarında mitokondriye hedefli CoQ<sub>10</sub>'un aktif farmasötik içerik olarak kullanıldığı polimerik NP'ler ile tedavi edilen ve edilmeyen hücreler ile yabani (wild-type) hücrelerde Oksijen-18 (<sup>18</sup>O) işaretlemeli fluksomik analizler yapılarak hücre hatları arasındaki mitokondri dinamikleri/fonksiyonlarının karşılaştırılması yoluyla yeni geliştirilen ilacın etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nefrotik Sendrom

Nefrotik sendrom çocukluk çağında yaygın olarak görülen proteinüri ( $>1\text{ g/m}^2/\text{gün}$ ), hipoalbuminemi (serum albumin  $< 2,5\text{ g/dL}$ ), ödem ve hiperlipidemi ile tanımlanan klinik bir tablodur (3). İnsidansı her 100 000 çocukta 2-7 olan bu kronik hastalığın erkeklerde görülme ihtimali kızlara göre 1,5-2 kat daha fazladır (4).

Yaşamın ilk 3 ayında ortaya çıkabilen konjenital nefrotik sendromu olan çocuklarda genellikle podosit veya glomerüler bazal membranı etkileyen genetik bir mutasyon olabildiği gibi sitomegalovirüs gibi bir enfeksiyona ikincil de görülebilir. Hayatın ilk 3 ayından sonra ortaya çıkan nefrotik sendromlarda glomerüler bozukluklar, vaskülitler, enfeksiyonlar, toksinler, malignite, genetik mutasyonlar altta yatan sebepler olabildiği gibi bazılarında da neden saptanamayabilir (5).

#### 2.1.1. Nefrotik Sendromun Sınıflandırılması

Klinik olarak nefrotik sendrom kortikosteroid tedavisine verilen yanıtı göre stereoide duyarlı veya stereoide dirençli olarak ikiye ayrılır.

İdiyopatik nefrotik sendromlu hastaların %80-90'ı 4 hafta içerisinde kortikosteroid tedavisine olumlu yanıt verir. Bu da böbrek fonksiyonları açısından uzun dönemde olumlu bir prognostik göstergedir. Hastaların %20'si ise steroid tedavisine yanıt vermez, bu hastalarda genellikle diyaliz ve böbrek nakli gereksinimi ile son dönem böbrek hastalığına ilerleme görülür (6, 7). SRNS, 4 veya 8 hafta süreyle  $60\text{ mg/m}^2/\text{gün}$  prednizolon uygulandığı halde remisyona sağlanamaması şeklinde tanımlanır. SRNS'li hastalarda renal biyopside çoğunlukla fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS) görülür ve son dönem böbrek yetmezliği gelişme olasılığı yüksektir (7, 8).

#### 2.1.2. SRNS ve COQ8B Gen İlişkisi

SRNS yaşamın ilk 20 yılında FSGS'den sonra son dönem böbrek yetmezliğinin en sık ikinci nedenidir. SRNS vakalarının çoğunda glomerüler filtrasyon bariyerinde

kalıtsal yapısal defektler mevcuttur. Hastalıkla ilgili olarak podosit proteinlerini kodlayan 70'ten fazla gende mutasyonların SRNS ile ilişkisi ortaya konmuştur. SRNS ile ilişkili genler aktin hücre iskeleti düzenleyici genler (*ACTN4*, *MHY9*, *MYO1E*, *INF2*); ve proteinler slit (yarık) diyafram proteinleri (*NPHS1*, *NPHS2*, *CD2AP*, ve *PLCE1*); glomerüler bazal membran ve matriks proteinleri (*LAMB2*, *ITGA3*, *COL4A3-5*); mitokondriyal proteinler (*COQ2*, *COQ6*, *COQ8B*); çekirdek proteinleri (*WT1*, *LMX1B*, *NUP93*, *NUP107*, *NUP205*, *SMARCA1*) ve diğer hücre içi proteinler (*TRPC6*, *SCARB2*, *APOL1*, *DGKE*, *CUBN*, *GAPVD1*) şeklinde sıralanabilir (8).

Son yıllarda *COQ8B* (önceki adıyla AarF Domain Containing Kinase-4, *ADCK4*) genindeki mutasyonların SRNS ile ilişkisi gösterilmiştir. Bu gen 19. kromozomun uzun kolunda yer alır ve kodladığı protein podositlerde, proksimal tübül hücrelerinde ve toplayıcı kanallarda CoQ<sub>10</sub>'un endojen biyosentezinde rol oynamaktadır.

Beş yüz otuz dört SRNS hastası ile yapılan bir çalışmada hastaların %1.9'unda *COQ8B* geninde mutasyon olduğu tespit edilmiş ve bu hastaların ergenlik döneminde SRNS olarak bulgu verdiği ve yaklaşık yarısında tanı anında ileri evre kronik böbrek hastalığı geliştiği gösterilmiştir. *WT1* ve *NPHS2* mutasyonu ile ilişkili glomerulopati hastalarla karşılaştırıldığında, *COQ8B* mutasyonu olan hastaların tanı anında yaşça daha büyük olduğu ve bu hastalarda kronik böbrek hastalığı görülme sıklığının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu da *COQ8B* ile ilişkili nefropatilerin daha sinsi seyirli olduğunu ve SRNS, FSGS ve/veya sebebi bilinmeyen kronik böbrek hastalığı olan hastalarda ayırıcı tanıda düşünülmesi gerektiğini göstermektedir (1). Ashraf ve ark. (9)'nin yaptığı çalışmada 8 farklı aileden SRNS tanısı konulan 15 bireyde *COQ8B* geninde 11 farklı mutasyon saptanmıştır. Bu çalışmada nefrotik sendrom fenotipini oluşturmak amacıyla zebra balığında *COQ8B* ortolog geni susturulmuş ve nefrotik sendroma özgü bulgular olan proteinüri, ödem ve mikroskobik değişiklikler görülmüştür. Ayrıca nefrotik sendromlu hastalara benzer şekilde morfolojik olarak podositlerin ayaksı uzantılarının kaybolduğunu ve filtrasyon yarığının bozulduğunu göstererek *COQ8B* mutasyonunun nefrotik sendrom ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

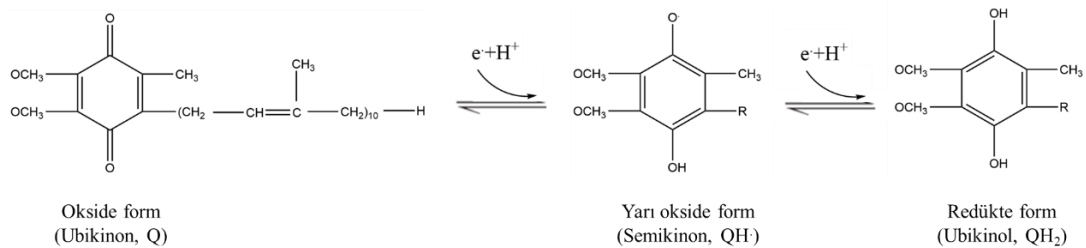
Nefrotik sendrom veya kronik böbrek hastalığı tanısı alan 166 hasta ile yapılan bir başka çalışmada hastalar *COQ8B* mutasyonu açısından taranmış ve 26 hastada biallelik mutasyon saptanmıştır. Bu hastaların aile bireyleri de taramadan geçirilmiş ve 8 bireyin mutasyonu homozigot olarak taşıdığı, henüz şikayeti ve klinik bulgusu olmadığı halde asemptomatik proteinürileri olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışma ile *COQ8B* mutasyonu olan nefrotik sendromlu hastaların aile bireylerinin klinik belirtileri olmasa dahi değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (2).

## 2.2. CoQ<sub>10</sub>

CoQ<sub>10</sub>, ilk olarak 1957 yılında tanımlanan yaygın olarak hücre zarlarında bulunan lipofilik yapıda bir moleküldür. Başlıca mitokondri iç zarında yerleşmiş olan CoQ<sub>10</sub>, yaygın olarak hücre membranlarında bulunur. Bir benzokinon halkası ve uzunluğu türler arasında değişkenlik gösteren poliizoprenoid kuyruk kısmından oluşmaktadır. Tirozin veya fenilalaninden türeyen benzokinon halkası molekülün fonksiyonel grubudur; mevalonik asitten türeyen poliizopren kuyruk kısmı ise membranda lokalize olarak molekülün stabilitesini sağlar (10).

### 2.2.1. CoQ<sub>10</sub>'un Fonksiyonları

CoQ<sub>10</sub>'un başlıca fonksiyonu mitokondri iç zarında yer alan elektron taşıma zincirindedir (ETZ). ETZ'de elektronları kompleks I ve II'den kompleks III'e aktararak elektron taşıyıcısı olarak görev yapar. CoQ<sub>10</sub>; ubikinon (tam okside), semikinon (yarı okside) ve ubikinol (redükte) olarak 3 ayrı redoks formunda bulunabilir (Şekil 2.1.). Elektron transferi ile farklı redoks formlarına dönüşen bu molekül, mitokondri matriksinden zarlar arası alana proton pompalanmasına aracılık ederek adenozin trifosfat (ATP) üretimi için gerekli proton gradientini sağlar (11).



**Şekil 2.1.** CoQ<sub>10</sub>'un redoks formları (11).

Bunun dışında, CoQ<sub>10</sub> elektron transfer flavoprotein/elektron transfer flavoprotein: ubikinon oksidoredüktaz (ETF/ETF:QO) sistemi aracılığı ile yağ asidi oksidasyonunda da görev yapar. ETF/ETF:QO sistemi, yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu ve aminoasit metabolizmasındaki 9 farklı mitokondriyal flavin-adenin dinükleotid (FAD) içeren açıl-KoA dehidrogenazdan solunum zincirindeki CoQ<sub>10</sub> havuzuna elektronları aktaran kısa bir elektron transfer yolağıdır (12). Tüm bu süreçler ile mitokondride ubikinon ve ubikinol arasında denge sağlanmış olur.

CoQ<sub>10</sub>, pirimidin nükleotidlerinin de novo sentezinde yer alan dihidroorotat dehidrogenaz enziminin koenzimi ve mitokondriyal eşleşme bozucu proteinlerin işlevi için gerekli bir kofaktördür (13).

Ubikinol, hücreleri oksidatif hasardan koruyan ve membran lipitlerinin peroksidasyonunu engelleyerek hücre zarlarının stabilitesine katkı sağlayan güçlü bir antioksidandır. Ayrıca CoQ<sub>10</sub>'un indirgenmiş formu, plazmadaki düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) oksidasyondan koruyarak anti-aterojenik etki gösterir (14). Ubikinol ve semi-kinon formları,  $\alpha$ - tokoferol ve askorbik asit gibi antioksidan özellikteki bileşiklerin redükte hallerinin rejenerasyonunu sağlayarak antioksidan olarak görev yapar, böylelikle CoQ<sub>10</sub>'un bu formları hücrelerin oksidan/antioksidan dengesinin korunmasına katkı sağlarlar (15). CoQ<sub>10</sub>, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitelerini artırmak suretiyle antioksidan etkisini gösterir. Yaşlanma ile beraber CoQ<sub>10</sub> miktarının azalması membran peroksidasyonuna neden olur (16). CoQ<sub>10</sub>; endojen sentezlenen tek antioksidan olması, intraselüler redoks mekanizmaları ile rejenere olması ve diğer antioksidan özellikteki maddelere göre daha yüksek konsantrasyonlarda bulunması gibi özellikleri nedeniyle  $\alpha$ - tokoferol'den daha güçlü bir antioksidan olarak kabul edilir (17).

CoQ<sub>10</sub> aynı zamanda mitokondriyal eşleşme bozucu proteinler (UCP) için kofaktör olarak görev yapar. CoQ<sub>10</sub>'un okside formu olan ubikinon yağ asitlerinden H<sup>+</sup> iyonunu alıp UCP'ye taşıyarak yağ asidi bağımlı H<sup>+</sup> transportunda rol alır (18, 19).

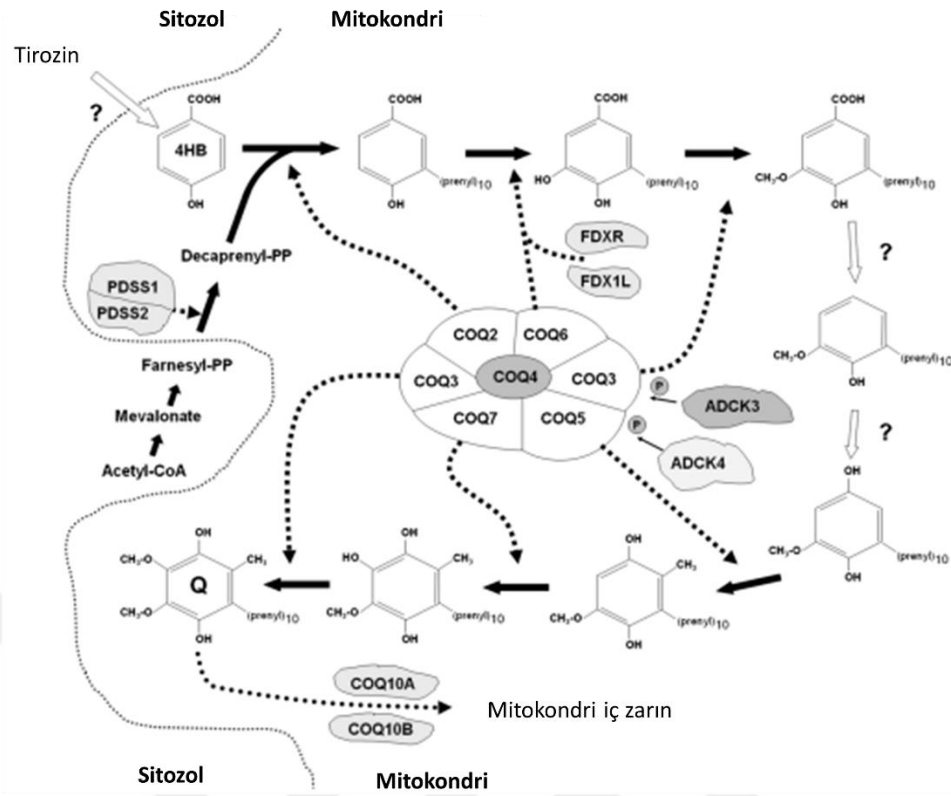
CoQ<sub>10</sub>'un geçirgenlik geçişi gözeneginin (PTP) açıklığını inhibe ederek, mitokondriyal depolarizasyonunu ve ardından sitokrom c salınımını ve apoptozun indüklenmesini önlediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (20, 21).

Hücre kültüründe ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar CoQ<sub>10</sub>'un anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermiştir (22, 23). Fan ve ark. (24) CoQ<sub>10</sub>

takviyesinin CRP, interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi inflamatuvar belirteçleri önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir, ancak kesin kanıt için daha ileri çalışmalara gerek olduğunu vurgulamışlardır. Bir diğer çalışmada metabolik sendromlu hastalarda CoQ<sub>10</sub> takviyesinin inflamatuvar süreci kısmen iyileştirebileceğine dair bulgular elde edilmiştir (25). CoQ<sub>10</sub>'un anti-inflamatuvar etkisinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, nükleer faktör- $\kappa$ B'ye (NF- $\kappa$ B) bağımlı gen ekspresyonunun azaltılması yoluyla anti-inflamatuvar etki gösterebileceği öne sürülmektedir. NF- $\kappa$ B reaktif oksijen türleri (ROS) ile aktive edilebilir ve daha sonra pro-inflamatuvar sitokin ifadesini (TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi) artırır. Bir antioksidan olarak CoQ<sub>10</sub>, serbest radikalleri bloke ederek NF- $\kappa$ B inhibisyonu sağlar ve dolayısıyla anti-inflamatuvar sitokin ifadesi azalır (13).

### 2.2.2. CoQ<sub>10</sub> Biyosentezi

İnsan vücudunda sentezlenen tek lipofilik antioksidan olan CoQ<sub>10</sub>'un biyosentezi, türler arasında yüksek derecede korunmuş en az 16 gen (COQ geni) içeren bir yolak üzerinden gerçekleşir. CoQ<sub>10</sub> sentezi insanda tüm dokularda, mitokondriyal matriks zarında ve endoplazmik retikulumda bulunan bir enzim kompleksi aracılığıyla gerçekleşir. Benzokinon halkası tirozin veya fenilalaninden, izopren yan zincir ise mevalonik asitten elde edilir. Mevalonik asit yolu aynı zamanda kolesterol biyosentezi için gerekli olan bir yolaktır. Benzokinon halkası ve izoprenoid yan zincir COQ2 geni tarafından kodlanan poliprenil-4-hidroksibenzoat transferaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla birleştirilir. Son ürün olan CoQ<sub>10</sub>'un oluşumu en az 6 enzimin sorumlu olduğu (COQ3-8 tarafından kodlanan), C-metilasyon, dekarboksilasyon, hidroksilasyon ve O-metilasyon reaksiyonlarını kapsamaktadır. Ökaryotlarda mitokondri matriksinde gerçekleşen biyosentezin son basamaklarının hız kısıtlayıcı olduğu düşünülmektedir (10, 13, 26) (Şekil 2.2.).



**Şekil 2.2.** Memeli hücresinde CoQ<sub>10</sub> biyosentez basamakları (27).

\*Soru işaretleri henüz tanımlanmamış enzimatik basamakları göstermektedir.

Mayalarda COQ genleri tarafından kodlanan 12 proteinin bu sürece dahil olduğu bilinmektedir. Tablo 2.1.' de *S. Cerevisiae*'da CoQ<sub>10</sub> biyosentezi için gerekli olan genler ve bunların insandaki homologları gösterilmiştir (28), bununla birlikte biyosentez mekanizması halen tam olarak tanımlanmamıştır. CoQ<sub>10</sub>'un endojen sentezi transkripsiyonel ve translasyonel düzeylerde ve sentez basamaklarındaki bazı proteinlerin fosforilasyon/defosforilasyonu ile düzenlenmektedir (29).

**Tablo 2.1.** Maya ve memeli hücrelerinde CoQ biyosentezinde rol oynayan genler.

| <b>S. Cerevisiae</b>                                                          | <b>Homo Sapiens</b>            | <b>Fonksiyon</b>                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b><u>Enzimler</u></b>                                                        |                                |                                                                            |
| <i>COQ1</i>                                                                   | <i>PDSS1</i><br><i>PDSS2</i>   | Prenil difosfat sentaz<br>(Poliizopren zincirin sentezi)                   |
| <i>COQ2</i>                                                                   | <i>COQ2</i>                    | Preniltransferaz<br>(Benzokinon halkası ve izopren zincirin kondensasyonu) |
| <i>COQ3</i>                                                                   | <i>COQ3</i>                    | O-metiltransferaz                                                          |
| <i>COQ5</i>                                                                   | <i>COQ5</i>                    | C-metiltransferaz                                                          |
| <i>COQ6</i>                                                                   | <i>COQ6</i>                    | Monooksijenaz                                                              |
| <i>COQ7</i>                                                                   | <i>COQ7</i>                    | Hidroksilaz                                                                |
| <i>YAH1</i>                                                                   | <i>FDX1L</i>                   | COQ6'ya elektron transferi                                                 |
| <i>ARH1</i>                                                                   | <i>FDXR</i>                    | COQ6'ya elektron transferi                                                 |
| <b><u>Non-enzimatik rolü olanlar</u></b>                                      |                                |                                                                            |
| <i>COQ4</i>                                                                   | <i>COQ4</i>                    | Q kompleksinin stabilizasyonu                                              |
| <i>COQ8</i>                                                                   | <i>ADCK3</i><br><i>ADCK4</i>   | Kinaz benzeri. Diğer Coq proteinlerinin fosforilasyonu?                    |
| <i>COQ9</i>                                                                   | <i>COQ9</i>                    | Lipit bağlayan protein. COQ7'nin kofaktörü?                                |
| <i>COQ11</i>                                                                  | ?                              | Dekarboksilaz?                                                             |
| <b><u>Şaperon/Taşıyıcı</u></b>                                                |                                |                                                                            |
| <i>COQ10</i>                                                                  | <i>COQ10A</i><br><i>COQ10B</i> | CoQ'nun iç mitokondri zarında doğru lokalizasyonu için gerekli             |
| <b><u>CoQ Biyosentezinde Rol oynadığı düşünülen?(henüz kanıtlanmamış)</u></b> |                                |                                                                            |
| <i>MCP2</i>                                                                   | <i>ADCK1</i>                   | ?                                                                          |
| ?                                                                             | <i>ADCK5</i>                   | ?                                                                          |
| <i>YPL109c</i>                                                                | <i>ADCK2</i>                   | ?                                                                          |

\*Koyu yazılan genler primer CoQ eksiklikleri ile ilişkilidir.

### 2.2.3. CoQ<sub>10</sub>'un Kaynakları, Biyoyararlanımı ve Farmakokinetik Özellikleri

CoQ<sub>10</sub> sığır eti, domuz eti, balık, tavuk, ıspanak, brokoli, portakal, çilek, çavdar, buğday gibi birçok hayvansal ve bitkisel kaynaktan bulunur. Diyetle günlük alınan CoQ<sub>10</sub> miktarının 3-5 mg olması yeterli olarak kabul edilir. Diyetle CoQ<sub>10</sub> alımı plazma CoQ<sub>10</sub> düzeylerini artırırken, doku düzeylerini etkilemez. CoQ<sub>10</sub>'un ince

barsaktan absorpsiyonu yavaş olmakla birlikte redükte formu ubikinolün absorpsiyonu 3-4 kat daha hızlıdır ve lipitlerle birlikte alımı absorpsiyonu artırır. Enterositler tarafından emildikten sonra lenfatik dolaşım aracılığıyla plazmaya geçer ve LDL'ye bağlanarak diğer dokulara taşınır. Farklı dokulardaki CoQ<sub>10</sub> düzeyleri farklılık gösterir. Kalp, beyin, böbrek ve kas dokuları gibi metabolizma hızı yüksek olan dokularda CoQ<sub>10</sub> miktarı daha fazladır (11). Ekzojen alınan CoQ<sub>10</sub>'un absorpsiyon ve biyoyararlanımı formülasyona bağlı olarak değişkenlik gösterir. CoQ<sub>10</sub> plazma konsantrasyonu oral yolla alımı takiben 2-6 saat içinde pik yapar (30) ve, eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 33 saattir (31). CoQ<sub>10</sub>, ticari olarak yağ-bazlı, yumuşak jel veya toz-dolu kapsüller ve tabletler gibi çeşitli formülasyonlarda piyasada bulunmaktadır. Son yıllarda CoQ<sub>10</sub>'un çözünürlük ve biyoyararlanımını iyileştirmek için çeşitli formülasyonlar geliştirilmektedir (13).

### **2.3. CoQ<sub>10</sub> Eksiklikleri**

CoQ<sub>10</sub> eksiklikleri, dokularda veya hücrelerde CoQ<sub>10</sub> düzeylerinin azalması olarak tanımlanan, oksidatif fosforilasyon ve diğer mitokondriyal fonksiyonların bozulması ile kendini gösteren nadir bir biyokimyasal bulgudur. Bu klinik tablo primer ve sekonder CoQ<sub>10</sub> eksiklikleri olarak ikiye ayrılır. Primer CoQ<sub>10</sub> eksiklikleri CoQ<sub>10</sub> biyosentez yolağında görevli proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar sebebiyle meydana gelirken, sekonder CoQ<sub>10</sub> eksiklikleri direkt olarak biyosentezde görev almayan genlerde görülen mutasyonlar veya fibromiyalji gibi genetik olmayan faktörler ile ilişkilidir (29, 32).

#### **2.3.1. Primer CoQ<sub>10</sub> Eksiklikleri**

Primer CoQ<sub>10</sub> eksikliği, doğumdan 70 yaşına kadar görülebilen klinik ve genetik açıdan heterojen bir bozukluktur. Hastalığın semptomları fatal yenidoğan multisistem bozukluğundan izole, yetişkin çağı başlangıçlı ensefalopati/nefropatiye kadar değişkenlik gösterir (33). CoQ<sub>10</sub> biyosentez yolağında etkili olan genlerden 9 tanesinde tanımlanan mutasyonların primer CoQ<sub>10</sub> eksikliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. CoQ<sub>10</sub> eksikliği olan hastalarda görülen belirtilerin çoğu diğer mitokondriyal hastalıklar ile ortaktır, ancak SRNS gibi bazı bulgular CoQ<sub>10</sub> eksikliğinin bazı formlarına özgüdür (27).

CoQ<sub>10</sub> biyosentez yolağının genetik hataları üç farklı grupta sınıflandırılabilir. İlk grup *PDSS1*, *PDSS2*, *COQ2*, *COQ6* ve *COQ8B* genlerindeki mutasyonları içerir. Mutasyon sonucunda meydana gelen kusurlar ortak özelliklere sahiptir ve SRNS olarak kendini gösteren renal glomerüler tutulum ile ilişkilidir. SRNS, CoQ<sub>10</sub> eksikliğine özgüdür, çünkü genellikle tübüler disfonksiyon ile ortaya çıkan diğer mitokondriyal hastalıklarda nadiren görülür. SRNS izole bir bulgu olabilir veya diğer nörolojik/sistemik bulgularla birlikte gözlenebilir. Yenidoğan başlangıcı olan veya ciddi formdaki hastalarda SRNS görülmeyebilir veya hastalığın seyri sırasında sonradan gelişebilir (10).

İkinci grup *COQ4*, *COQ7* ve *COQ9* genlerinden oluşur. Bu genlerde mutasyon olan hastalarda SRNS görülmez fakat esas klinik bulgu ensefalomiyopatidir. Diğer bulgular hipertrofik kardiyomiyopati, laktik asidoz ve renal tübülopatidir (34, 35).

Son grup sadece *COQ8A* (*ADCK3*) mutasyonlarından oluşur ve temel klinik bulgu serebellar ataksidir. Bu hastalarda diğer dokularda da CoQ<sub>10</sub> eksikliği olmasına rağmen sadece santral sinir sistemi (SSS) tutulumuna ait bulguların (nöbet, distoni, bilişsel bozukluklar vb.) olması ilginçtir (36, 37).

Bu sınıflandırmanın bazı kısıtlamaları vardır. Birçok gen için bildirilen hasta sayısı azdır, *COQ7* mutasyonunda olduğu gibi bazılarında sadece tek bir aile bildirilmiştir, bu nedenle fenotipik spektrum sanıldığından daha geniştir. Bir diğer nokta, çeşitli gen defektleri arasındaki fenotipik farklılıkların net bir şekilde açıklanamamış olması ve üç grubun her birini karakterize eden belirgin ortak bir biyolojik mekanizmanın bulunmamasıdır. Her bir genin dokuya özgü ifadesi (*COQ8A* ve *COQ8B* gibi) klinik tablodaki farklılıkları tam olarak açıklayamamaktadır. Bazı genlerin CoQ<sub>10</sub> biyosentezi dışında mitokondriyal homeostaz ile ilgili rolleri klinik heterojeniteyi kısmen açıklayabilir (36). Bununla birlikte birçok vakada, altta yatan genetik anormallikler belirsiz kalmıştır; bu da başka genlerin patogeneizde rol aldığını göstermektedir (37).

CoQ<sub>10</sub> eksikliği, genellikle herhangi bir tedaviye yanıtızsız olduğuna inanılan mitokondriyal sitopatiler arasında istisnadır. Bu nedenle, erken tanı ve erken CoQ<sub>10</sub> replasmanı, kalıcı organ hasarını önlemek için çok önemlidir (1, 2, 27, 38).

### 2.3.2. Sekonder CoQ<sub>10</sub> Eksiklikleri

CoQ<sub>10</sub> eksikliği, başka hastalıklara eşlik eden ikincil bir durum olarak da görülebilir. CoQ<sub>10</sub> biyosentezi ile ilgisi olmayan genlerde mutasyon taşıyan ancak kas veya deri fibroblastlarında CoQ<sub>10</sub> eksikliğini gösteren hastalar vardır.

Sekonder CoQ<sub>10</sub> eksikliği ile ilişkisi tartışmalı olan diğer bir durum ise statin grubu ilaçların kullanımına bağlı gelişen miyopatidir. Statinler, hidroksi-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzimini inhibe ederek sadece kolesterolün biyosentezine değil, aynı zamanda CoQ<sub>10</sub>'a da müdahale eder (39, 40). Bununla birlikte, statin kullanımına bağlı miyopati görülen hastalarda kasta CoQ<sub>10</sub> eksikliği geliştiğine dair kesin bir kanıt yoktur ve CoQ<sub>10</sub> takviyesinin kullanımını desteklemek için yeterli veri bulunmamaktadır (33).

### 2.4. COQ8B Geni ile CoQ<sub>10</sub> İlişkisi

#### 2.4.1. COQ8B Gen Mutasyonu ve CoQ<sub>10</sub> Eksikliği

COQ8B geninin, CoQ<sub>10</sub> biyosentezinde rol alan COQ6 ve COQ7 proteinleri ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir. COQ8B mutasyonu olan bireylerde CoQ<sub>10</sub> seviyelerinin azalmış olması bu genin CoQ<sub>10</sub> biyosentezinde rolü olduğunu gösteren bir bulgudur. Ashraf ve ark. (9)'nın yaptığı bir çalışmada COQ8B mutasyonuna bağlı patolojik değişimlerin CoQ<sub>10</sub> takviyesi ile düzelebileceği ileri sürülmüştür. Nefrotik sendrom veya kronik böbrek hastalığı tanısı alan 166 hastanın COQ8B mutasyonu bakımından tarandığı bir çalışmada, mutasyon saptanan hastalara CoQ<sub>10</sub> uygulaması yapıldığında proteinürinin azaldığı ve böbrek fonksiyonlarının korunduğu gözlemlenmiştir (2, 38).

#### 2.4.2. Ekzojen CoQ<sub>10</sub> Takviyesinin Etkisi

Birçok mitokondriyal solunum zinciri bozukluklarının aksine CoQ<sub>10</sub> eksikliği olan hastalar oral CoQ<sub>10</sub> takviyesine yanıt verir. Renal, SSS ve kas semptomları tedaviye olumlu yanıt vermekle birlikte, renal hasar veya SSS hasarının ciddi boyutlara ulaştığı durumlarda CoQ<sub>10</sub> takviyesi etkisiz kalabilir (41). CoQ<sub>10</sub> eksiklikleri haricinde birçok nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalık ile diyabet ve kanserde

oksidatif hasar meydana geldiği için, ekzojen CoQ<sub>10</sub> takviyesi bu hastalıklarda da antioksidan tedavi olarak uygulanabilir (42).

Son yıllarda mitokondriyal hastalığı olan yetişkin insanların yüksek doz ( $\geq 1200$  mg/gün) oral CoQ<sub>10</sub> veya ubikinol takviyesi kullanması önerilmektedir. Çocuklar için bu miktar 5-10 mg/kg/gün'dür. 10 mg/kg'lık bir doz kullanımının ardından 3-4 hafta içerisinde kan plazmasında CoQ<sub>10</sub> düzeyi 10 µg/mL civarında artış gösterir. Primer CoQ<sub>10</sub> eksikliği olan hastalar yüksek doz CoQ<sub>10</sub> takviyesine iyi cevap verebilir, ayrıca sekonder CoQ<sub>10</sub> eksikliği olan bazı hastalarda CoQ<sub>10</sub> takviyesi sonucu semptomların hafiflediği bildirilmiştir (11).

Oral CoQ<sub>10</sub> takviyesinin bilinen ciddi bir yan etkisi bildirilmemiştir, bu nedenle güvenli kabul edilir. Bununla birlikte bulantı gibi bazı hafif yan etkiler rapor edilmiştir (11).

Atmaca ve ark. (2) tarafından yapılan bir çalışmada, *COQ8B* mutasyonu olan adolesanlarda CoQ<sub>10</sub> takviyesinin etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, 11 farklı aileden toplam 28 hastadan oluşan çalışma grubunda hastaların tümünde albuminüri olduğu, 18 hastada kronik böbrek hastalığı (6'sı son dönem böbrek yetmezliği) saptandığı rapor edilmiştir. CoQ<sub>10</sub> uygulamasının ardından tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR) için median değer korunurken, proteinüri önemli ölçüde azalmıştır. Azalan proteinüri 1 hastada gebelik sebebiyle CoQ<sub>10</sub> uygulamasının kesildiği durumda artmıştır. Kullandığı CoQ<sub>10</sub> formülasyonunu değiştiren bir hastada da proteinüri artarken eGFR azalmıştır. Ayrıca, *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen bir çalışmada da *COQ8B*<sup>-/-</sup> podositlerde azalmış migrasyonun CoQ<sub>10</sub> takviyesi ile düzeldiği gösterilmiştir (9). Bu durum mitokondriyal disfonksiyonun veya ROS oluşumunun aktin hücre iskeletinde yaptığı değişikliklerle ilgilidir (2).

*COQ2* mutasyonuna bağlı CoQ<sub>10</sub> eksikliği tanısı konulan 2 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada CoQ<sub>10</sub> takviyesinin uzun süreli etkileri incelenmiştir. SRNS ve ensefalomiyopati gelişen hastaların birine CoQ<sub>10</sub> uygulanması sonucunda, nörolojik tablo iyileşirken böbrek fonksiyonlarında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Semptomlar gelişmeden tanı alan ikinci hastada ise teşhisten hemen sonra nefrotik sendrom ve buna bağlı yaygın ödem gelişmiştir. Renal biyopsi sonucu FSGS olduğu gösterilen bu hastaya diüretikler ile semptomatik tedaviye ek olarak CoQ<sub>10</sub> takviyesine başlanmıştır. Hastanın uzun süreli takibi sonucunda renal fonksiyonların iyileştiği ve

proteinürinin azaldığı gözlemlenmiştir, ayrıca nörolojik muayenesi normal olarak rapor edilmiştir (43). Erken dönemde CoQ<sub>10</sub> takviyesi, renal semptomların iyileşmesi ve nörolojik hasarın önlenmesi açısından önem taşımaktadır (41).

*COQ8B* mutasyonundan kaynaklanan nefropatili iki hasta ile yapılan bir çalışmada, her iki hastaya günlük 15-30 mg/kg dozunda CoQ<sub>10</sub> verilmiştir. Hastalardan ilki proteinüri ve mental gerilik saptanan 9 aylık bebek, ikincisi ise FSGS patolojisi gösteren, steroid ve immünbaskılayıcı tedaviye yanıt vermeyen 11 yaşındaki bir çocuktur. 12 aylık takip sonucunda ilk hastada proteinüri azalmış, serum kreatinin ve kan üre azot düzeyleri normal seviyede kalmıştır. İkinci hastada ise proteinüri devam etmiş, serum kreatinin ve kan üre azot düzeyleri artış göstermiştir. Kronik böbrek yetmezliği teşhisi konulan bu iki hasta 12 ay süreyle takip edildikten sonra ilk hastada GFH normal seyrederken ikinci hasta evre 2 kronik böbrek yetmezliğine ilerlemiştir. Bu bulgular ışığında hastalığın erken teşhis edilmesinin ve tedaviye erken başlanması, hastaların CoQ<sub>10</sub> takviyesinden yarar sağlayabilmesi için gerekli olduğu gözlenmiştir (1, 2, 38, 44).

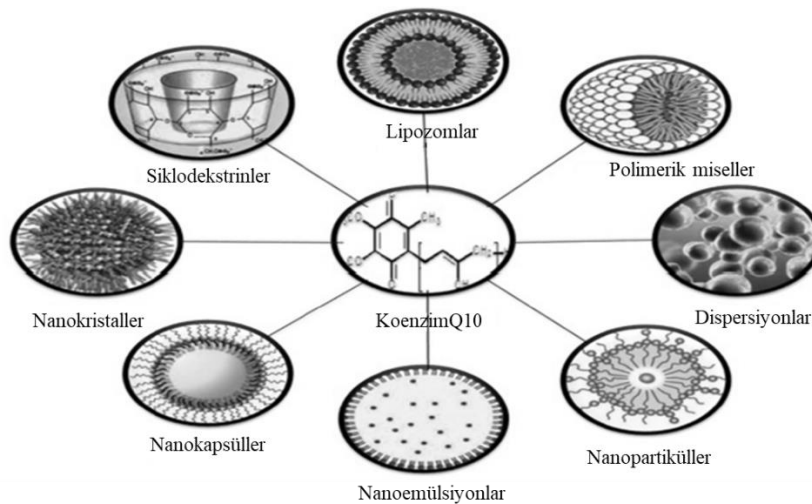
Deneyisel bir model olan tip 2 diyabet modelinde (db/db fareleri) CoQ<sub>10</sub> albuminüri ve mitokondriyal değişiklikleri iyileştirmiştir (45, 46). Ek olarak, *COQ8B* mutasyonu olan bir hastanın CoQ<sub>10</sub> takviyesi ile elde ettiği olumlu tedavi sonuçları da rapor edilmiştir (6). Yüksek doz oral CoQ<sub>10</sub> takviyesi ensefalopatinin ilerlemesini durdurabilir (46) aynı zamanda da *COQ2* (42), *COQ6* (47) ve *COQ8B* (9) mutasyonu olan hastaların renal bulgularının ilerlemesini yavaşlatabilir veya tamamen durdurabilir. *COQ4* mutasyonu olan bir hastanın kas bulguları CoQ<sub>10</sub> takviyesinden sonra önemli derecede iyileşmiştir (48) ve tedavinin kesilmesi ile semptomlar alevlenmiştir. *PDSS2* mutasyonlu farelerden elde edilen veriler CoQ<sub>10</sub> takviyesinin olumlu etkisini desteklemektedir (49). Bunun aksine, idebenon gibi antioksidan özellikli ancak mitokondriyal solunuma etkisi olmayan kinon analogları tedavide etkili değildir (50, 51). CoQ<sub>10</sub> takviyesi ile hastalığın ilerlemesini durdurmak mümkün olsa da böbrekler ve SSS'de oluşan hasarlar geri dönüşümsüz olduğundan tedaviye mümkün olduğunca erken başlanması gerekmektedir (1, 2, 38, 43).

Endojen sentezin yeniden aktive edilmesi umut verici bir tedavi stratejisidir, çünkü endojen olarak üretilen CoQ<sub>10</sub> ilgili hücre kompartmanlarına yeterli konsantrasyonda ulaşırken ekzojen destekle alınan CoQ<sub>10</sub>'un kimyasal özellikleri

nedeniyle biyoyararlanımı düşüktür ve yaygın doku dağılımı gösterir, dolayısıyla terapötik dozda mitokondriye ulaşması mümkün olmamaktadır (33). Ticari olarak piyasada bulunan CoQ<sub>10</sub> içerikli formülasyonlar etkinlik ve biyoyararlanım açısından eşdeğer değildir. Bunlara ek olarak terapötik amaçla CoQ<sub>10</sub> kullanımındaki temel hedef CoQ<sub>10</sub>'un plazma düzeyinin belirli aralıkta tutulması gerekliliği değil mitokondriye ulaşan konsantrasyonunun etkin olmasıdır. Mitokondrilere ulaşan miktar arttıkça etkinlik de artmaktadır. Ancak mitokondrilere ulaşan miktarı ölçmek kolay değildir. Bu nedenle CoQ<sub>10</sub>'un spesifik olarak mitokondrilere hedeflenip doku dağılımını azaltıp, mitokondrilere ulaşan CoQ<sub>10</sub> miktarını artırmak en etkili yoldur. Bütün bunlar göz önüne alındığında mitokondrilere aktif olarak hedeflenmiş yaklaşımlar tedavide kilit rol oynama potansiyeline sahiptir.

### 2.5. CoQ<sub>10</sub> Yüklü İlaç Taşıyıcı Sistemler

Farklı biyoyararlanıma sahip yumuşak-jel kapsül, toz dolu kapsül, oral sprey veya tablet gibi farmasötik dozaj formlarında konvansiyonel CoQ<sub>10</sub> formülasyonları ticari olarak piyasada mevcuttur. Yüksek molekül ağırlığı (863 kDa) ve sudaki zayıf çözünürlüğü nedeni ile CoQ<sub>10</sub>'un oral uygulama sonrası gastrointestinal sistemden absorpsiyonu zayıftır. İlacın biyoyararlanımı artırmak amacıyla son yıllarda CoQ<sub>10</sub> taşıyıcı yeni sistemler geliştirilmektedir. Geliştirilen yeni sistemler ayrıca CoQ<sub>10</sub>'u doğrudan belirli organellere hedeflemeyi amaçlamaktadır. Literatürde yer alan CoQ<sub>10</sub> içeren terapötik sistemler Şekil 2.3.'te şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. CoQ<sub>10</sub> içeren taşıyıcı sistemler (52).

### 2.5.1. Lipozomlar

Lipozomlar nano- veya mikro- boyutlarda olabilen, iki veya daha çok tabakalı, lipid türevi biyobozunur nanomateryallerdir. Lipid çift tabaka ile çevrili bir çekirdeğe sahip olan küresel lipozomlar hidrofilik ve hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu amacıyla kullanılabilir. Lipozomlar amfifilik yapıları sayesinde hücre zarı ile birleşerek taşıdıkları molekülü rahatlıkla sitoplazma içerisine salabilirler (53). Uygun hedefleme ajanlarının lipozom yüzeyine konjugasyonu ile ilaç hedeflendirmesi yapılabilir (54). Hazırlama yöntemine göre, CoQ<sub>10</sub> içerikli lipozomların boyutları 40 nm ile 200 nm arasında olabilir. Diğer nanosistemler ile karşılaştırıldığında, lipid çift tabakaları sayesinde lipozomlar hücre membranını kolayca geçerek CoQ<sub>10</sub> içeriklerini mitokondriye taşıyabilirler. Ancak nanolipozomlar, stabilitelerinin iyi olmaması, oksijen ve metal iyonlarına karşı dirençsiz olma gibi dezavantajlara sahiptir. Polisakkaritler ve bazı küçük moleküller ile çeşitli yüzey modifikasyonları yapılarak lipozomların fiziksel ve kimyasal stabiliteleri artırılabilir (55).

### 2.5.2. Polimerik Nanopartiküller

Biyouyumlu ve biyobozunur polimerler kullanılarak sentezlenen polimerik NP'ler ilaç hedefleme sistemleri arasında en umut vaat eden taşıyıcılardır. Hidrofobik ve hidrofilik polimerlerin birleşmesiyle oluşturulan blok polimerler hem suda çözünen hem de yağda çözünen ilaçların taşınmasını sağlar. Polimerik NP'ler yüksek stabiliteleri ve kontrollü ilaç salımı yapabilme gibi özelliklerinden dolayı lipozomal taşıyıcı sistemlere kıyasla avantajlıdır. En yaygın kullanılan hidrofobik polimerler poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polikaprolakton (PCL)'dur ve en yaygın kullanılan hidrofilik polimer ise Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı polietilen glikol (PEG)'dur. PEG, partiküllerin suda çözünürlüğünü sağlayarak dolaşımda kalış sürelerini uzatır, ayrıca ilaçların belirli bir hücre tipine veya organelle hedeflenebilmesi için kullanılan hedefleme ajanları için yüzey modifikasyonuna olanak sağlayacak şekilde zemin oluşturur. Bu özellikleri nedeniyle birçok ilacın enkapsülasyonunu ve istenen boyutta partikül hazırlanmasını mümkün hale getiren polimerik NP'ler, mitokondriye ilaç hedeflendirme çalışmalarında ilk sırada tercih edilen polimerik NP'lerdir (56).

CoQ<sub>10</sub> içeren PLGA NP'ler, yağ bazlı formülasyonlara kıyasla UV ışın ve sıcaklık gibi faktörlere karşı daha dayanıklıdır. Hipertansiyon modeli oluşturulmuş hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda polimerik NP'lere yüklenen CoQ<sub>10</sub>, CoQ<sub>10</sub> süspansiyonu ve ticari CoQ<sub>10</sub> preparatı ile karşılaştırıldığında çözünürlük ve biyoyararlanım açısından daha etkili bulunmuştur (57). Sürfaktan kullanılmadan nanopresipitasyon metodu ile hazırlanan PLGA-NP'ler antioksidan terapide kontrollü ilaç salımı sağlaması açısından umut vericidir (58). Hücre kültüründe yapılan çalışmalarda CoQ<sub>10</sub> yüklenerek hazırlanan PLGA-NP'lerin (<100 nm), ROS'ları etkisizleştirmede serbest CoQ<sub>10</sub>'a göre 10 kat daha etkili olduğu ve oral biyoyararlanımın da serbest CoQ<sub>10</sub>'a göre 4.28 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Pozitif yüklü bu NP'lerin iki ana ROS kaynağı organel olan mitokondri ve lizozomda lokalize olduğu gösterilmiştir (59). Tüm bu çalışmalara dayanarak PLGA temelli NP'lerin CoQ<sub>10</sub> için iyi bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu sonucuna varılabilir.

### 2.5.3. Polimerik Miseller

Polimerik miseller hidrofobik çekirdek ve hidrofilik kabuğa sahip, 20-100 nm boyut aralığında, kendiliğinden oluşma özelliğine sahip kolloidal partiküllerdir. Bu nanotaşıyıcılar suda çözünürlüğü az olan ilaçların salım profillerini modifiye ederek enkapsüle etmek için kullanılırlar. Ayrıca, yüksek ilaç yükleme kapasitesi sağlarlar, yüklenen ilacın biyoyararlanımını iyileştirebilirler, yan etkilerini azaltıp stabilitesini arttırabilirler (60). CoQ<sub>10</sub> içeren polimerik miseller, ilacın çözünürlüğüne ve stabilitesine katkıda bulunur (61, 62). Sharma ve ark. (63) PCL ve PEG polimerleri ile CoQ<sub>10</sub> yüklü polimerik miseller formüle etmişlerdir. Bu multifonksiyonel miktoarm temelli nano-taşıyıcı sistem, mitokondriotropik bir molekül olan trifenilfosfonyum (TPP) iyonunun polimerlerin arasına yerleştirilmesiyle mitokondriye CoQ<sub>10</sub>'un aktif hedeflenmesini sağlamıştır. İlaç yükleme etkinliği, boyut ve stabilitesi, antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği değerlendirildiğinde bu yeni formülasyonun ilaç kaybını en aza indirerek CoQ<sub>10</sub> taşınması için uygun bir taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir.

### 2.5.4. Katı Lipit Nanopartiküller

Katı lipit nanopartiküller (SLN'ler); vücut ısısında katı halde olan biyoyuymulu/biyobozunur lipit matriksten meydana gelen, 100-400 nm boyut

aralığında kolloidal sistemlerdir. Bu nanotaşıyıcı sistemlerin avantajları kullanılan ham maddelerin ucuz olması, biyoyumluluklarının ve fiziksel stabilitelerinin iyi olması, boyutlarının ayarlanabilir olması ve etken maddenin kontrollü salımını sağlamasıdır (64). CoQ<sub>10</sub>'un lipofilik yapısından dolayı SLN'ler CoQ<sub>10</sub> için iyi bir taşıyıcı sistemdir. CoQ<sub>10</sub>'un SLN içine yüklenmesi, ilacın suda dağılımını ve enkapsülasyonunu artırır. CoQ<sub>10</sub>'un etkisinin değerlendirildiği hayvan deneylerinde, SLN içine yüklü CoQ<sub>10</sub>'un biyoyararlanımı oral yolla verilen CoQ<sub>10</sub>'a göre 3 kat daha fazladır (65). SLN'lerin bu avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da vardır. Lipit fazın katı halde kalabilmesi için belli bir kristalizasyon derecesi gereklidir; bu kristal yapı CoQ<sub>10</sub>'in enkapsülasyonu için sınırlı alan bırakır ve bu da ilacın enkapsülasyon etkinliğini düşürür. NP'lerin saklama süreci boyunca kristalizasyon daha düzenli hale gelir ve böylece CoQ<sub>10</sub> molekülleri sıkışarak nihayetinde partiküllerden sızmaya başlar (55).

#### **2.5.5. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar**

İkinci nesil SLN'ler olarak kabul edilen nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLT), SLN'lerin eksik yönlerini gidermek amacıyla geliştirilmiştir. NLT'ler katı lipit yerine yarı-katı veya yarı-sıvı lipitler kullanılarak yapılır, böylelikle lipitler daha düzensiz bir yapı oluşturur ve etken madde için daha fazla alan kalır. Bu sayede ilacın enkapsülasyon etkinliği artar ve saklama süresi boyunca partiküllerden ilacın salınması engellenmiş olur (66). CoQ<sub>10</sub>'un NLT'ler ile taşınması ilacın biyoyararlanımı artırır ve organizmada endojen kaynaklı oksijen radikallerini etkili bir şekilde elimine eder. NLT ve SLN'lerin ana yapısı lipitlerden meydana geldiği için oral uygulamadan sonra metabolizmaları güvenlidir. NLT'ler çok küçük boyutta partiküller olduğu için hücre membranından kolayca geçerler ve aktif içeriklerini hedef hücreye ulaştırırlar. SLN'ler, nano-emülsiyonlar ve lipozomların geçirgenlik, kolay dağılma, yüksek enkapsülasyon oranı ve yükleme etkinliği gibi avantajlarına sahip olan NLT'ler gelişime açık, umut vaat eden nano-taşıyıcı sistemlerdir (55).

#### **2.5.6. Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen Sistemler**

Kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemler (SEDDS) yağ, sürfaktan, bazen kosürfaktan içeren, su ile yavaşça karıştırıldığında yağ/su emülsiyonu oluşturabilen

izotropik karışımlardır. Bu sistemler ilacın çözünürlüğünü artırma ve hızlandırma, ilacın lenfatik dolaşıma geçişini artırma ve p-gp akışı “by-pass” ederek gastrointestinal sistemden ilaç absorpsiyonunu artırma gibi özellikleri nedeniyle dikkat çekicidir. SEDDS’ler, CoQ<sub>10</sub> gibi hidrofobik ve biyoyararlanımı düşük olan aktif içeriğin formülasyon problemlerinin giderilmesi için kullanılır (67). Bununla birlikte, çoğunlukla sıvı olarak hazırlanan SEDDS’ler, sert jelatin kapsüllere doldurulduğunda, stabilite problemleri ve ilaç sızıntısı gözlenebilmesi gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu sınırlamaları aşmak için, sıvı halde hazırlanan SEDDS’lerin katı gözenekli taşıyıcılara adsorbe edilmesi alternatif bir yaklaşım olarak önerilmektedir (68).

### 2.5.7. Siklodekstrinler

Siklodekstrinler,  $\alpha$ -1,4-glikozidik bağlarla birleştirilen glukoz birimlerinden oluşan siklik oligosakkaritlerdir. Yapısal olarak, lipofilik bir boşluk ve hidrofilik dış yüzeyden oluşurlar. Hidrofobik ilaçların çözünürlüğünün arttırılmasını sağlayan umut verici taşıyıcılardır. İlaç araştırma geliştirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, siklodekstrinlerin lokal ve sistemik toksisite gösterdikleri rapor edilmektedir (69). Siklodekstrin kompleksleri ayrıca gıdalarda ve farmasötiklerde CoQ<sub>10</sub>’un çözünürlüğünü iyileştirme amaçlı kullanılır (70).

### 2.6. Mitokondriye Hedeflendirilmiş Nanopartiküler Sistemler

Hücrelerin enerji üretimini sağlamada ve birçok metabolik süreçte önemli rol oynayan mitokondriler, çoğu ökaryotik hücrede bulunan kompleks organellerdir. Mitokondriler başta ATP üretimi olmak üzere, aminoasit biyosentezi, spesifik iyon tamponlama, ROS yönetimi, apoptoz yolağının başlatılması gibi birçok fonksiyona sahiptir. Mitokondriyal fonksiyon bozuklukları ile ilişkili hastalıkların ortaya çıkmasını takiben diyabet, kanser, Alzheimer, Parkinson ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patolojik problemin mitokondriyal disfonksiyonlarla ilişkisi olduğu saptanmıştır. Bu nedenle doğrudan mitokondriye hedeflendirilmiş terapötik sistemler bu hastalıkların tedavisinde avantaj sağlar. Bununla birlikte mitokondrinin sahip olduğu kompleks yapı nedeniyle terapötik ajanların direkt mitokondriye hedeflendirilmesinde çeşitli güçlükler söz konusudur. Mitokondriler dış mitokondri membranı, iç mitokondri membranı, membranlar arası boşluk ve matriks olmak üzere

4 bölümden oluşur. Dış membran nispeten geniş porları sayesinde terapötik maddelerin pasif difüzyonla geçişine imkan sağlayan yapıdadır. Bunun yanı sıra birçok ilaç molekülü çok küçük porlara sahip iç membranı geçemez ve matrikse ulaşamaz. İç membranın kardiyolipin bakımından zengin ve -160 mV ile -180 mV arasında değişen yüksek negatif potansiyele sahip yapısı, küçük moleküllerin geçişini zorlaştırır (56). İç membran, ETZ ve ATP sentezine katılan kompleks I (NADH dehidrogenaz), kompleks II (süksinat dehidrogenaz), kompleks III (sitokrom bc1), kompleks IV (sitokrom c oksidaz) ve kompleks V (ATP sentaz) gibi protein yapılı birçok birimi barındırır (71). Bu karakteristik özellikleri sayesinde mitokondri apoptoz mekanizması aracılığı ile hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu nedenle çeşitli hastalıkların tedavisinde mitokondrinin hedeflenmesi önemli bir avantaj sağlayabilir. Mitokondriye hedeflendirilmiş küçük molekül ağırlıklı bazı moleküller literatürde yer almaktadır ancak *in vivo* uygulamada genellikle bu moleküller farmakokinetik açıdan zayıf özellik gösterirler ve biyodağılımları iyi değildir (56).

Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler terapötik ajanların farmakokinetik özelliklerinin ve biyodağılımlarının iyileştirilmesi ile belirli bir dokuya/hücreye/organelere hedeflendirilmesine olanak sağlamıştır. Ancak, mitokondriye ilaç hedeflendirilmesinde ve nanoteknolojinin mitokondri ilişkili patolojilerde uygulanmasında halen eksiklikler mevcuttur. Bunun muhtemel sebepleri arasında hücreye hedeflenen aktif içeriğin mitokondriye ulaşana kadar hücre içi bileşenlerle etkileşime girmesi yer almaktadır. Nanoteknoloji alanında kullanılan aktif hedeflendirme ajanları ile özellikle düşük molekül ağırlığa sahip terapötik ajanların terapötik etkinliklerinin artırılması da mümkün olmaktadır. Nanoformülasyonların ayrıca aktif içeriğin bozulmadan korunması, yarı ömrünün uzatılması, yan etkilerinin ve immunojenitesinin azaltılması, hidrofobik ilaçların suda çözünür hale getirilebilmesi gibi avantajları vardır. Nanoformülasyonlarda kullanılan aktif hedefleme ajanları, aktif içeriğin hedeflenen dokuya, hücreye ya da organelere etkili bir biçimde ulaşması için modifiye edilebilir. Mitokondri matriksine aktif hedefleme yapabilmek ve NP'den mitokondrinin farklı kompartmanlarına salınan madde miktarını kontrol altında tutabilmek için, hedefleme ajanı olarak kullanılacak

molekölün de uygun boyut, lipofilik yüzey, uygun yüzey yükü gibi belirli özelliklere sahip olması gerekir (56).

## **2.7. Mitokondri Fonksiyonunun Belirlenmesi Amacıyla Kullanılan DeneySEL Yaklaşımlar**

Literatürde mitokondri fonksiyonunu belirleyebilmek amacıyla kullanılan parametreler arasında mitokondrinin fizikokimyasal özellikleri (pH ve redox potansiyeli gibi), metabolitleri, kofaktörleri, enzimleri yer alır. Son yıllarda bu parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Selektif mitokondri boyaları ve biyosensörler çoğunlukla hücrenin fizikokimyasal özelliklerini değerlendirmek için kullanılır. İzotop işaretleme ve kolorimetrik analiz mitokondri metabolitleri ile kofaktörlerinin konsantrasyonlarının belirlenmesinde başvurulan yöntemlerdir. Farmakolojik araçlar, RNA interferans (RNAi) gibi genetik yöntemler veya proteomik, metabolomik, transkriptomik gibi omik teknolojiler mitokondri fonksiyonlarının belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemlerdir (72).

### **2.7.1. Mitokondriyal Respirometri**

Mitokondri tarafından tüketilen oksijen oranının ölçülmesine dayalı bir yöntem olan mitokondriyal respirometri, mitokondri fonksiyonlarını ve metabolizmasını incelemek için kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Bu yöntem ile belirli koşullar altında mitokondri tarafından kullanılan oksijen miktarı ölçülür ve çeşitli oksijen sensörleri kullanılarak kayıt edilir. Respirometri; oksidatif fosforilasyon, mitokondri membran potansiyeli ve yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu düzeyini belirlemek için kullanılır. Bunun dışında respirometri, metabolik fluks analizi ile kombine edilerek mitokondri metabolizmasını aydınlatmak için de kullanılabilir (72).

### **2.7.2. Mitokondri Membran Potansiyelinin Ölçülmesi**

Mitokondri membranını geçebilen, lipofilik, katyonik ve floresan özellikteki boyalar mitokondri matriksinin negatif membran potansiyeli nedeniyle matrikste birikir. Bu boyaların matrikste birikimi, ATP üretimini yansıtan mitokondri membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ) ile doğru orantılıdır, burdan korelasyonla mitokondri metabolizması hakkında bilgi elde edilir (72).  $\Delta\Psi_m$ 'nin her 10 mV'luk artışı ATP

üretiminin yaklaşık iki katına çıkması anlamına gelir. Rodamin 123, tetrametil rodamin trimetilester (TMRM), JC-1 gibi floresan özellikteki boyalar *in vivo* mitokondriyal membran potansiyelinin ölçülmesinde kullanılır (73).

### 2.7.3. Biyosensörler

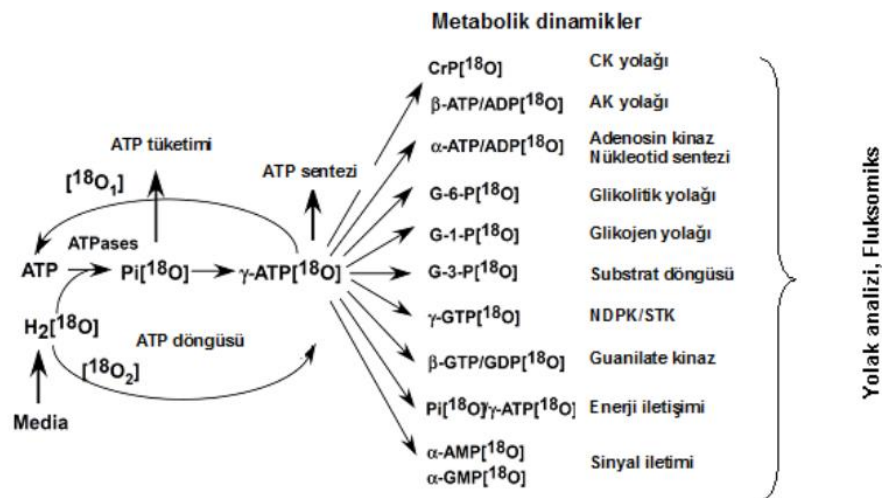
Hücreler tarafından genetik olarak kodlanmış intrinsik biyosensörler, biyolojik yanıtları saptanabilir sinyallere (renk değişimi, lüminesans, floresans gibi) dönüştüren RNA veya protein temelli analitik araçlardır. Floresan sinyal veren protein temelli biyosensörler mitokondri metabolizmasını belirlemek için yaygın olarak kullanılırlar. Bu biyosensörler, raportör olarak görev yapan bir floresan proteine kaynaşmış bir ligand bağlayıcı protein veya peptit içerir. Hedef metabolit veya iyon, ligand bağlanma alanına bağlandığında kaynaştırılmış raportörün floresanında değişime neden olan konformasyonel bir değişikliği indükler. Mitokondri fonksiyonlarını belirleyebilmek için mitokondrinin fizyolojik durumunu ve metabolit düzeylerini yansıtan çeşitli biyosensörler kullanılır (74).

### 2.7.4. Fluksomik Analizler

Fluksomik analizler (metabolik fluks analizleri), kararlı izotoplarla işaretleme yapılarak metabolik yollardaki metabolitlerin ve ara ürünlerin üretim ve tüketim hızlarını ölçmek için kullanılan güçlü bir tekniktir (75). Fluksomik analizlerde kararlı izotoplar ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ve  $^{18}\text{O}$ ) ile metabolit derişimleri ve döngü hızları eş zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Bu analizlerde farklı yollar için farklı kararlı izotoplar kullanılmaktadır. Fakat  $^{13}\text{C}$  ve  $^{15}\text{N}$  ile yapılan fluksomik analizler özellikle yaşam faaliyetlerinin vazgeçilmezi olup, canlı organizmaların metabolomunda bulunma sıklığı bakımından önemli olan inorganik fosfatın yer aldığı hücrenin enerji döngüleri, dolayısıyla da mitokondri hakkında bilgi veremezler (76-80). Öte yandan  $^{18}\text{O}$  ile yapılan işaretleme  $^{13}\text{C}$  ve  $^{15}\text{N}$  izotop işaretlemelerine göre daha kısa sürede yapılır ve işaretleme dakikalar içinde tamamlanır. Bu da deneylerin istenilen düzeyde tekrarlanmasını ve uygulama kolaylığı sağlar (79).

Kararlı izotop  $^{18}\text{O}$  temelli işaretleme yöntemi ile metabolit derişimlerinin yanı sıra döngü hızları da hesaplanabilmektedir (78, 79). Diğer işaretleme ajanlarına göre çok daha hızlı olan  $^{18}\text{O}$ , özellikle enerji ve sinyal iletiminden sorumlu olan

fosfotransfer ağlar ve fosforil metabolik dinamiklerin izlenmesi açısından eşsizdir (81-87). Bu analizler özellikle mitokondri fonksiyonunun belirlenmesinde kilit rol oynamaktadır. Doğal ve kararlı bir izotop olan  $^{18}\text{O}$  ile yapılan işaretlemeler için  $^{18}\text{O}$  bakımından zenginleştirilmiş su ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) kullanılır. Doku ya da hücreler,  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  içeren ortama maruz kaldıklarında,  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  hızlı bir şekilde hücresel su ile dengeye ulaşır ve ATP'nin hidrolizi sırasında her seferinde  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  deki  $^{18}\text{O}$ 'ın inorganik fosfata dahil olmasıyla inorganik fosfatın işaretlenmesi sağlanır.  $^{18}\text{O}$ 'ın fosfat ile birleşmesi sadece enzimatik koşullarda gerçekleşir ve birleşen  $^{18}\text{O}$  yüzdesi enzimin aktivitesiyle doğru orantılıdır. Böylece  $^{18}\text{O}$  işaretlenmiş inorganik fosfat ilgili enzimatik reaksiyonların oranına bağlı olarak diğer fosfat içeren bileşiklerin işaretlenmesi ve ilgili enzimin döngü hızı ve döngü sayısı hesaplanabilmektedir (84, 88, 89) (Şekil 2.4.).

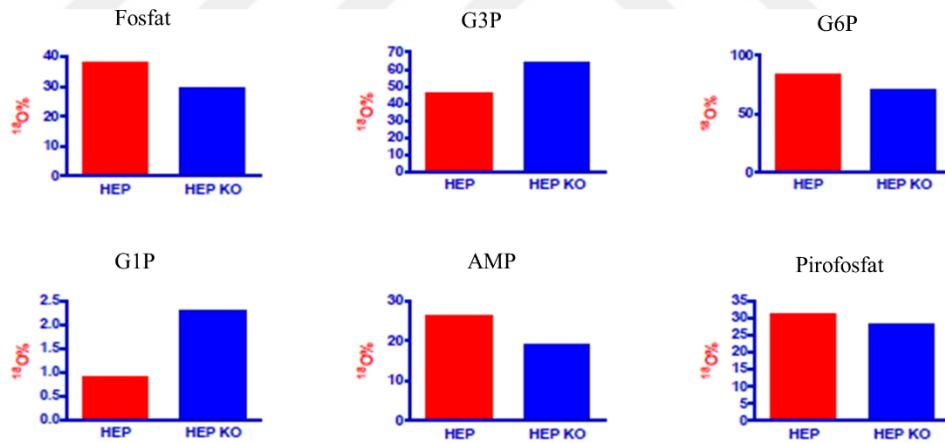


**Şekil 2.4.**  $^{18}\text{O}$  işaretleme mekanizmasının ve işaretlenen metabolitlerin hangi yolak analizlerinde kullanıldığının şematik gösterimi.

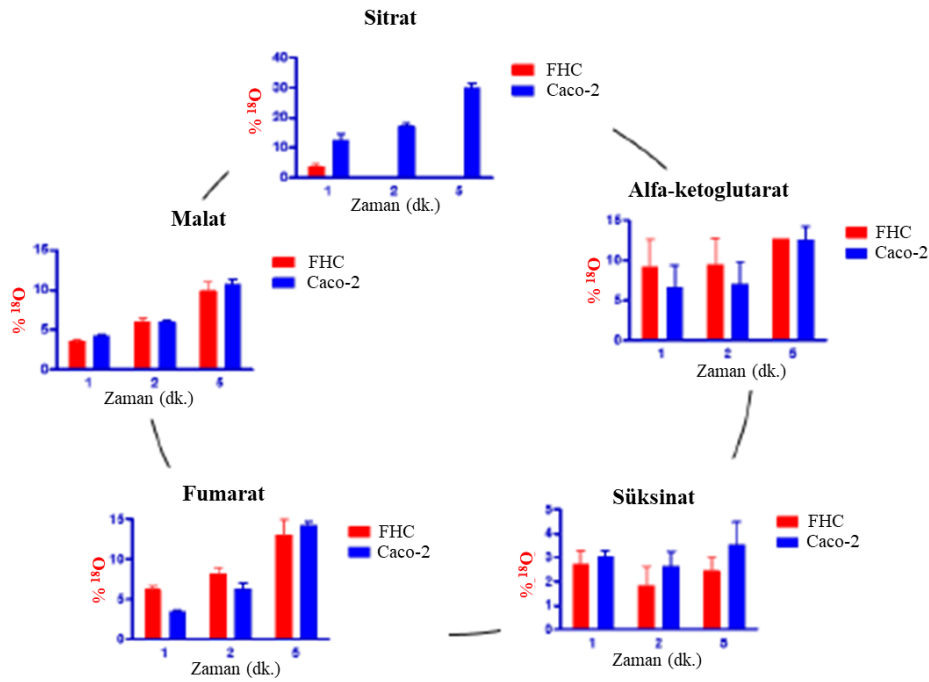
Glukoz-1-fosfat (G1P), glukoz-3-fosfat (G3P), glukoz-6-fosfat (G6P), inorganik fosfat ( $P_i$ ), adenozin monofosfat (AMP), adenozin difosfat (ADP), ATP ve guanozin trifosfat (GTP) gibi metabolitlerin  $^{18}O$  ile işaretlenmesi ilkesi temelinde gerçekleştirilen analizler insan ve transgenik hayvan modellerinde kullanılmıştır (77-79, 90-93). Bu çalışmalar,  $^{18}O$  izotopunu kullanılarak yapılan metabolomik ve yolak analizleri ile genetik hastalıklar, kanser miyokardiyal iskemi, kalp yetmezliği ve nörodejeneratif hastalıklar gibi enerji ve metabolizma dengesizliği sonucu ortaya çıkan hastalıkların, patogenezlerinin aydınlatılması, erken teşhisi ve bu hastalıklardaki tedavi etkinliğinin belirlenmesinde fluksomik analizlerinin kullanılabileceği

gösterilmiştir (77-79). Dzeja, Nemutlu ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada (yayınlanmamış veri) bir mitokondri enzimi olan adenilat kinaz 2 izomer enzimini kodlayan genin susturulduğu (AK2<sup>-/-</sup>) insan epitel hücre (HEP KO) hattı ile normal hücre hattı (HEP) enerji dinamikleri açısından kıyaslandığında iki hücre arasında farklılık olduğu saptanmıştır (Şekil 2.5.). Bu metabolitlerden P<sub>i</sub>, AMP, G6P ve bifosfat işaretlenme yüzdeleri AK2<sup>-/-</sup> hücre modellerinde düşerken, G3P ve G1P'nin işaretlenme yüzdeleri artmıştır. Bu da yeterli mitokondri fonksiyonu olmayan AK2<sup>-/-</sup> hücre hattının enerji açığını kapatmak için G3P ve glikojenezi aktive ederek kapatmaya çalıştığı yorumu ile açıklanabilir. Ayrıca Nemutlu ve diğerleri (yayınlanmamış veri) insan kolon karsinoma (Caco-2) ve fetal insan kolon (FHC) hücre hatlarında Krebs döngüsünün hesaplanmasında ve mitokondri fonksiyonları ile ilişkilendirilmesinde fluksomik analizi kullanılmıştır (Şekil 2.6.).

Hücre kültürü düzeyinde yapılan fluksomik analizler ile herhangi bir ilaç tedavisi öncesi ve sonrasında mitokondri fonksiyonları değerlendirilerek hücre enerji metabolizmasının nasıl değiştiği hakkında bilgi sağlanabilir.



**Şekil 2.5.** Normal (HEP) ve AK2<sup>-/-</sup> transgenik (HEP KO) hücre modellerinde farklı metabolitlerin <sup>18</sup>O ile işaretlenme yüzdeleri.



**Şekil 2.6.** Caco-2 ve FHC hücre hatlarında Krebs döngüsünün  $^{18}\text{O}$  ile işaretlenme yüzdeleri

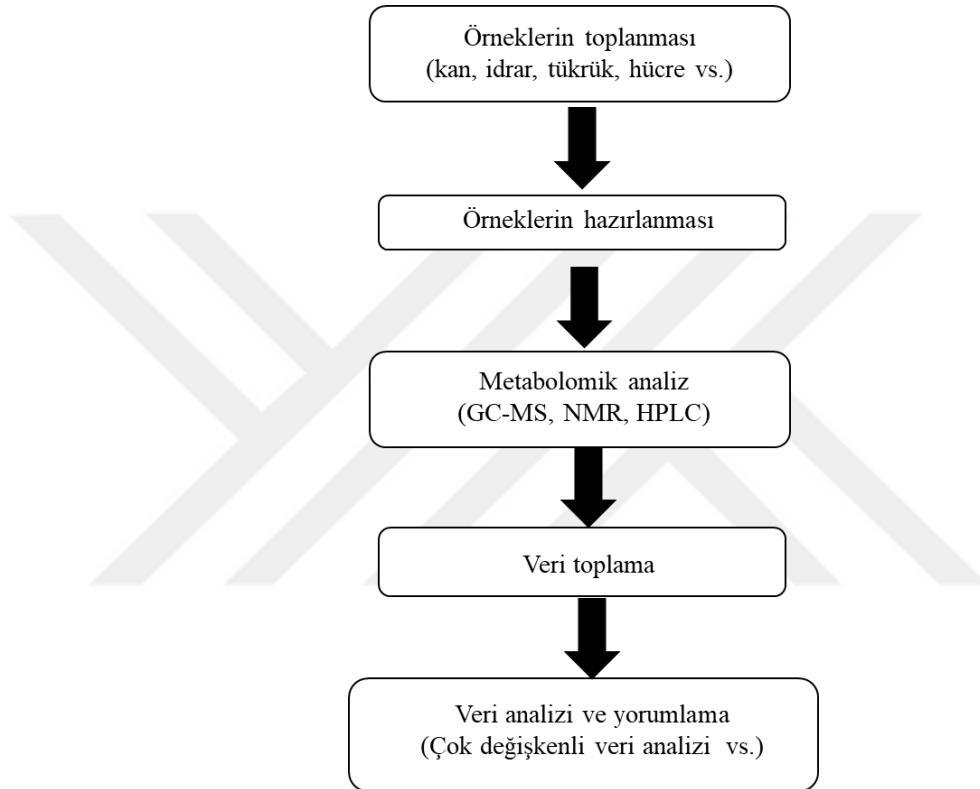
### 2.7.5. Metabolomik Analizler

Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılar gibi biyolojik numunelerde küçük moleküllü metabolitlerin (<1500 Da) yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır (94).

Son yıllarda hızla gelişen metabolomik çalışmalar hücrelerde, dokularda, organlarda ve biyolojik sıvılarda bulunan tüm metabolitlerin çalışıldığı bir disiplindir. Daha önceki analitik yöntemlerden farklı olarak metabolomik, biyolojik bir numunedeki binlerce küçük moleküllü aynı anda nicelleştirebilen araçları kullanır. Bu analitik yetenek daha sonra milyonlarca veri parçası arasında moleküler bir sinyali tanımlayabilen karmaşık matematiksel araçlarla birleştirilir. Metabolomik çalışmalar ile hastalık mekanizmaları ve ilaçların etkisi ile ilgili bilgiler elde edilebilir ve bunlar metabolik yollarla ilişkilendirilir (95).

Tipik bir metabolomik çalışma, Şekil 2.7.'de şematik olarak gösterilmektedir. İlgilenilen numuneler (örneğin plazma, idrar veya hücre kültürü örneği vs.) toplanır. Küçük moleküller numuneden çıkarılır ve ilgili molekülleri ayıran ve nicelleştiren

teknikler kullanılarak analiz edilir. Bu analitik teknikler, sıvı ve gaz kromatografisi, kütle ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ve elektrokimyasal algılamalı sıvı kromatografisini içerir. Tanımlanan metabolit sayısını artırmak ve/veya toplanan metabolit bilgilerini genişletmek için bu tekniklerin kombinasyonları da kullanılabilir. Elde edilen veri setleri gerekli düzeltmeler yapıldıktan sonra bir veya daha fazla yazılım paketi tarafından analiz edilir (95).



**Şekil 2.7.** Metabolomik analiz basamakları.

Metabolomik analizlerde yöntem ve yazılım seçimi çalışmanın amacına ve içeriğine göre değişmektedir. Örneğin; gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) lipidomik analizlerde, sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS) genellikle mümkün olan en büyük biyokimyasal profili elde etmek için ve NMR, toksikoloji çalışmalarında kullanılmaktadır. Benzer bir şekilde, farklı yazılım paketleri, her çalışma için farklı soruları ele almak üzere tasarlanmış özel araçlar içerir.

Mitokondri ile ilişkili hastalıkların incelenmesi ve tanı yöntemlerinde karşılaşılan bazı sınırlamaları aşmak için son yıllarda metabolomik çalışmalar mitokondriyal hastalıkların araştırılmasında kullanılan bir yöntem olmuştur. Kalıtsal metabolik hastalıkların teşhisinde spesifik bazı metabolitlerin ölçülmesinden

yararlanılabilmektedir. Metabolitlerin konsantrasyonlarının değişmesi spesifik enzim defektleri ile sonuçlanabilir. Bu nedenle biyolojik numunelerde konsantrasyonu değişen bir veya birkaç metabolitin tayin edilmesi ile teşhis koyulabilir. Mitokondride oksidatif fosforilasyon sisteminde bir hasar olması durumunda solunum zincirine elektron aktarılmasında aksaklık meydana gelir. Bunun sonucu olarak da yetersiz ATP üretimi, NAD/NADH dengesinde bozulma, oksidatif stres ve mitokondri membran potansiyelinde azalma meydana gelir. Mitokondride redoks dengesinin bozulması birçok hücresel yanıtı tetikler ve birçok metabolitin düzeyleri değişir.

Bu tez kapsamında, CoQ<sub>10</sub> nefropatisinin önlenmesi/iyileştirilmesi için terapötik potansiyeli olan CoQ<sub>10</sub>'un polimerik nanopartiküllere yüklenerek mitokondriye hedeflendirilmesi, HK-2 (human kidney proximal tubule epithelial cell line, insan böbrek proksimal tübül epitel hücre hattı) hücre hattında siRNA temelli *COQ8B* geninin susturulması ile in vitro hastalık modelinin oluşturulması, geliştirilen nanoterapötiklerin terapötik etkinliğinin metabolomik/fluksomik analizler ile mitokondri dinamikleri/fonksiyonlarının kontrol ve hastalık modelinde karşılaştırılarak ileride ilaç olarak kullanılabile potansiyelinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereçler

Poli(laktid-ko-glikolid)-blok-poli(etilen glikol), KoenzimQ<sub>10</sub>, (5-karboksipentil)(trifenil) fosfonyum bromür ve diğer kimyasal maddeler Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, gene özgü siRNA molekülleri Horizon Discovery firmasından, HK-2 hücre hattı ATCC (ABD), RNA izolasyon kitleri GeneAll Biyoteknoloji'den, cDNA sentez kiti Meridian Bioscience'tan (Hollanda), ELISA kitleri, antikorlar, RIPA lysis buffer, COQ8B primer antikor (20190429) Bioassay Technology Laboratory'den (Çin), XTT kiti Biological Industries (USA)'den satın alındı.

Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve temin edildikleri firmalar aşağıdaki gibidir: Partikül Boyutu ve Zeta potansiyel Ölçüm Cihazı (Malvern Zetasizer Nano-ZS, İngiltere), Santrifüj (Hettich, Almanya), Manyetik Karıştırıcı (Ika, Almanya), pH metre (Orion, ABD), Hassas Terazî (Mettler Toledo, ABD), Buz Makinesi (AF80, Scotsman, İtalya), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC, Dionex, Almanya), pompası ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolon (Agilent, USA), HPLC otomatik örnek enjektörü (ASI-100, Dionex, Almanya), HPLC Termostatlı kolon kompartmanı (TCC-100, Dionex, Almanya), HPLC UV dedektörü (UVD340U, Dionex, Almanya), Spektrofotometre (UV-1800, Shimadzu, Japonya), PCR (Veriti, Applied Biosystems, ABD), Gerçek zamanlı PCR (ViiA7, Applied Biosystems, ABD), Mikroplaka okuyucu (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Almanya), -86°C Buzdolabı (Panasonic, Japonya), Laminar akış kabini (Clean Air, ABD), CO<sub>2</sub> inkübatörü (Panasonic, Japonya), ışık mikroskobu (Leica DM4000B, Almanya).

#### 3.2. Hücre Kültürü

Çalışmalarda, ticari olarak mevcut sağlıklı insan böbreğinden elde edilmiş olan HK-2 insan proksimal tübül epitel hücre hattı (ATCC, CRL-2190, Manassas, VA, ABD) kullanılmıştır. Bu hücreler, insan papilloma virüsü 16 (HPV-16) ile transforme edilerek ölümsüz hale getirilmiş hücrelerdir. Hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda; %10 fetal

sığır serumu (FBS), 100 U/ml penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ile desteklenmiş yüksek glukoz içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri ile süspande edilerek 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli atmosferli ortamda büyümeye bırakılmışlardır. Besiyeri ortamı her 2 günde bir yenilenmiştir. Hücreler tam doluluğa erişmeleri beklenmeden yaklaşık %80 doluluğa eriştiklerinde pasajlanmıştır. Pasajlama için besiyeri uzaklaştırılarak hücrelere %0.05 (ağırlık/hacim) Trypsin-0.53 mM EDTA çözeltisi uygulanmıştır. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılmasını takiben (5-15 dakika içerisinde) flaska besiyeri eklenerek Trypsin-EDTA çözeltisini uzaklaştırmak amacıyla 125xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak hücreler yeni besiyerinde süspande edilmiş ve yeni flaslara ekimi gerçekleştirilmiştir.

### 3.3. siRNA Transfeksiyonu

HK-2 hücre hatlarında *COQ8B* (*ADCK-4*) geni, ticari olarak erişilebilen 3 ile 5 farklı hedefe özgü 19-25 nükleotidlik sekans uzunluğunda *COQ8B* siRNA (ON-TARGETplus Human *COQ8B* siRNA) ile DharmaFECT 1 Transfection Reagent (Dharmacon) kullanılarak susturulmuştur. Transfeksiyondan önce 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her kuyucukta  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılarak, hücrelerin tutunması için 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler 6 gruba ayrılarak en etkin siRNA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 3 farklı siRNA konsantrasyonu ile uygulama yapılmıştır. Transfeksiyon süresini optimize etmek amacıyla 48 saatlik ve 72 saatlik uygulamalar yapılmıştır.

1. Kontrol
2. Negatif Kontrol (hedefli olmayan siRNA)
3. Pozitif Kontrol (*GAPDH*-siRNA)
4. 25 nM *COQ8B*-siRNA
5. 50 nM *COQ8B*-siRNA
6. 100 nM *COQ8B*-siRNA

6 kuyucuklu plakalara önceki gün ekilen hücreler 10 µM siRNA + 0.3 µL Dharmafect1 ve antibiyotik içermeyen besiyeri kullanılarak transfekte edilmiştir. *COQ8B* genine özgü susturma sağlandığını göstermek amacıyla da negatif kontrol olarak hedeflenmemiş siRNA kullanılmıştır. Transfeksiyonun etkinliğini

değerlendirmek amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Western Blot analizleri yapılmıştır.

### 3.4. Gerçek zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR analizleri için HK-2 hücrelerinden total RNA; RNA ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda izole edilmiştir. Tek zincirli cDNA 1 µg total RNA'dan ters transkriptaz kullanılarak sentezlenmiştir. RNA örneklerinin saflığı 260 ve 280 nm'de absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir. Total RNA konsantrasyonu 260 nm'de absorbans ölçümü yapılarak hesaplanmıştır. Örneklerden elde edilen 1 µg total RNA kullanılarak cDNA sentez kiti yönergeleri doğrultusunda cDNA sentezi yapılmıştır. Real-time PCR ViiA 7 gerçek zamanlı PCR sistemi ile WizPure qPCR Master (SYBR) kullanılarak kit üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon programı 95°C'de 5 dk, 40 döngü boyunca 95°C 30 sn denatürasyon, 55°C 60 sn uzama aşamalarını içermektedir. Gerçek zamanlı PCR işleminde, kullanılan primerler Tablo 3.1.'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Gerçek zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primer dizileri.

| Primerler    | Sekanslar                                                     |
|--------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>COQ8B</i> | F: CACATTGCCTGGAGGAGAAGA<br>R: CTAGCAACCAGGGGAGAACC           |
| <i>GAPDH</i> | F: 5'-ATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3'<br>R: 5'-GCATCGCCCCACTTGATTTT-3' |

Bağıl gen ekspresyon seviyeleri delta-delta C<sub>t</sub> yöntemi hesaplanmıştır. F: İleri primerin sekansı, R: Revers primerin sekansı.

### 3.5. Western Blot Analizleri

Yabanıl-tip HK-2 hücreleri ile *COQ8B*<sup>-/-</sup> (*ADCK*<sup>-/-</sup>) HK-2 hücrelerinde *COQ8B* protein düzeyleri Western Blot analizi ile tayin edilmiştir. siRNA transfeksiyonu için 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her kuyucuğa 5x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve hücrelerin plaka yüzeyine tutunması için gece boyunca inkübe edilmiştir. Transfeksiyon sonrasında hücreler RIPA tampon çözeltisi ile muamele edilerek parçalanmıştır. Hücre lizatları 12,000xg'de, 4°C'de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar toplanmıştır. Örneklerdeki protein miktarını belirlemek için

Bikinkoninik asit (BCA) metodu kullanılmıştır. Eşit miktarda protein içeren örnekler sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) ayrıldıktan sonra nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. %5'lik sıgır serum albümini (BSA) ve %0.1'lik Tween 20 içeren fosfatla tamponlanmış salin (PBS) çözeltisi ile oda sıcaklığında gece boyunca bloke edilmiştir. Bloklama aşamasından sonra membran bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş primer antikorlar ile +4°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda membran %0.1'lik Tween 20 içeren tris ile tamponlanmış salin (TBS) çözeltisi ile yıkanmıştır. Membran bloklama çözeltisi içinde dilüe edilmiş yabanturbo peroksidazı bağlı sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bir saatin sonunda membran %0.1 oranında Tween 20 içeren TBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Antikor-antijen bağlanması Advanta WesternBright ECL HRP substrat ile görüntülenmiştir.

### 3.6. Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> ve PLGA-*b*-PEG-OH polimerleri ile NP'lerin hazırlanmasında kullanılan yöntemler Tablo 3.2.'de özetlenmiştir.

**Tablo 3.2.** Nanopartikül hazırlama yöntemleri.

| Polimer                             | Nanopartikül Hazırlama Yöntemi                                        |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| PLGA- <i>b</i> -PEG-NH <sub>2</sub> | Nanoçöktürme                                                          |
|                                     | Çift Emülsiyon-Çözücü Uçurma<br>(Double Emulsion-Solvent Evaporation) |
| PLGA- <i>b</i> -PEG-OH              | Nanoçöktürme                                                          |

#### 3.6.1. Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartikül Hazırlanması

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan NP'ler Marrache ve ark. (96)'nin kullandığı yöntem modifiye edilerek hazırlanmıştır. Dimetilformamid (DMF) içerisindeki PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimer çözeltisi 10 mL saf su içerisine damla damla eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen bu emülsiyon 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak organik çözücünün uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen partikül süspansiyonu 20,000xg'de 1 saat santrifüjlenerek, boş NP'ler çöktürülmüştür. Nanoçöktürme yönteminde formülasyonun boyut özelliğine

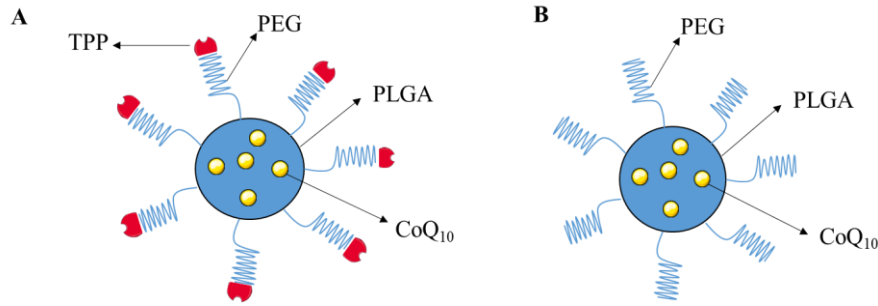
etkisinin saptanması amacıyla farklı polimer konsantrasyonları denenmiştir (%5 ve %10 (a/h)). CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'ler ise CoQ<sub>10</sub>/polimer oranı %20 ve %50 olacak şekilde aynı yöntemle hazırlanmıştır.

PLGA-*b*-PEG-OH polimeri ile NP hazırlanması için öncelikle TPP molekülünün polimer yüzeyine konjugasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla PLGA-*b*-PEG-OH polimeri (0.022 mmol), disikloheksilkarbodiimid (DCC) (0.136 mmol), 4-Dimetilaminopiridin (DMAP) (0.07 mmol) ve TPP (0.136 mmol) diklorometan (DCM) içerisinde çözülmüş ve 0°C'de 16 saat reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda dietil eter yardımıyla çözülen polimer çözme-çöktürme yöntemiyle saflaştırılmış ve dietil eter-metanol (1:1) çözeltisi ile yıkanarak vakum etüvünde kurutulmuştur. Şekil 3.1.'de konjugasyon reaksiyonu şematize edilmiştir. Elde edilen polimer Fourier Transform Infrared (FT-IR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi yardımıyla karakterize edilmiştir.



**Şekil 3.1.** PLGA-*b*-PEG-OH polimerinin TPP ile konjugasyon reaksiyonu (96).

PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP nanopartiküller nanoçöktürme yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır. 5:1 (a/a) polimer (PLGA-*b*-PEG-OH veya PLGA-*b*-PEG-TPP):CoQ<sub>10</sub> oranında tartılmış ve bu karışım, 6:1 (a/h) oranında asetonitril içerisinde çözülerek polimer-ilaç çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti şırınga pompası yardımıyla 50 µL/dk akış hızında Fluorinated Ethylene Polypropylene (FEP) kapiler tüp (iç çap = 200 µm) yardımıyla ultra saf su içerisine damlatılarak nanoçöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Nanoçöktürme işlemi sırasında ultra saf su-NP çözeltisi manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak asetonitrilin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen NP'lerin yapıları Şekil 3.2.'de şematize edilmiştir.



**Şekil 3.2.** CoQ<sub>10</sub> yüklü NP yapılarının şematik gösterimi. A) PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan NP'ler B) PLGA-*b*-PEG-OH polimeri ile hazırlanan NP'ler.

### 3.6.2. Çift Emülsiyon-Çözücü Uçurma Yöntemi ile Nanopartikül Hazırlanması

CoQ<sub>10</sub> yüklü PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan NP'ler literatürdeki yöntem modifiye edilerek hazırlanmıştır (97). PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimerinin DCM içerisindeki çözeltisi ve CoQ<sub>10</sub> çözeltisi %2 (a/h) Pluronic F-68 veya polivinil alkol (PVA) içeren 5 mL su fazına sonikatör altında (%40 amplitüt, 5dk) eklenmiştir. Elde edilen bu emülsiyon %0.5 (a/h) oranında Pluronic-F68 veya PVA içeren ikinci sulu faza eklenerek organik çözücünün uçması için manyetik karıştırıcı üzerinde (700 rpm) +4 °C'de gece boyunca karışmaya bırakılmıştır. Oluşan olan partikül süspansiyonu 40,000xg'de 1 saat santrifüjlenerek, NP'ler çöktürülmüştür. Daha sonra NP'lerin 2 kez yıkanması ile yüklenmemiş CoQ<sub>10</sub> ve yüzey aktif maddenin fazlası uzaklaştırılmıştır. CoQ<sub>10</sub> içermeyen NP'ler de kontrol amaçlı olarak aynı yöntem ile hazırlanmıştır.

### 3.6.3. PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> Polimeri ile Hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü Nanopartiküllerin TPP ile Konjugasyonu

CoQ<sub>10</sub> yüklü PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan NP'lerin mitokondriye hedeflendirilmesi amacıyla TPP ile konjugasyonu N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC)/N-Hidroksisüksinimid (NHS) reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Amin uçlu PLGA-*b*-PEG NP'lerin karboksil uçlu TPP ile reaksiyona girmesiyle su çıkışı sağlanarak konjugasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece bu polimer ile hazırlanan NP'lerin mitokondriye hedeflendirilmesi sağlanacaktır. Gerçekleştirilen reaksiyon FT-IR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir.

### 3.6.4. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Hazırlanan NP formülasyonlarının boyut ve zeta potansiyel analizleri Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı ile yapılmıştır. Tüm ölçümler 25 °C'de 3 kez yapılmıştır.

### 3.6.5. Morfolojik Analiz

NP'lerin şekil, geometri, büyüklük ve dağılım gibi morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi için Taramalı Geçirmeli Elektron Mikroskobu (STEM) kullanılmıştır. Örnekler STEM gridleri üzerine damlatıldıktan sonra kurutularak örnek hazırlama işlemi tamamlanmıştır. Hazırlanan örnekler 100 kX büyütmede, 2.07 µm alanda, 30.0 kV voltajda bright STEM modunda analiz edilmiştir. Analizde kullanılan cihaz TESCAN Gaia3 (Çek Cumhuriyeti) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Analizler Hünitek - Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

### 3.6.6. Nanopartiküllere Yüklenen CoQ<sub>10</sub> Miktarının Tayini

NP'lere yüklenen CoQ<sub>10</sub> miktarının belirlenmesi için Enzim-ilintili İmmünSorben (ELISA) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemleri kullanılmıştır.

#### **ELISA**

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak nanoçöktürme metodu ile hazırlanan NP'lerde CoQ<sub>10</sub> yükleme etkinliğinin belirlenmesi için NP hazırlama işlemi sırasında dış sulu fazda serbest halde bulunan CoQ<sub>10</sub> madde miktarı belirlenerek indirekt olarak NP'lere yüklenen CoQ<sub>10</sub> miktarının tayin edilmesi amaçlanmıştır. CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'ler nanoçöktürme yöntemi ile hazırlandıktan sonra NP süspansiyonu 20,000xg'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra NP'lerin üst fazından alınan örnek 0,22 µm por açıklığına sahip filtreden süzölmüştür. CoQ<sub>10</sub> miktar tayini ELISA kiti ile kit yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Absorbans ölçümü için FLUOstar OMEGA mikroparka okuyucu (BMG Labtech, Almanya) kullanılmıştır.

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak çift emülsiyon-çözücü uçurma metodu ile hazırlanan NP'lere yüklenen CoQ<sub>10</sub> miktarının belirlenmesi amacıyla

NP'ler literatürdeki yer alan yöntemin (97) optimize edilmesi ile hazırlanmıştır. Partiküller ultrasantrifüjde çöktürölüp (40,000xg, 1 saat) yıkandıktan sonra 2 gün etüvde kurutulmuştur. Kuruyan NP'ler DCM eklenmesiyle parçalanarak içlerindeki ilacın dışarı çıkması sağlanmıştır. Daha sonra DCM uçurularak ilacın çözünmesi için klorofom eklendi. ELISA kitinin yönergeleri doğrultusunda deney gerçekleştirilmiş, ancak mikropalakaya organik çözücü ilavesiyle kristalizasyon meydana geldiği için düzgün bir ölçüm yapılamamıştır.

NP'lerdeki ilaç miktarının tayini için ELISA yönteminin uygun olmadığı tespit edilerek sonraki miktar tayini deneyleri için HPLC yöntemi uygulanmasına karar verilmiştir.

### **HPLC**

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak çift emülsiyon-çözücü uçurma metodu ile hazırlanan NP'lere yüklenen CoQ<sub>10</sub> miktarının tayini Sharma ve ark. (63) tarafından geliştirilen HPLC yönteminin modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemde mobil faz olarak 6:4 (h/h) etanol-metanol karışımı kullanılmıştır. Analitik ayırım için ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolon (4.6×150 mm, 5 µm) kullanılmış (25°C) ve CoQ<sub>10</sub> tayini  $\lambda=274$  nm'de gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 mL.dk<sup>-1</sup> ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlanmıştır. Mobil fazda hazırlanan 1 mg.mL<sup>-1</sup> derişimdeki stok CoQ<sub>10</sub> çözeltisinden hareketle 8 farklı kalibrasyon noktası için gerekli seyreltmeler yapılmıştır (0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 mg.mL<sup>-1</sup>). Bu standart çözeltilere ait kromatogramlardan elde edilen piklerin alanları hesaplanmıştır. CoQ<sub>10</sub> derişimine karşı pik alanlarını gösteren standart eğri çizilmiş, regresyon analizi gerçekleştirilmiştir.

PLGA-*b*-PEG-OH polimeri kullanılarak nanoçöktürme metodu ile hazırlanan NP'lere yüklenen CoQ<sub>10</sub> miktarının tayini Orozco ve ark. (98) tarafından geliştirilen HPLC yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Yöntemde mobil faz olarak asetonitril-tetrahidrofuran-su karışımı 55:40:5 oranında kullanılmıştır. Analitik ayırım için ZORBAX Eclipse XDB-C18 kolon (4.6×150 mm, 5 µm) kullanılmış (25°C) ve CoQ<sub>10</sub> tayini  $\lambda=274$  nm'de gerçekleştirilmiştir. Akış hızı mL.dk<sup>-1</sup> ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlanmıştır. CoQ<sub>10</sub>'un asetonitrilde hazırlanan 1 mg.mL<sup>-1</sup> derişimdeki stok çözeltisinden hareketle 8 farklı kalibrasyon noktası için gerekli seyreltmeler

yapılmıştır (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1, 0.05, 0.0125, 0.005 mg.mL<sup>-1</sup>). Bu standart çözeltilere ait kromatogramlardan elde edilen piklerin alanları hesaplanmıştır. CoQ<sub>10</sub> derişimine karşı pik alanlarını gösteren standart eğri çizilmiş, regresyon analizi gerçekleştirilmiştir.

### 3.6.7. CoQ<sub>10</sub> Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

CoQ<sub>10</sub>'un enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi için NP'lere yüklenen ilaç miktarı direkt olarak tayin edilmiştir. Bu amaçla, 5 mg PLGA-*b*-PEG-OH, PLGA-*b*-PEG-TPP veya PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ve 1 mg CoQ<sub>10</sub> kullanılarak nanoçöktürme/çift emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP'ler asetonitril/DCM ile parçalanarak ilaç miktarı HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (99).

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%EE)} = \frac{K_2}{K_1} \times 100$$

K<sub>1</sub>: NP'ler hazırlanmasında kullanılan CoQ<sub>10</sub> miktarı

K<sub>2</sub>: NP'lerde tayin edilen CoQ<sub>10</sub> miktarı

### 3.6.8. CoQ<sub>10</sub> Salım Çalışmaları

CoQ<sub>10</sub> yüklü PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan NP'lerden etken madde salım profilini incelemek için NP'lerin hücre kültüründe uygulanacağı göz önünde bulundurularak salım ortamı olarak DMEM besiyeri kullanılmıştır. Örnekler 37°C ve 110 rpm'e ayarlanmış çalkalamalı inkübatöre yerleştirilmiş ve farklı zaman dilimlerinde (1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 saat) ve CoQ<sub>10</sub> yüklü nanopartiküllerin % salınan etken madde miktarının ölçülmesiyle (n=2) gerçekleştirilmiştir. Örneklerin önceden belirlenmiş zaman noktalarında üst fazları toplanarak yerine aynı hacimde DMEM besiyeri ilave edilmiştir. Toplanan örnekler santrifüj edilerek üst fazları toplanmış ve ELISA kiti ile salınan etkin madde miktarları ölçülmüştür. Absorbans ölçümü için FLUOstar OMEGA mikropilaka okuyucu (BMG Labtech, Almanya) kullanılmıştır.

### 3.6.9. XTT Deneyi

CoQ<sub>10</sub> yüklü PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan NP'lerin HK-2 hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla XTT deneyi

yapılmıştır. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna yaklaşık  $4 \times 10^3 - 6 \times 10^3$  hücre %10 FBS içeren DMEM ortamı içinde ekilmiştir. Hücreler 25, 50, 100, 200 ve 300  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda NP'ler ile 48 saat muamele edildikten sonra kit yönergeleri doğrultusunda XTT reaksiyon çözeltisinden kuyucuk başına 50  $\mu\text{L}$  eklenmiştir.  $37^\circ\text{C}$ 'de 4 saatlik inkübasyon sonunda plaka 450 nm'de plaka okuyucuda okunmuştur. En yüksek hücre canlılığına sahip olan grup %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir. Deneyler üç bağımsız kuyucukta gerçekleştirilmiştir.

Yüzde canlılığın tespiti için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

Eşitlikte  $A_{\text{örnek}}$  örnek hücre grubunun absorbens değeri;  $A_{\text{negatif}}$ , besiyerinin absorbens değeri;

$A_{\text{kontrol}}$ , ilaç uygulanmayan kontrol hücre grubunun absorbens değerini ifade etmektedir.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{A_{\text{örnek}} - A_{\text{negatif}}}{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{negatif}}} \times 100$$

### 3.7. Hücre Kültüründe Nanopartikül Uygulaması

96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında 96 saat süreli siRNA uygulamasını takiben NP uygulaması için aşağıdaki deney grupları oluşturulmuştur.

1. Kontrol
2. siRNA
3. siRNA + Serbest CoQ<sub>10</sub>
4. siRNA + CoQ<sub>10</sub>-NP (Hedefsiz nanopartikül)
5. siRNA + CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (Mitokondriye hedefli nanopartikül)

Hücrelere CoQ<sub>10</sub> konsantrasyonu 100  $\mu\text{M}$  olacak şekilde serbest ilaç veya NP 48 saat süreyle uygulanmıştır. Uygulanan CoQ<sub>10</sub> konsantrasyonu ve inkübasyon süresi, literatür bilgisinden yararlanılarak belirlenmiştir (98, 100).

### 3.8. Metabolomik ve Fluksomik Analizler

#### 3.8.1. Hücrelerin Toplanması

Metabolomik analizler için %100 doluluğa ulaşan hücreler, inkübatörden çıkarıldıktan sonra üç defa izotonik sodyum klorür (NaCl) çözeltisi ile hızlı bir şekilde

yıkanmıştır. Fluksomik analizler için ise % 100 doluluğa ulaşmış hücrelerin besiyerleri aspire edildikten sonra içinde %30  $H_2^{18}O$  içeren besiyeri 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her kuyucuğuna 50  $\mu L$  eklenerek 37°C’de 15 dk inkübe edilerek hücrelerin işaretlenmesi sağlanmıştır. İşaretleme süresi tamamlandıktan sonra inkübatörden çıkartılıp  $H_2^{18}O$  içeren besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra izotonik NaCl çözeltisi ile hızlı bir şekilde yıkanmıştır.

Hücre kültürü plakaları hafif bir şekilde çalkalandıktan sonra sıvı azot üzerine alınmış; hücreler dondurulmuştur. Dondurulmuş hücrelerin üzerine 100’er  $\mu L$  metanol:su (9:1, hacim/hacim) karışımı ilave edilerek, hücre kültürü plakaları tekrar sıvı azot üzerine alınmıştır. Dondurulmuş hücreler hücre kazıyıcı ile kazınmış ve ependorf tüplere aktarılmıştır. Kalan hücreleri toplamak için hücre kültürü plakalarının her kuyucuğuna tekrar 100  $\mu L$  metanol:su (9:1, hacim/hacim) karışımı eklenerek diğer hücre süspansiyonları ile birleştirilmiştir. 4°C’ de 25,000xg’de hücreler 10 dk süreyle santrifüjlendikten sonra üst faz 2 mL’lik ependorf tüpe transfer edilmiş ve süpernatantlar -20 °C’de analiz edilinceye kadar saklanmıştır.

### 3.8.2. GC-MS Temelli Metabolomik ve Fluksomik Analizler

Metabolomik ve fluksomik analizler literatürde yer alan yöntem ile yapılmıştır (101). -20°C’ de saklanan numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra vakumlu santrifüjde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kurumuş numuneler 20  $\mu L$  metoksiamin hidroklorür (piridin içinde, 20 mg/mL) ile etüvde 30°C’de 90 dk tutularak metoksillendirilmişlerdir. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen numuneler üzerine 80  $\mu L$  N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit +trimetilklorosilan (MSTFA + %1 TMCS) eklenmiş ve etüvde 37°C’de 30 dk bekletilerek türevlendirilmiştir. Türevlendirilen numuneler silillenmiş GC-MS viallerine aktarılmış ve sonrasında DB5-MS kolon kullanılarak GC-MS sistemi ile analizleri Tablo 3.3.’te belirtilen optimize edilmiş koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompleks kromatogramlar ayrıştırıldıktan sonra piklerin alıkonma zamanları MS-DIAL yazılımı kullanılarak düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Metabolitlere ait pikler alıkonma indeksli Fiehn ve Golm Veritabanı kullanılarak aydınlatılmıştır.

**Tablo 3.3.** GC-MS analiz koşulları ve cihaz parametreleri.

|                         |                                                                                         |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Kolon                   | DB5-MS kolon (30 m+10 m ön kolon, 0.25 mm iç çap ve 0.25 µM film kalınlığı)             |
| Fırın sıcaklık programı | Fırın sıcaklığı artışı 60°C'den (1 dk tutulur) 325°C'ye 10°C/dk artışla (10 dk tutulur) |
| Analiz süresi           | 37.5 dk                                                                                 |
| Enjeksiyon hacmi        | 1 µL                                                                                    |
| Taşıyıcı gaz            | Helyum mg.mL <sup>-1</sup>                                                              |
| MSD geçiş sıcaklığı     | 290°C                                                                                   |
| Çözücü gecikme süresi   | 5.90 dk                                                                                 |
| Kütle Aralığı           | 50-650 Da                                                                               |

GC-MS temelli metabolomik analizler sonucunda elde edilen veri matrisleri toplam pik alanı kullanılarak normalize edilmiştir. Daha sonra bu veri matrisi SIMCA-P+ (8v13.0, Umetrics, Umea, İsveç) programına aktararak; temel bileşenler analizi (PCA) ve en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri ile incelenerek grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur.

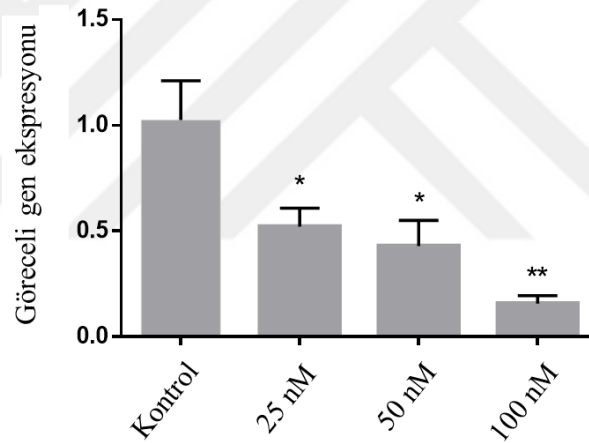
### 3.8.3. İstatistiksel Analizler

Tüm *in vitro* deneyler en az 3 kez yapılmış, veriler, ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 8.0 (Graphpad Software, ABD) kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PCR analizleri için “one-way ANOVA testi” kullanılmıştır. Metabolomik analizler için, metabolit başına ortalama ifadede gruplar arasındaki değişiklikleri karşılaştırmak için “unpaired t-test” yapılmıştır. Normal HK-2 hücre hattından elde edilen metabolit değerlerine “Student's t-test” uygulanmış ve *COQ8B*<sup>-/-</sup> hücre hatlarından elde edilen  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. siRNA Transfeksiyonu Sonrasında HK-2 Hücrelerinde *COQ8B* Gen Ekspresyon Düzeyleri

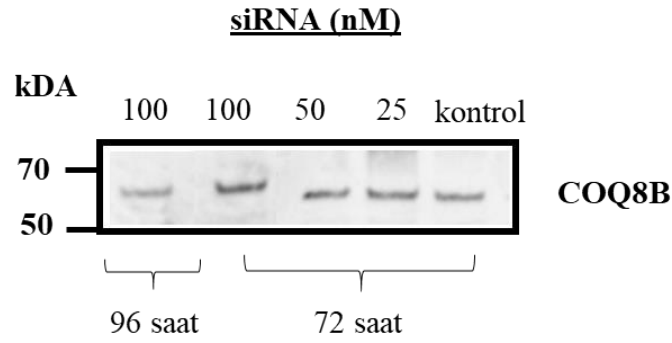
*COQ8B* gen mutasyonuna bağlı CoQ<sub>10</sub> eksikliğini hücre kültürü düzeyinde oluşturmak için HK-2 hücre hattında *COQ8B* genine özgü siRNA kullanılmış, böylece *in vitro* hastalık modeli geliştirilmiştir. siRNA ile transfekte edilen HK-2 hücrelerinde siRNA konsantrasyonuna bağlı olarak gen susturma etkinliği Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Gen düzeyinde en yüksek gen susturma etkinliği 100 nM siRNA'nın 48 saat süreyle uygulaması sonucu görülmüştür.



**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlarda siRNA ile transfekte edilen HK-2 hücrelerinin *COQ8B* gen ekspresyon düzeyleri (\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  kontrole karşı. *COQ8B* gen ekspresyon düzeyleri *GAPDH* genine göre normalize edilmiştir.)

### 4.2. siRNA Transfeksiyonu Sonrasında HK-2 Hücrelerde *COQ8B* Protein Düzeyleri

siRNA ile 72 ve 96 saat süreli transfeksiyon sonrası HK-2 hücrelerinde *COQ8B* protein düzeylerindeki değişim Western Blot analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.2.).



**Şekil 4.2.** siRNA ile 72 ve 96 saat süreli transfeksiyon sonrası HK-2 hücrelerinde COQ8B proteinine ait Western Blot görüntüsü.

#### 4.2.1. PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> Polimeri ve Nanoçöktürme Yöntemi ile Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

#### 4.2.2. Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Dağılımının İncelenmesi

Farklı konsantrasyonlarda PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak hazırlanan NP'lere ait ortalama boyut, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1'de belirtilmiştir. Her formülasyon için 3 tekrar yapılmış ve ortalama boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri standart sapmaları hesaplanarak elde edilmiştir. Nanoçöktürme yöntemi kullanılarak %5 (a/h) polimer çözeltisi ile hazırlanan NP1 örnek grubunda partikül boyutu 59.72 nm iken %10 (a/h) polimer derişimi ile hazırlanan NP2 grubunda ise 71.6 nm olarak bulunmuştur. Elde edilen NP boyutlarının 100 nm'den daha küçük olması nedeniyle mitokondriye hedeflendirme için uygun özellikte olduğu görülmüştür. Her iki örnek grubunun da PDI değerleri agregasyon eğiliminin olmadığını doğrulamaktadır. Ayrıca NP'lerin yüzey yükleri NP1 için +16 mV olarak hesaplanırken, NP2 için +9.59 mV olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.3. ve Şekil 4.4. PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan farklı formülasyonlardaki NP'lerin boyut ve zeta potansiyel grafiklerini göstermektedir.

NP1 formülasyonunun boyut ve PDI değerlerinin daha uygun olması nedeniyle PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'ler hazırlanırken polimer konsantrasyonu %5 olacak şekilde aynı yöntem kullanılmıştır. İlaç yüklü ve yüklü olmayan NP'lerin boyut, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksleri Tablo 4.1.'de özetlenmiştir.

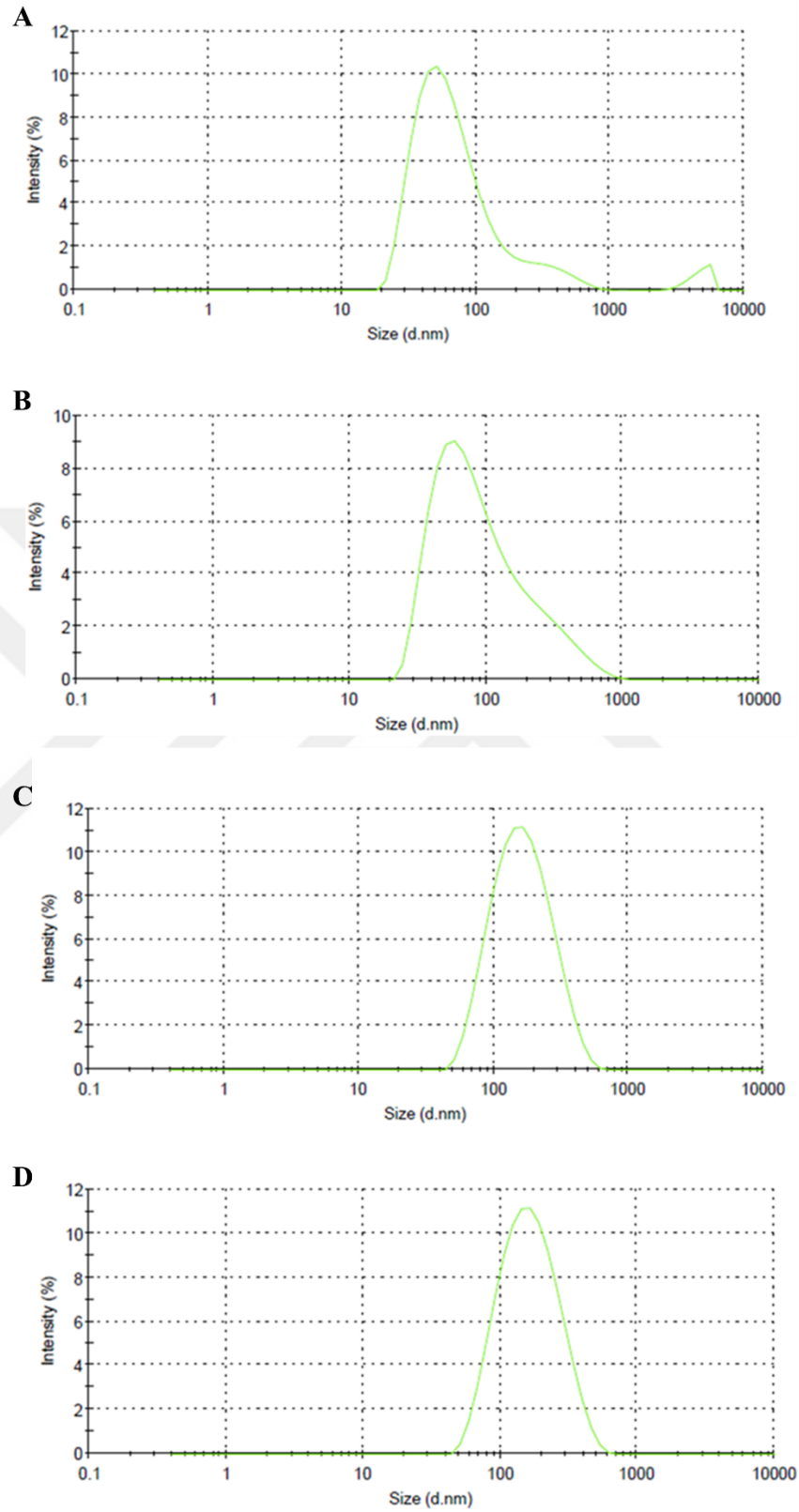
**Tablo 4.1** Nanoçöktürme yöntemi ve PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan NP'lerin ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel değerleri.

| Nanopartikül | Polimer miktarı (% a/h) | İlaç/Polimer oranı (%) | Boyut (nm) | Zeta Potansiyel (mV) | PDI   |
|--------------|-------------------------|------------------------|------------|----------------------|-------|
| NP1          | 5                       | -                      | 59.72      | +16                  | 0.142 |
| NP2          | 10                      | -                      | 71.6       | +9.59                | 0.264 |
| NP3          | 5                       | 20                     | 132.9      | +5.68                | 0.230 |
| NP4          | 5                       | 50                     | 132        | +0.1                 | 0.304 |

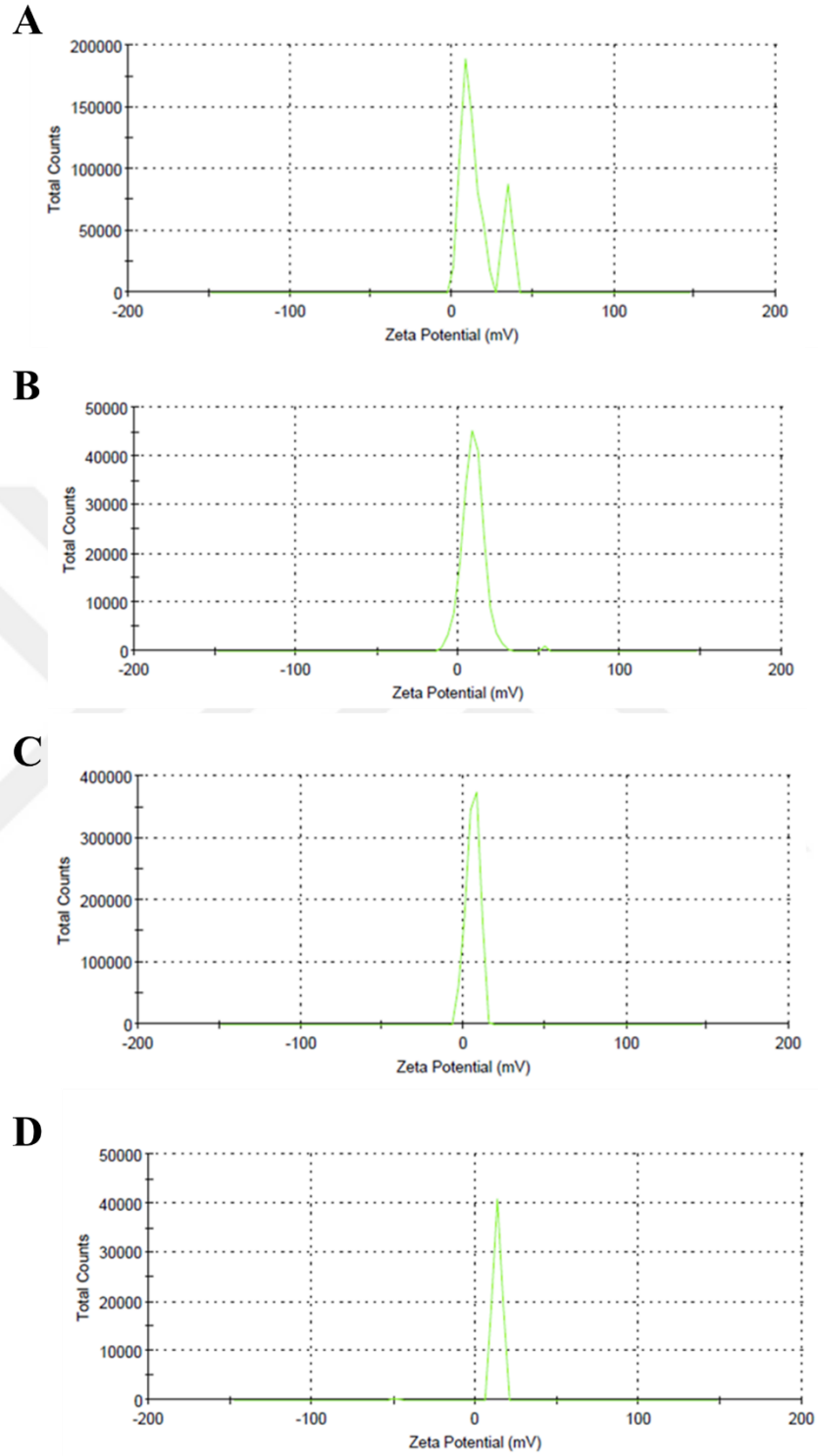
İlaç yüklü NP'lerin yüklü olmayan NP'lere kıyasla daha büyük boyutta olmaları beklenen bir sonuçtur. NP'lerin hazırlanmasında kullanılan ilaç yüzdesi arttıkça partikül boyutunun da arttığı izlenmiştir. Ancak bu tezde hedeflenen NP boyutu 100-200 nm arasında olduğu için elde edilen NP'ler bu hedefe uygundur.

NP'lerin boyut dağılımının homojenliğini gösteren PDI değeri de %50 CoQ<sub>10</sub>/polimer oranına sahip NP'lerde artış göstermiştir. PDI değerinin 0.1-0.3 arasında olması partikül boyutlarının dar bir dağılım gösterdiğini, bu aralıktan daha yüksek bir değerde olması ise partikül boyutlarının geniş dağılım gösterdiğini ifade etmektedir.

NP'lerde yüksek zeta potansiyel elektriksel itme nedeniyle partiküllerin agrege olmalarını engelleyen bir özelliktir. Zeta potansiyel değerlerinin  $\pm 20-30$  mV aralığında olması partiküllerin kararlı olduğunu ve agregasyona eğilimlerinin daha az olduğunu gösterirken, bu değerlerden daha düşük yüzey yükü partiküllerin zayıf itme gücü nedeniyle agrege olmalarına neden olabilir (102). NP'lerin yüzey yükünü gösteren zeta potansiyel değerleri yüklü olmayan NP'lerde daha yüksek iken, CoQ<sub>10</sub> yüklenmesi sonucu zeta potansiyel değerlerinde azalma gözlenmiştir.



**Şekil 4.3.** NP'lerin partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımını gösteren grafikler. **A)** NP1 **B)** NP2, **C)** NP3, **D)** NP4'e ait partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımını gösteren grafik.



**Şekil 4.4.** NP'lerin zeta potansiyel grafikleri. **A)** NP1 **B)** NP2, **C)** NP3, **D)** NP4'e ait zeta potansiyel grafiği.

#### **4.2.3. Nanopartiküllere Yüklenen CoQ<sub>10</sub> Miktarının ELISA Yöntemi ile Tayini**

Nanoçöktürme yöntemi kullanılarak PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere yüklenen ilaç miktarını belirlemek için ELISA yöntemi kullanılmıştır. NP hazırlama aşamasında dış sulu fazdan alınan örnekler ile yapılan ELISA deneylerinde anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

#### **4.2.4. CoQ<sub>10</sub> Etken Madde Salım Çalışmaları**

CoQ<sub>10</sub> içeren PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> NP'lerin salım çalışmaları farklı zaman dilimlerinde (1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 saat) ve farklı CoQ<sub>10</sub> konsantrasyonları (1 mg ve 2,5 mg) ile hazırlanan NP'lerin % salınan etken madde miktarının ölçülmesiyle (n=2) gerçekleştirilmiştir. Salım ortamından toplanan örneklerdeki CoQ<sub>10</sub> miktarını tayin etmek için ELISA kiti kullanılmıştır, ancak çıkan sonuçlar anlamlı bulunmamıştır. Bu problemi çözmek için NP'lerin hazırlanması için farklı yöntemler denenmesi ve/veya salım deneyi koşullarının değiştirilmesi planlanmıştır.

### **4.3. PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> Polimeri ve Çift Emülsiyon-Çözücü Uçurma Yöntemi ile Hazırlanan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

#### **4.3.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının İncelenmesi**

Polimer konsantrasyonu %5 (a/h) olacak şekilde hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü (NP5 ve NP7) ve yüklü olmayan PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> partiküller (NP6 ve NP8) yüzey aktif madde olarak %2 (h/h) oranında PVA veya Pluronic F-68 içeren saf su içerisinde hazırlanmıştır. NP'lere ait ortalama boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri Tablo 4.2.'de belirtilmiştir.

**Tablo 4.2.** PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak çift emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan NP'lerin ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel değerleri.

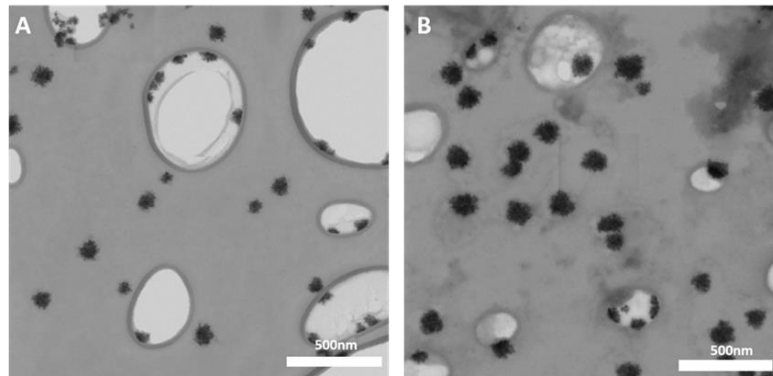
| Nanopartikül | Yüzey aktif madde (%2 a/h) | Boyut (nm) | Zeta Potansiyel (mV) | PDI   |
|--------------|----------------------------|------------|----------------------|-------|
| NP5          | PVA                        | 220.6      | -3.13                | 0.22  |
| NP6          | PVA                        | 181.7      | +4.06                | 0.3   |
| NP7          | Pluronic F-68              | 141.7      | -10.7                | 0.3   |
| NP8          | Pluronic F-68              | 173.5      | -7.96                | 0.345 |

Hazırlanan ilaç yüklü NP'ler 173 ile 220 nm arasında bulunmuştur

İlaç yüklü NP'ler yüklü olmayan NP'lere kıyasla daha büyük boyut ve daha yüksek PDI değerlerine sahiptir. Hazırlanan NP'lerin boyutları 173 ile 220 nm arasında ve PDI değerleri ise 0.22 ile 0.34 arasında bulunmuştur.

#### 4.3.2. Nanopartiküllerin STEM Görüntüleri

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile ve %2 (a/h) Pluronic F-68 kullanılarak hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü ve yüklü olmayan NP'lerin (NP7 ve NP8) morfolojik yapılarının incelenmesi amacıyla STEM görüntüleri alınmıştır. STEM-bright field modunda yapılan analizler sonucunda partikül boyutları ~130-180 nm aralığında bulunmuş olup, küresel yapıda oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.5.). Elde edilen veriler ışığında NP formülasyonlarının istenen morfoloji ve boyutlarda elde edildiği belirlenmiştir.

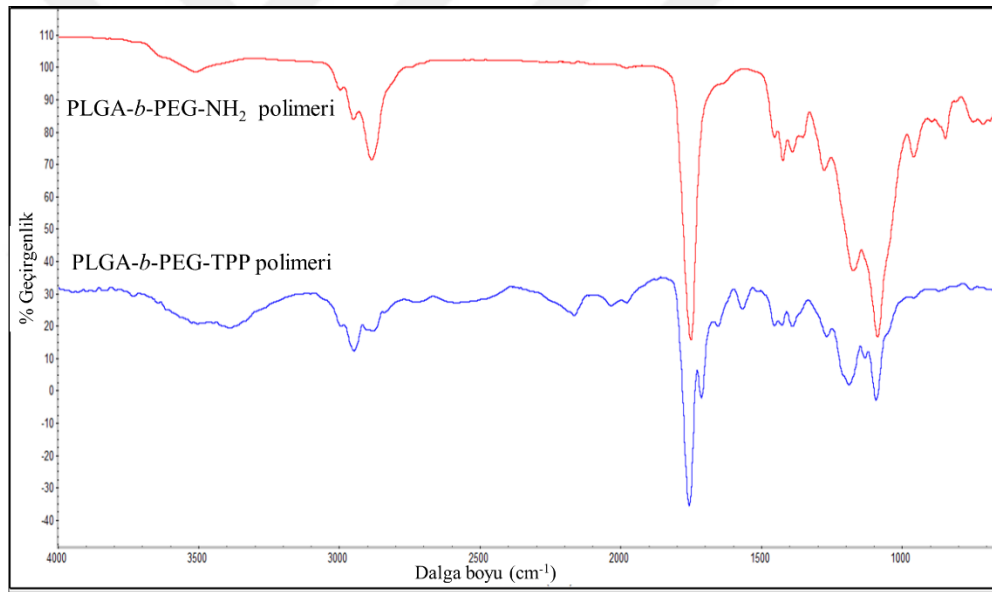


**Şekil 4.5.** NP'lere ait STEM görüntüleri: A) NP7'ye ait STEM görüntüsü B) NP8'e ait STEM görüntüsü.

### 4.3.3. Nanopartiküllerin FT-IR Spektrumu

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak çift emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lerin FT-IR spektrumu Şekil 4.6.'da karşılaştırılmalı olarak sunulmuştur. PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimerine ait FT-IR spektrumu kırmızı ile belirtilen spektrum ile karakterize edilirken, PLGA-*b*-PEG-TPP polimerine ait FT-IR spektrumu mavi ile belirtilen spektrumda sunulmuştur.

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimerine TPP molekülünün konjuge edilmesiyle birlikte 1250 cm<sup>-1</sup> ve 890cm<sup>-1</sup>'deki pikler P=O ve P-O-P esnemelerini karakterize ederken, 2200 cm<sup>-1</sup> ve 3400-3600cm<sup>-1</sup> bandlarında görülen kaymalar ve değişimler TPP konjugasyonundan sonra elde edilen -H bağlarından kaynaklanmaktadır. 1500-1600cm<sup>-1</sup> bandında görülen değişimler ise amin bandındaki değişimleri belirterek konjugasyonun başarıyla gerçekleştirildiğini desteklemektedir.



Şekil 4.6. PLGA-*b*-PEG ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimerlerinin FT-IR spektrumları.

### 4.3.4. Nanopartiküllere Yüklenen CoQ<sub>10</sub> Miktarının ELISA Yöntemi ile Tayini

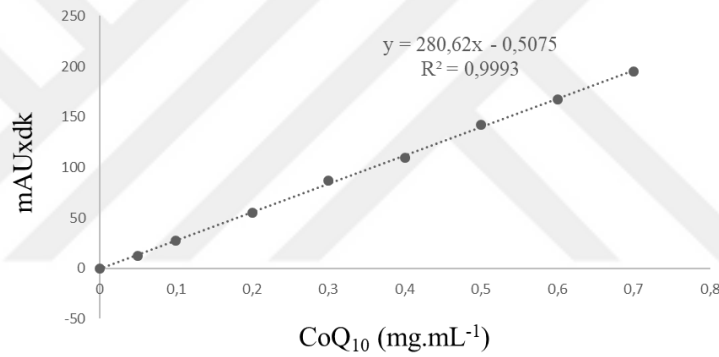
Çift emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi ile PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere yüklenen ilaç miktarını tayin etmek için ELISA yöntemi kullanılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen katı haldeki NP'ler DCM ile parçalandıktan sonra çözücü uçurulmuş ve NP içeriğindeki CoQ<sub>10</sub>'un çözünmesi için kloroform içerisinde yeniden süspande edilmiştir. Elde edilen örneklerin tayini

ELISA kiti ile yapılmış, ancak kit içeriğindeki plakanın kuyucuklarına kloroform içeren örneklerin eklenmesiyle kristalizasyon meydana geldiği için deney devam ettirilememiştir. NP'lere yüklenen CoQ<sub>10</sub> miktarının tayini için HPLC yöntemi kullanılmasına karar verilmiştir.

#### 4.3.5. Nanopartiküllere Yüklenen CoQ<sub>10</sub> Miktarının HPLC Yöntemi ile Tayini

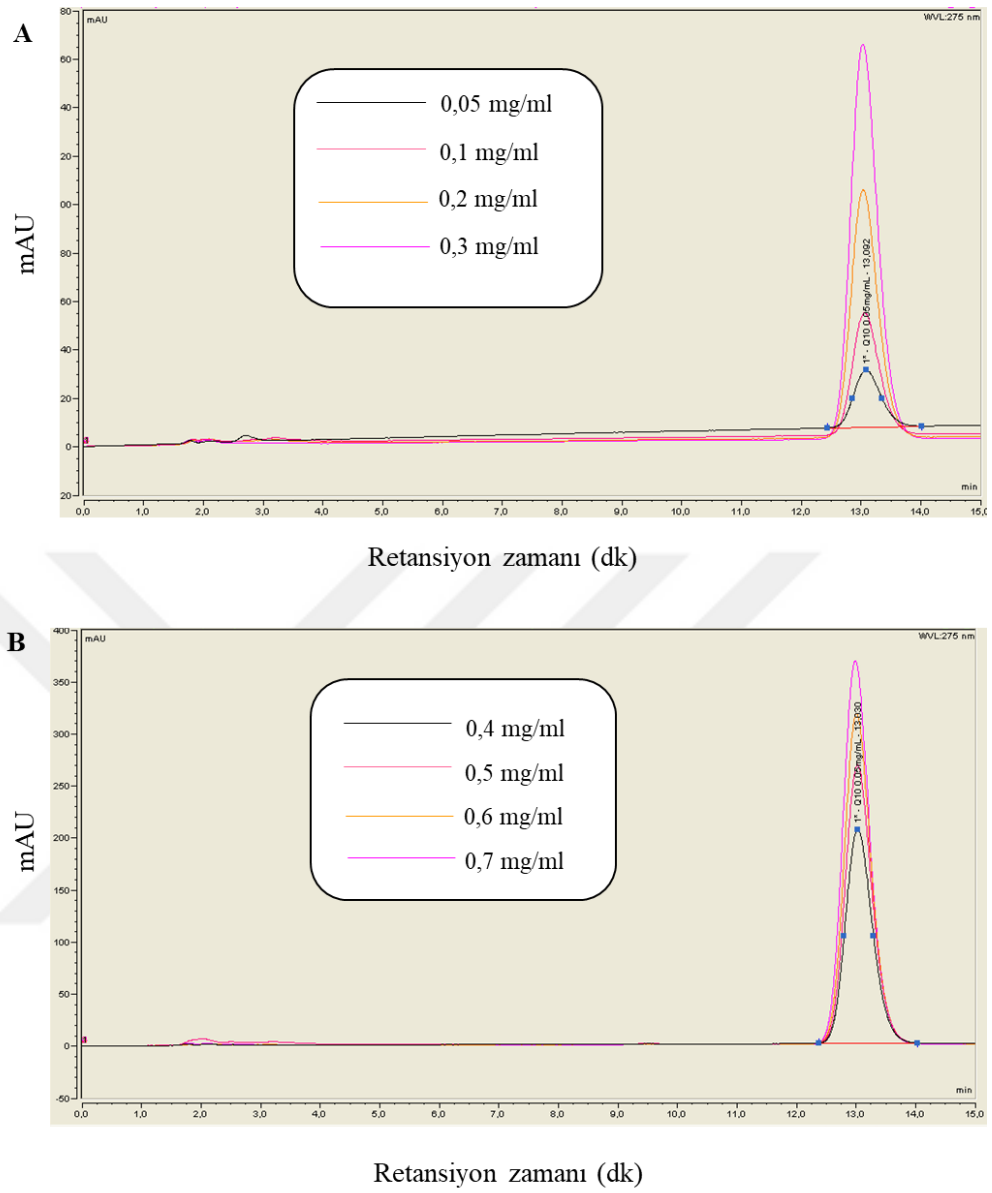
##### CoQ<sub>10</sub>'a Ait Kalibrasyon Doğrusu

1 mg.mL<sup>-1</sup> derişimdeki stok CoQ<sub>10</sub> çözeltisinden hareketle hazırlanan standart çözeltilere ait piklerin alanları hesaplanarak elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4.7.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.7.** CoQ<sub>10</sub>'a ait kalibrasyon doğrusu.

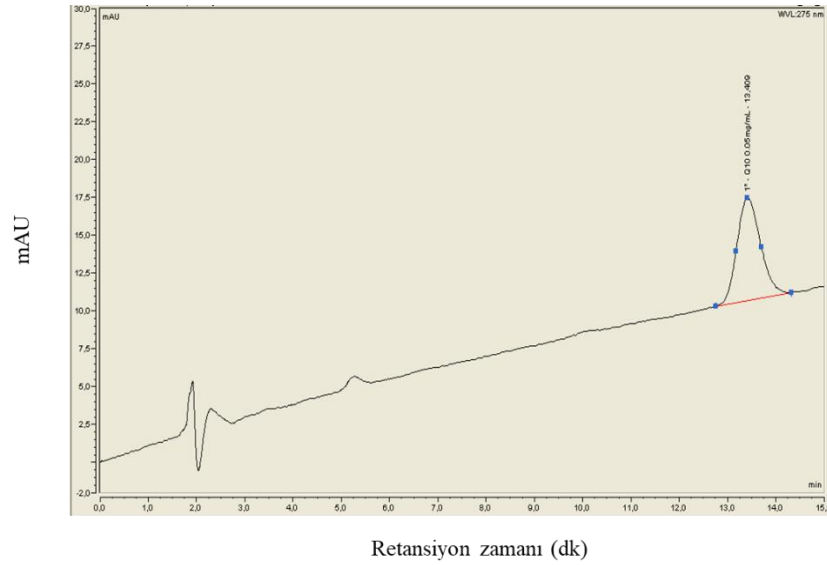
0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 mg.mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> içeren standart çözeltilere ait HPLC kromatogramı Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Pikler miktar tayinine olanak verecek şekilde simetrik olup pik alanları cihaz tarafından otomatik hesaplanmıştır.



**Şekil 4.8.** CoQ<sub>10</sub> standart çözeltilerine ait HPLC kromatogramları. **A)** 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 mg.mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> içeren **B)** 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 mg.mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> içeren standart çözeltilere ait HPLC kromatogramı.

### CoQ<sub>10</sub> Enkapsülasyon Etkinliği

PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak çift emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere yüklenen ilaç miktarını gösteren HPLC kromatogramı Şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.9.** PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lerin (NP7) kromatogramı.

Elde edilen bu kromatograma göre NP'lerin CoQ<sub>10</sub> enkapsülasyon etkinliği %1,5 olarak bulunmuştur.

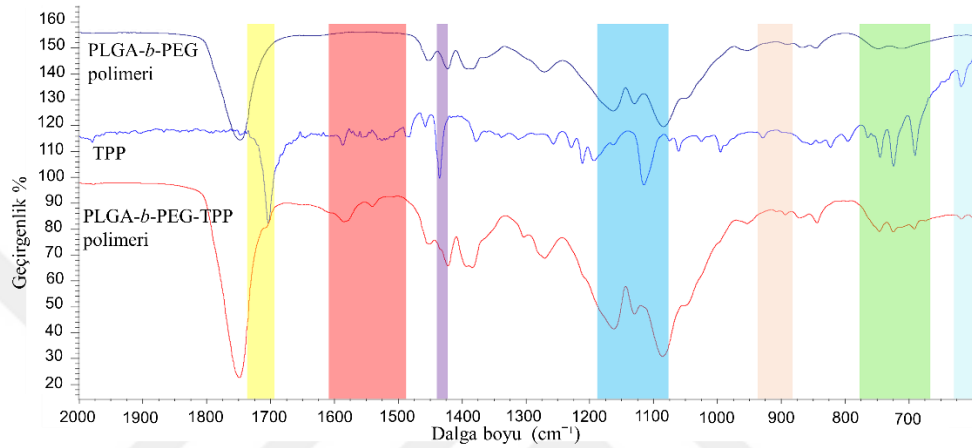
#### 4.4. Mitokondri Hedefli, PLGA-*b*-PEG-TPP Polimeri ile Hazırlanan CoQ<sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

CoQ<sub>10</sub>'un hedeflenen etki yeri olan mitokondri içine yüksek verimle ulaşmasını sağlamak amacıyla PLGA-*b*-PEG-OH polimeri TPP molekülü ile konjuge edilmiştir. TPP molekülü pozitif yükü sayesinde negatif membran potansiyeline sahip mitokondri iç zarından geçebilir. NP'lerin yüzey ve boyut özellikleri sentez için gerekli adımların sayısı arttıkça değişir (96). Bu nedenle polimerin TPP ile konjugasyonu NP formülasyon aşamasından önce gerçekleştirilmiştir. Aktif hedefleme ligandının konjugasyonu sentezlenen NP'ün boyut ve yüzey yükü gibi özelliklerini değiştirmiştir.

##### 4.4.1. PLGA-*b*-PEG-TPP Polimerinin FT-IR ve NMR Spektrumu

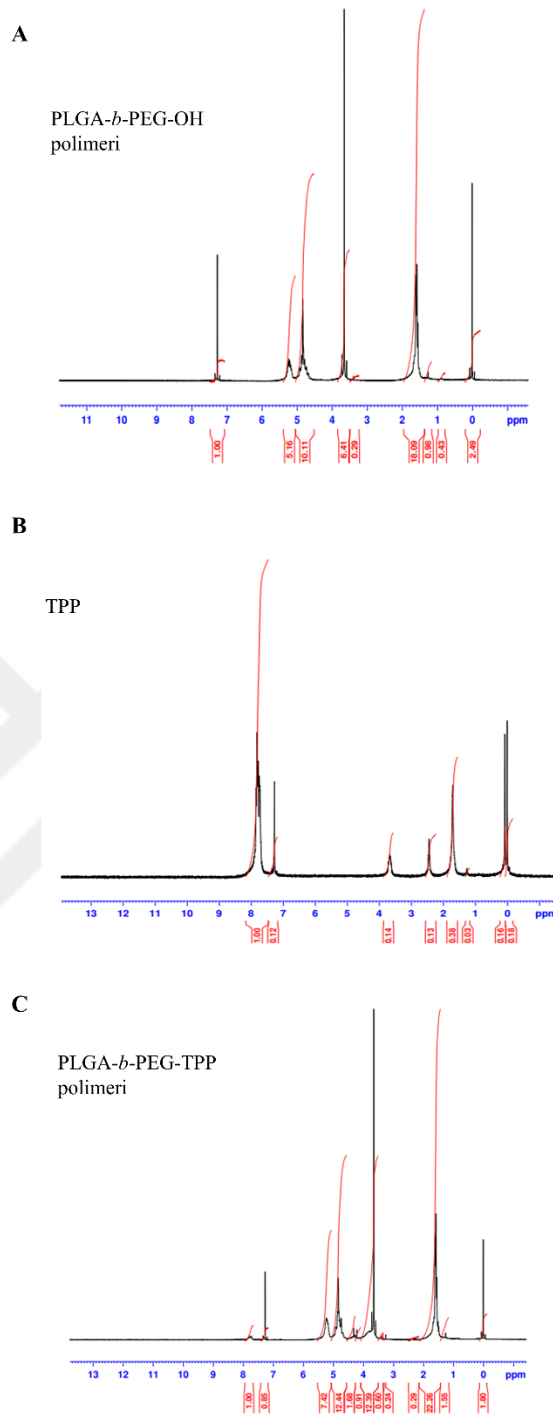
PLGA-*b*-PEG-OH polimerinin TPP molekülü ile konjuge edilmesi sonucu elde edilen PLGA-*b*-PEG-TPP polimerine ait FT-IR spektrumu Şekil 4.10.'da karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Elde edilen spektrumlar incelendiğinde, TPP'nin yapısından gelen P–O–P köprüsüne ait yaklaşık 800 cm<sup>-1</sup> dalga boyundaki asimetrik gerilme titreşimleri, yaklaşık 1000 cm<sup>-1</sup> dalga boyundaki PO<sub>3</sub> grubunun simetrik ve

asimetrik gerilme titreşimlerini,  $1130\text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki simetrik ve asimetrik gerilme titreşimleri  $\text{O}=\text{P}=\text{O}$  grubunun varlığını ve  $1210\text{ cm}^{-1}$  dalga boyundaki  $\text{P}=\text{O}$  gerilme titreşimlerini göstermektedir. Ayrıca  $900\text{--}675\text{ cm}^{-1}$  dalga boyunda görülen çoklu pikler aromatik yapıların C-H bağlarını doğrulamaktadır.  $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında görülen karbonil gruplarının TPP konjugasyonu sonrası PLGA-*b*-PEG-TPP yapısında yarattığı kayma da bağlanmayı doğrular niteliktedir.



**Şekil 4.10.** PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimerlerinin ve TPP molekülünün FT-IR spektrumları.

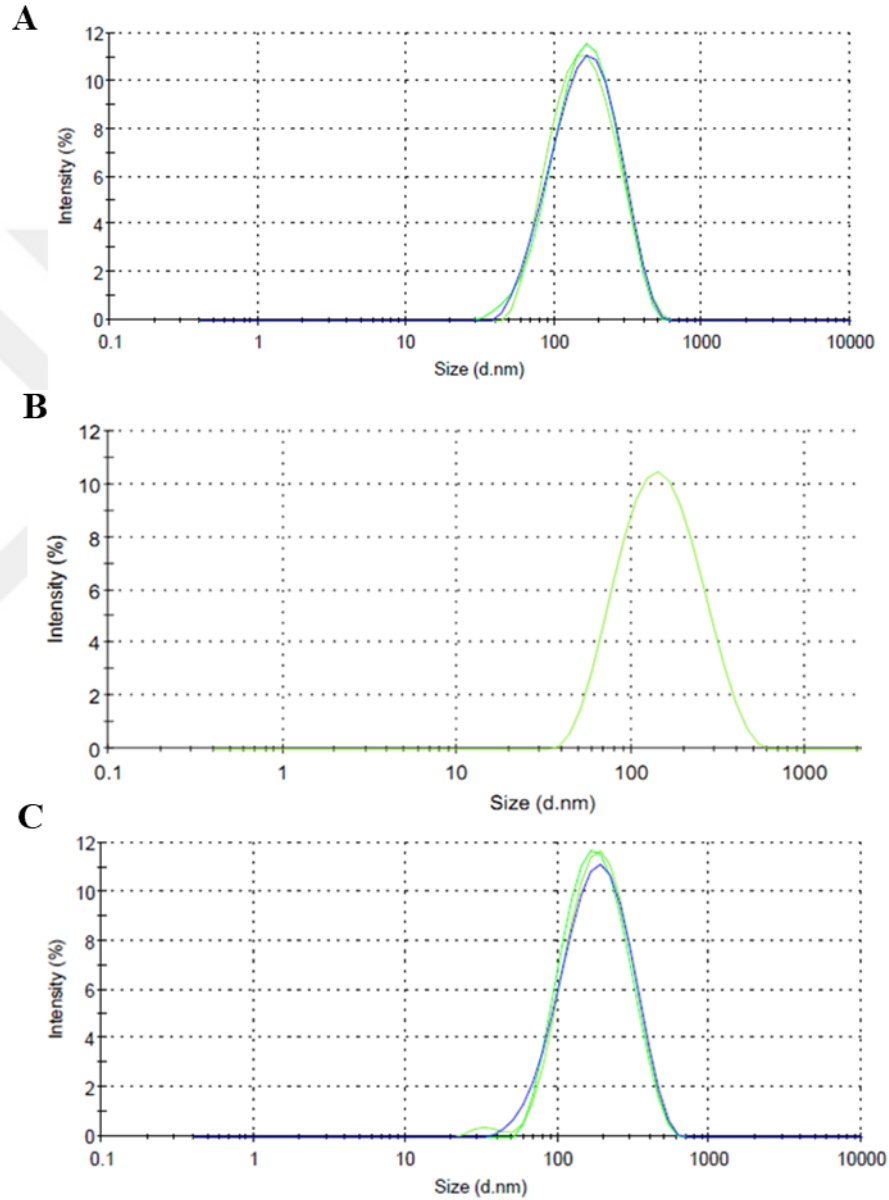
PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimerlerinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu, TPP molekülünün polimer ile konjugasyonunu göstermektedir (Şekil 4.11.). PLGA-*b*-PEG-OH  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1,30-1,70 (laktik asit,  $-\text{OCHCH}_3\text{COO}-$ ), 3,60-3,80 (PEG,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 4,70-4,90 (glikolik asit,  $\text{HOCH}_2\text{CO}-$ ), 5,20-5,30 (laktik asit,  $-\text{OCHCH}_3\text{COO}-$ ), 7,20-7,40 (d-kloroform,  $\text{CDCl}_3$ ). PLGA-*b*-PEG-TPP  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1,30-1,70 (laktik asit,  $-\text{OCHCH}_3\text{COO}-$ ), 3,30-3,80 (PEG,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ ), 4,20-4,90 (glikolik asit,  $\text{HOCH}_2\text{CO}-$ ), 5,20-5,30 (laktik asit,  $-\text{OCHCH}_3\text{COO}-$ ), 7,20-7,40 (d-kloroform,  $\text{CDCl}_3$ ) ve 7,70-7,90 (TPP,  $\text{PPh}_3^+$ ) (96, 103). 7,70-7,90 aralığındaki  $\text{PPh}_3^+$  pikinin TPP NMR spektrumu ile korelasyonu, TPP molekülünün PLGA-*b*-PEG-OH polimerine bağlandığını doğrulamaktadır.



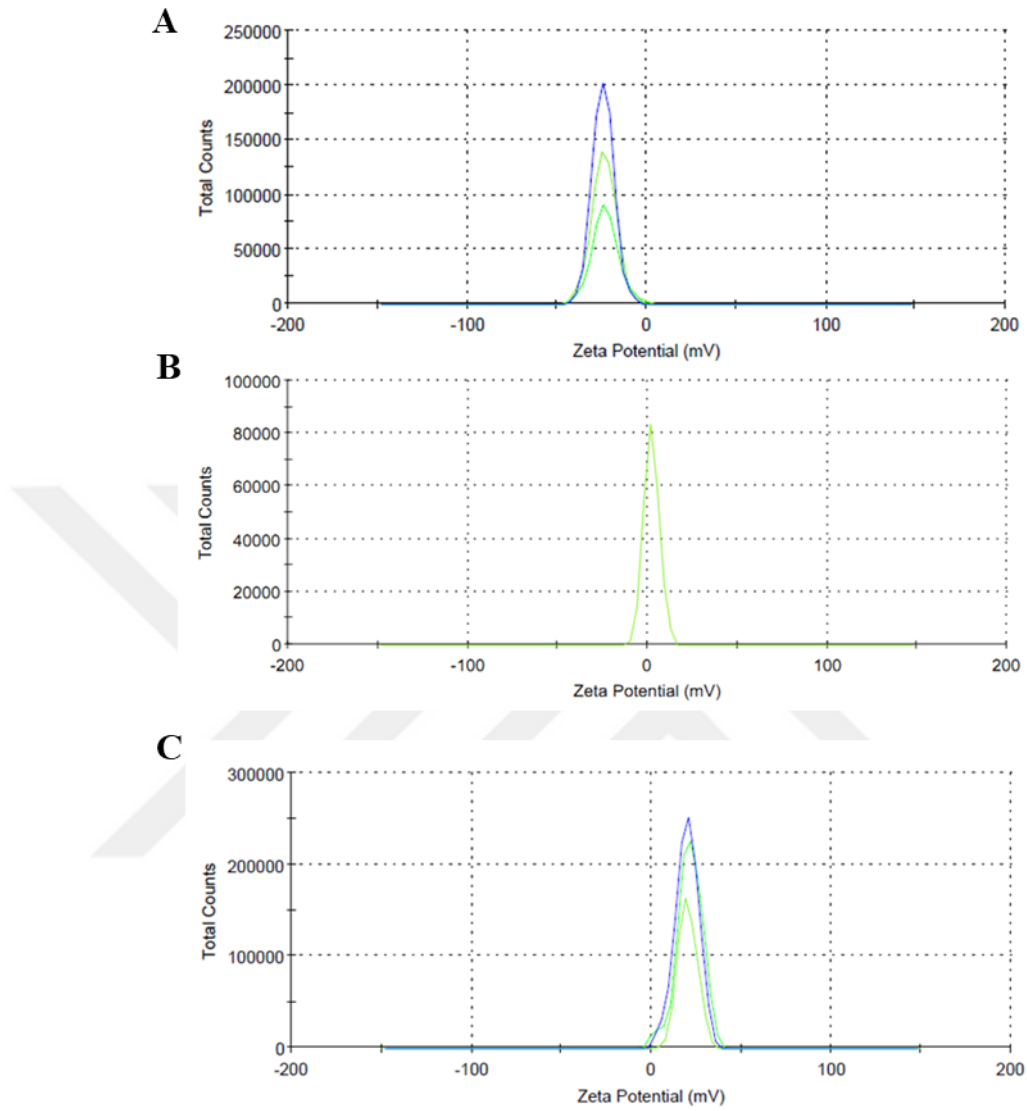
**Şekil 4.11.** PLGA-*b*-PEG-OH polimeri, TPP molekülü ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimerinin NMR spektrumları. **A)** PLGA-*b*-PEG-OH polimerinin NMR spektrumu. **B)** TPP molekülünün NMR spektrumu. **C)** PLGA-*b*-PEG-TPP polimerinin NMR spektrumu.

#### 4.4.2. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Dağılımının İncelenmesi

PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait partikül büyüklüğü ve dağılımları Şekil 4.12.'de, zeta potansiyel grafikleri Şekil 4.13.'te gösterilmiştir. Üç farklı formülasyona ait detaylar Tablo 4.3.'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.12.** PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait partikül büyüklüğü ve dağılımını gösteren grafikler. **A)** NP9, **B)** NP10, **C)** NP11'e ait partikül büyüklüğü ve dağılımını gösteren grafik.



**Şekil 4.13.** PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait zeta potansiyel grafikleri. **A)** NP9, **B)** NP10, **C)** NP11'e ait partikül büyüklüğü ve dağılımını gösteren grafik.

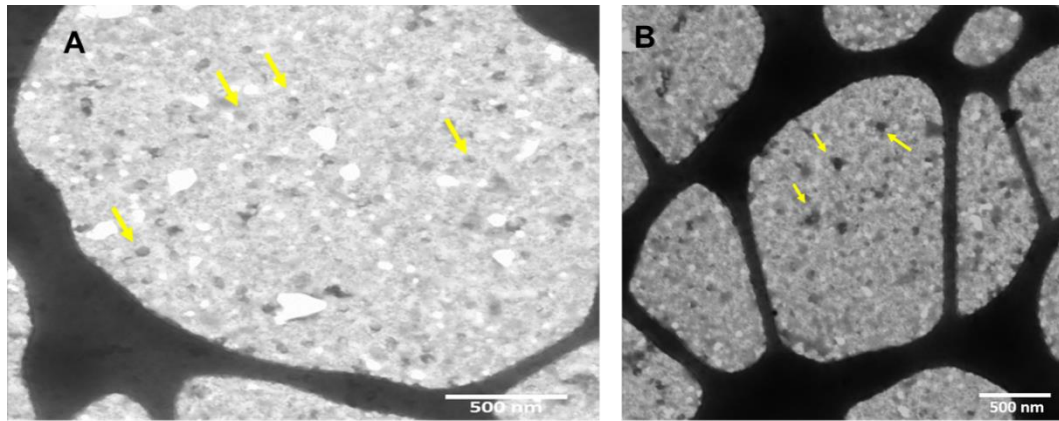
**Tablo 4.3.** PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP NP'lerin ortalama boyut, PDI, zeta potansiyel değerleri.

| Nanopartikül formülasyonu      | TPP:polimer oranı | Boyut (nm) | Zeta Potansiyel (mV) | PDI   |
|--------------------------------|-------------------|------------|----------------------|-------|
| PLGA- <i>b</i> -PEG-OH (NP9)   | -                 | 141±2.8    | -26.9                | 0.183 |
| PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP (NP10) | 1:2               | 131±7.2    | +2.24                | 0.237 |
| PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP (NP11) | 1:1               | 157.8±0.87 | +20.3                | 0.187 |

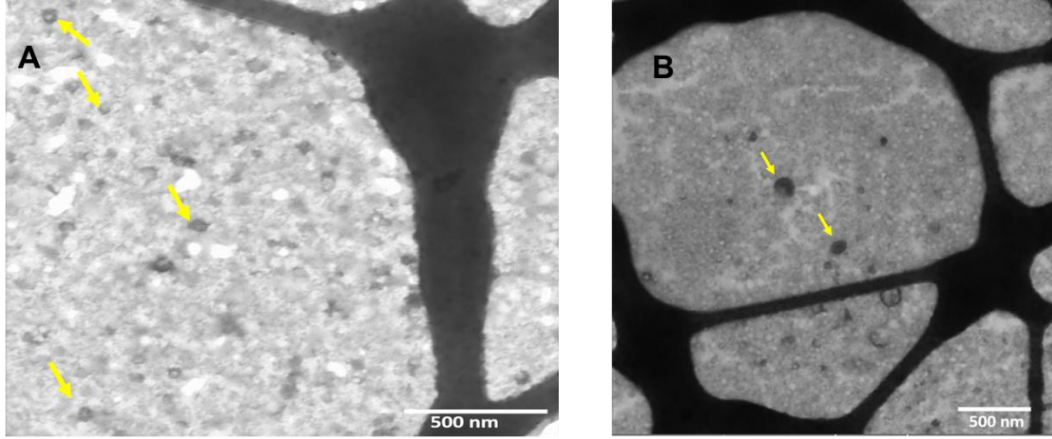
CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lerin mitokondriye hedeflendirilmesi için boyutlarının 200 nm'den daha küçük olması gerekmektedir (96). Elde edilen NP'lerin boyutları bu şarta uygundur. NP'lerin yüzey yükünü gösteren zeta potansiyel değerleri PLGA-*b*-PEG-OH polimeri ile hazırlanan partiküllerde negatif iken PLGA-*b*-PEG-OH polimerine TPP molekülünün konjuge edildiği polimer ile hazırlanan NP'lerin yüzey yükü pozitif hale gelmiştir. Polimere konjuge edilen TPP miktarı arttıkça partikül boyutları ve zeta potansiyel değeri de artmıştır. NP'lerin mitokondriye hedeflendirilebilmesi için yüzey yüklerinin pozitif olması gerekmektedir. Bunun için en ideal zeta potansiyel değerleri yaklaşık +22 mV civarındadır (96). Sentezlenen CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lerden NP11 formülasyonu mitokondriye hedeflendirme için uygun boyutlara (<200 nm) ve zeta potansiyel değerine (~20 mV) sahip olduğu için deneylerde bu formülasyon kullanılmıştır.

#### 4.5. CoQ<sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin Morfolojisi

PLGA-*b*-PEG ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimerleri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü ve yüklü olmayan NP'lerin STEM görüntüleri Şekil 4.14. ve 4.15.'te gösterilmiştir. Elde edilen NP'ler mitokondriye hedeflendirme için istenen boyut (<200 nm) ve morfolojik özelliklere sahiptir.



**Şekil 4.14.** PLGA-*b*-PEG-OH polimeri ile hazırlanan **A)** yüklü olmayan ve **B)** CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait STEM görüntüleri.

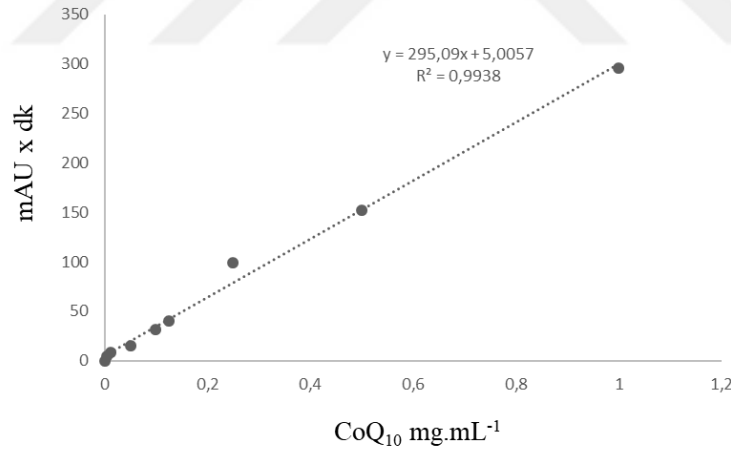


**Şekil 4.15.** PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan **A)** yüklü olmayan ve **B)** CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait STEM görüntüleri.

#### 4.6. CoQ<sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllere Yüklenen CoQ<sub>10</sub> Miktarı

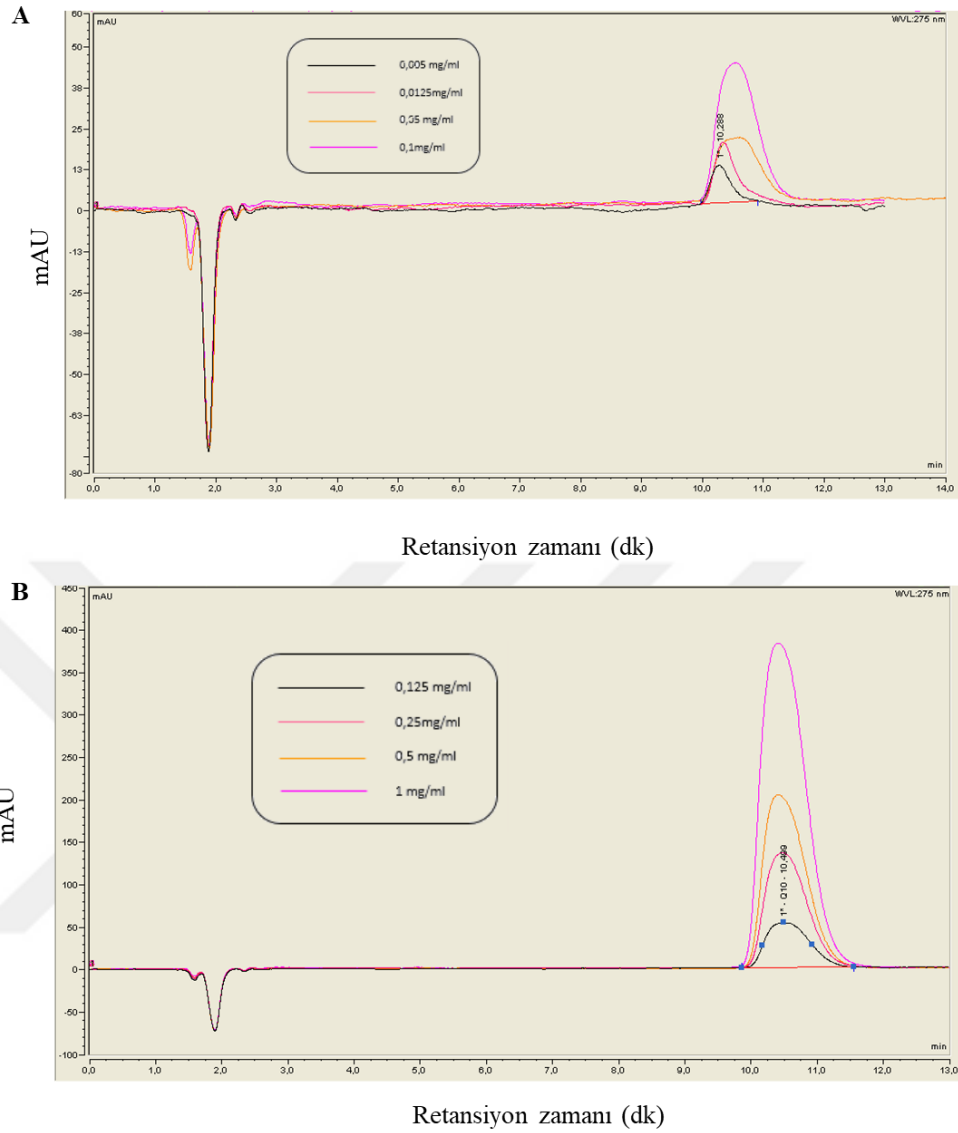
##### 4.6.1. CoQ<sub>10</sub>' a ait Kalibrasyon Doğrusu

CoQ<sub>10</sub>'a ait kalibrasyon doğrusu Şekil 4.16.'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.16.** CoQ<sub>10</sub>'a ait kalibrasyon doğrusu.

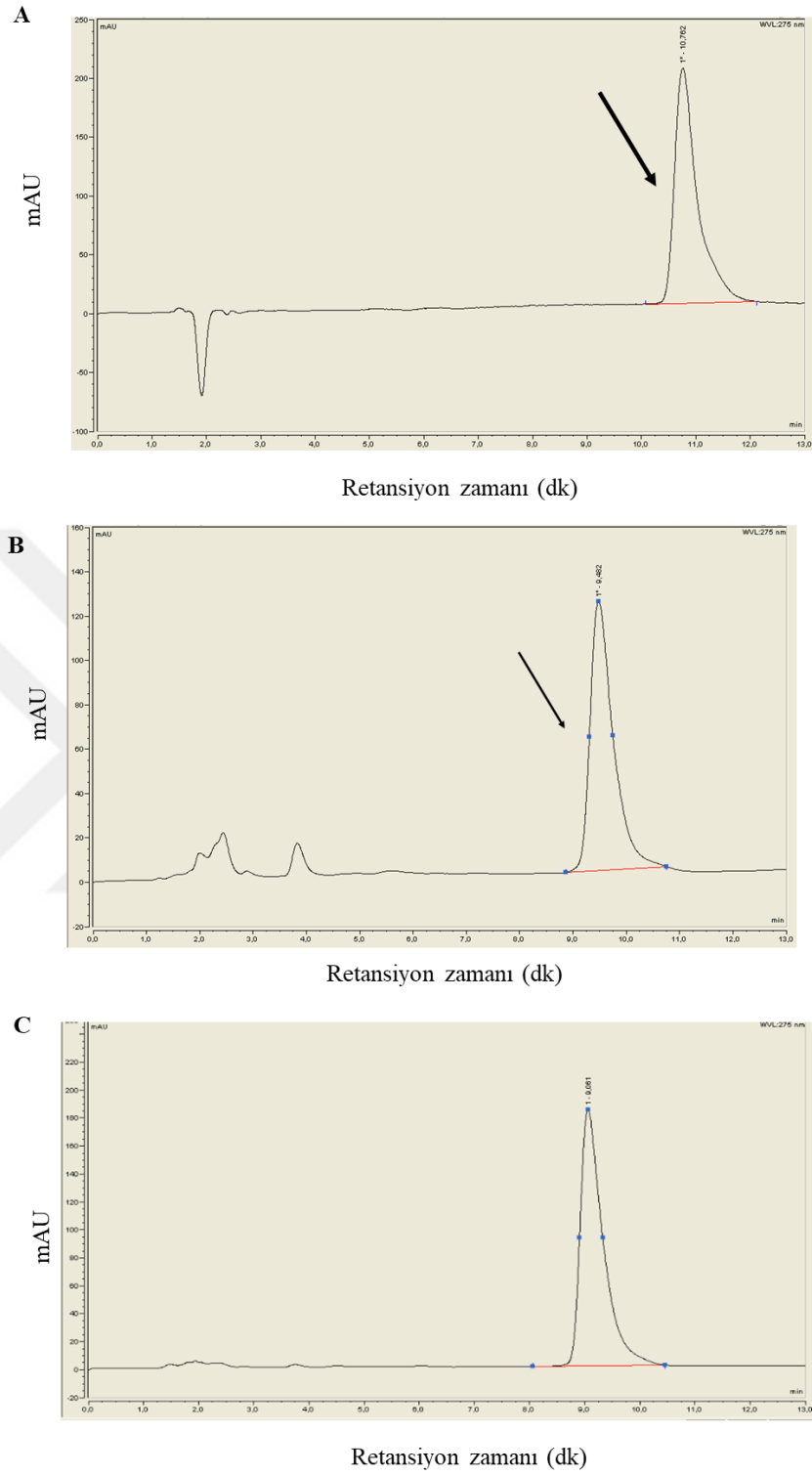
0,005; 0,0125; 0,05; 0,1; 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg.mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> içeren standartlara ait HPLC kromatogramları Şekil 4.17.'de gösterilmiştir. Pikler miktar tayinine olanak verecek şekilde simetrik olup pik alanları cihaz tarafından otomatik hesaplanmıştır.



**Şekil 4.17.** CoQ<sub>10</sub> içeren standartlara ait HPLC kromatogramları. **A)** 0,005; 0,0125; 0,05; 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> içeren, **B)** 0,125; 0,25; 0,5; 1 mg.mL<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> içeren standart çözeltilere ait kromatogram.

#### 4.6.2. CoQ<sub>10</sub> Enkapsülasyon Etkinliği

PLGA-*b*-PEG-OH ve PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri kullanılarak hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lerin HPLC kromatogramları Şekil 4.18.'de gösterilmiştir. NP'lerin CoQ<sub>10</sub> enkapsülasyon etkinliği Tablo 4.4.'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.18.** CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lerin HPLC kromatogramları. **A)** PLGA-*b*-PEG-OH polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait (NP9), **B)** PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait, **C)** PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lere ait (NP11) kromatogramı.

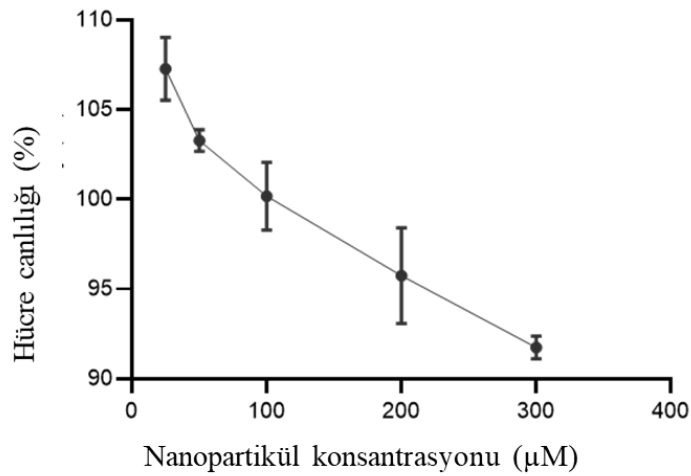
**Tablo 4.4.** Nanopartiküllere CoQ<sub>10</sub> enkapsülasyon etkinliği.

| Nanopartikül | Formülasyon             | TPP:polimer oranı | Enkapsülasyon Etkinliği (%) |
|--------------|-------------------------|-------------------|-----------------------------|
| NP9          | PLGA- <i>b</i> -PEG-OH  | -                 | 91                          |
| NP10         | PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP | 1:2               | 82                          |
| NP11         | PLGA- <i>b</i> -PEG-TPP | 1:1               | 40                          |

NP'lerin enkapsülasyon etkinlikleri değerlendirildiğinde PLGA-*b*-PEG-OH polimerine TPP molekülünün konjuge edilmesi sonucu partiküllere yüklenen ilaç miktarının azaldığı görülmüştür. Polimere bağlanan TPP miktarı arttıkça enkapsülasyon etkinliği azalmaktadır ancak elde edilen ilaç yükleme yüzdesi çalışmanın amacına uygundur.

#### 4.7. CoQ<sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

CoQ<sub>10</sub> yüklü PLGA-*b*-PEG-TPP NP'lerin sitotoksik etkilerini belirlemek için XTT testi yapılmıştır. Hücrelere 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM ve 300 µM dozlarında NP uygulaması yapılmıştır. Şekil 4.19.'da farklı dozlarda NP uygulanan HK-2 hücrelerinin canlılık oranları gösterilmiştir.



**Şekil 4.19.** PLGA-*b*-PEG-TPP polimeri ile hazırlanan CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'ler (NP11) ile muamele edilen HK-2 hücre hattına ait canlılık grafiği.

#### 4.8. CoQ<sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin COQ8B<sup>-/-</sup> HK-2 Hücre Hattı Üzerindeki Etkilerinin Metabolomik Yaklaşımla Değerlendirilmesi

HK-2 kontrol hücre grubu, siRNA, siRNA+Serbest CoQ<sub>10</sub>, siRNA+ CoQ<sub>10</sub>-NP (NP9) ve siRNA+CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11) hücre gruplarından edilen metabolomiks verilerine PCA analizleri uygulanmış ve veri setinde herhangi bir sistemik hata veya aykırı bir değer olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.5.'te sunulmuştur.

**Tablo 4.5.** GC-MS sonucunda tanımlanan metabolitler ve bağıl derişimleri.

| Metabolitler          | Kontrol   | COQ8B <sup>-/-</sup> | CoQ <sub>10</sub>       | CoQ <sub>10</sub> -NP (NP9) | CoQ <sub>10</sub> -TPP-NP (NP11) |
|-----------------------|-----------|----------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 2-amino-1-feniletanol | 0.75±0.02 | 1.54±0.11**          | 0.78±0.02 <sup>ψψ</sup> | 1.58±0.06                   | 0.35±0.06                        |
| 2-hidroksibenzilalkol | 1.48±0.06 | 1.00±0.04**          | 1.12±0.01 <sup>ψ</sup>  | 0.74±0.03                   | 0.66±0.36 <sup>ψ</sup>           |
| 2-ketoizokaproik asit | 1.17±0.04 | 1.42±0.01**          | 1.28±0.02 <sup>ψ</sup>  | 0.71±0.01                   | 0.42±0.11 <sup>ψ</sup>           |
| Alanin                | 1.08±0.05 | 1.15±0.02            | 0.97±0.04 <sup>ψ</sup>  | 0.83±0.01                   | 0.97±0.08                        |
| Allo-inozitol         | 0.46±0.01 | 1.37±0.01**          | 1.77±0.01 <sup>ψψ</sup> | 1.40±0.01                   | 0.01±0.00 <sup>ψψ</sup>          |
| Aspartik asit         | 1.25±0.05 | 1.08±0.03*           | 0.99±0.02               | 0.87±0.03                   | 0.82±0.01 <sup>ψ</sup>           |
| Beta- alanin          | 1.19±0.04 | 1.07±0.03            | 0.95±0.03 <sup>ψ</sup>  | 0.80±0.01                   | 0.99±0.02 <sup>ψ</sup>           |
| Beta-gliserolfosfat   | 0.94±0.02 | 0.97±0.01            | 0.99±0.01               | 0.88±0.01                   | 1.22±0.02                        |
| Kolesterol            | 1.14±0.03 | 0.96±0.02*           | 1.01±0.04               | 0.75±0.02                   | 1.15±0.03 <sup>ψ</sup>           |
| Sitrik asit           | 0.77±0.01 | 0.97±0.05*           | 1.20±0.04 <sup>ψ</sup>  | 1.48±0.02                   | 0.58±0.06 <sup>ψψ</sup>          |
| D-(+) trehaloz        | 0.40±0.03 | 0.54±0.04*           | 0.50±0.01               | 1.55±0.02                   | 2.01±0.06 <sup>ψ</sup>           |
| D-alloz               | 1.05±0.03 | 1.17±0.00*           | 1.17±0.01               | 0.98±0.01                   | 0.63±0.01 <sup>ψ</sup>           |
| D-glukoz              | 0.94±0.03 | 1.32±0.02**          | 1.19±0.01 <sup>ψψ</sup> | 1.06±0.01                   | 0.48±0.01 <sup>ψψ</sup>          |
| D-izolösin            | 0.88±0.05 | 1.28±0.02**          | 1.20±0.01 <sup>ψ</sup>  | 1.07±0.01                   | 0.58±0.01 <sup>ψψ</sup>          |
| D-malik asit          | 1.09±0.02 | 0.91±0.01**          | 1.15±0.02 <sup>ψψ</sup> | 0.94±0.01                   | 0.91±0.02                        |
| D-mannoz              | 1.4±0.08  | 1.40±0.10            | 1.10±0.04 <sup>ψ</sup>  | 0.59±0.03                   | 0.50±0.10 <sup>ψ</sup>           |
| D-sorbitol            | 0.40±0.1  | 0.75±0.04*           | 0.94±0.06 <sup>ψ</sup>  | 1.17±0.05                   | 1.74±0.1 <sup>ψ</sup>            |
| D-treitol             | 0.87±0.05 | 0.95±0.02            | 1.18±0.03 <sup>ψψ</sup> | 1.02±0.01                   | 0.98±0.00 <sup>ψ</sup>           |
| Fruktoz               | 0.56±0.02 | 0.98±0.01**          | 1.29±0.02 <sup>ψψ</sup> | 1.06±0.01                   | 1.11±0.01 <sup>ψψ</sup>          |
| Fumarik asit          | 1.45±0.05 | 0.89±0.02**          | 1.05±0.03 <sup>ψ</sup>  | 0.65±0.01                   | 0.97±0.03 <sup>ψψ</sup>          |

|                                     |           |             |                       |           |                       |
|-------------------------------------|-----------|-------------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| <b>Glukonik asit</b>                | 1.00±0.04 | 1.46±0.05** | 1.14±0.02 $\Psi \Psi$ | 0.99±0.01 | 0.41±0.02 $\Psi$      |
| <b>Gliserol 1-fosfat</b>            | 1.00±0.01 | 0.94±0.02*  | 0.96±0.01             | 0.84±0.01 | 1.26±0.01 $\Psi$      |
| <b>Glisin</b>                       | 1.09±0.03 | 1.03±0.02   | 1.01±0.01             | 0.85±0.01 | 1.02±0.06             |
| <b>Hipotaurin</b>                   | 1.16±0.06 | 1.04±0.02   | 0.93±0.03 $\Psi$      | 0.83±0.02 | 1.04±0.01 $\Psi$      |
| <b>İzolösin</b>                     | 0.89±0.05 | 1.27±0.02** | 1.20±0.02 $\Psi$      | 1.05±0.01 | 0.59±0.01 $\Psi \Psi$ |
| <b>L-(+) laktik asit</b>            | 0.61±0.15 | 1.39±0.02*  | 1.05±0.05 $\Psi \Psi$ | 1.12±0.02 | 0.83±0.09 $\Psi$      |
| <b>Lösin</b>                        | 0.82±0.04 | 1.50±0.03** | 1.06±0.03 $\Psi \Psi$ | 1.06±0.03 | 0.56±0.05 $\Psi$      |
| <b>L-glutamik asit</b>              | 0.93±0.03 | 1.56±0.07** | 1.04±0.01 $\Psi \Psi$ | 0.88±0.01 | 0.59±0.05 $\Psi$      |
| <b>L-homoserin</b>                  | 3.00±1.28 | 0.97±0.20   | 0.44±0.02 $\Psi$      | 0.25±0.01 | 0.34±0.03             |
| <b>L-metiyonin</b>                  | 0.86±0.02 | 1.44±0.03** | 1.06±0.01 $\Psi \Psi$ | 1.06±0.01 | 0.58±0.02 $\Psi \Psi$ |
| <b>L-pirolglutamik asit</b>         | 0.92±0.02 | 1.28±0.02** | 1.12±0.02 $\Psi$      | 1.05±0.01 | 0.62±0.02 $\Psi \Psi$ |
| <b>L-serin</b>                      | 0.81±0.04 | 2.37±0.54*  | 0.62±0.03 $\Psi$      | 0.66±0.05 | 0.54±0.03 $\Psi$      |
| <b>L-treonin</b>                    | 0.68±0.03 | 2.46±0.45*  | 0.61±0.02 $\Psi$      | 0.73±0.06 | 0.52±0.03             |
| <b>L-tirozin</b>                    | 0.72±0.01 | 1.53±0.07** | 0.98±0.03 $\Psi \Psi$ | 1.3±0.02  | 0.47±0.02 $\Psi \Psi$ |
| <b>L-valin</b>                      | 0.89±0.04 | 1.39±0.02** | 1.11±0.03 $\Psi \Psi$ | 1.01±0.01 | 0.60±0.05 $\Psi$      |
| <b>Lizin</b>                        | 0.64±0.01 | 1.77±0.11** | 0.93±0.03 $\Psi \Psi$ | 1.44±0.02 | 0.22±0.03 $\Psi \Psi$ |
| <b>Miyo-inozitol</b>                | 1.35±0.04 | 1.10±0.03*  | 0.90±0.01 $\Psi \Psi$ | 0.70±0.00 | 0.95±0.01 $\Psi \Psi$ |
| <b>Miristik asit</b>                | 1.23±0.04 | 0.75±0.04** | 0.78±0.03             | 0.95±0.03 | 1.29±0.04 $\Psi \Psi$ |
| <b>N-asetil-5-hidroksitriptamin</b> | 4.04±1.63 | 0.76±0.25   | 0.01±0.00 $\Psi$      | 0.18±0.01 | 0.01±0.00 $\Psi$      |
| <b>N-asetil-l-aspartik asit</b>     | 1.06±0.07 | 0.94±0.04   | 0.99±0.01             | 0.96±0.02 | 1.04±0.01             |
| <b>N-asetil-l-glutamik asit</b>     | 1.03±0.05 | 1.20±0.04*  | 1.27±0.03             | 0.92±0.02 | 0.58±0.04 $\Psi$      |
| <b>Oleik asit</b>                   | 1.11±0.05 | 0.90±0.03*  | 0.88±0.02             | 0.9±0.01  | 1.21±0.02 $\Psi$      |
| <b>O-fosfokolamin</b>               | 0.54±0.03 | 0.90±0.03** | 0.89±0.02             | 1.12±0.03 | 1.55±0.04 $\Psi \Psi$ |
| <b>Pantotenik asit</b>              | 1±0.03    | 1.19±0.04*  | 1.04±0.02 $\Psi$      | 1.00±0.01 | 0.77±0.01             |
| <b>Fenilalanin</b>                  | 0.77±0.01 | 1.48±0.04** | 1.11±0.01 $\Psi \Psi$ | 1.14±0.01 | 0.5±0.02 $\Psi \Psi$  |
| <b>Fosforik asit</b>                | 1.37±0.07 | 0.86±0.01** | 0.99±0.01 $\Psi \Psi$ | 0.70±0.01 | 1.08±0.02 $\Psi$      |
| <b>Pikolonik asit</b>               | 1.71±0.35 | 0.92±0.03   | 0.89±0.02             | 0.58±0.01 | 0.89±0.05             |
| <b>Serin</b>                        | 1.03±0.04 | 1.11±0.02   | 1.05±0.02             | 0.93±0.01 | 0.88±0.01             |
| <b>Stearik asit</b>                 | 0.86±0.05 | 0.54±0.03*  | 0.45±0.03             | 1.32±0.00 | 1.83±0.04 $\Psi \Psi$ |

|                      |           |             |                        |           |                         |
|----------------------|-----------|-------------|------------------------|-----------|-------------------------|
| <b>Süksinik asit</b> | 1.88±0.17 | 0.59±0.20** | 1.16±0.02 <sup>Ψ</sup> | 0.71±0.02 | 0.66±0.23 <sup>Ψ</sup>  |
| <b>Sükroz</b>        | 1.15±0.06 | 0.86±0.04*  | 0.77±0.02              | 1.05±0.01 | 1.18±0.03 <sup>ΨΨ</sup> |
| <b>Treonin</b>       | 0.97±0.03 | 1.12±0.03*  | 1.1±0.02               | 0.94±0.01 | 0.87±0.01 <sup>Ψ</sup>  |
| <b>Üre</b>           | 1.47±0.06 | 0.93±0.02** | 0.89±0.02              | 0.73±0.07 | 0.98±0.02 <sup>ΨΨ</sup> |
| <b>Valin</b>         | 0.9±0.06  | 1.23±0.03*  | 1.23±0.02              | 1.03±0.01 | 0.62±0.01 <sup>Ψ</sup>  |

(\* P<0,05; \*\* P<0,001 kontrole karşı, <sup>Ψ</sup> P<0,05; <sup>ΨΨ</sup> P<0,001 *COQ8B*<sup>-/-</sup> grubuna karşı)

Yabanıl tip ve *COQ8B*<sup>-/-</sup> HK-2 hücre hatlarından elde edilen metabolit değerleri normalizasyon işlemlerinden sonra t-testi ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4.6.).

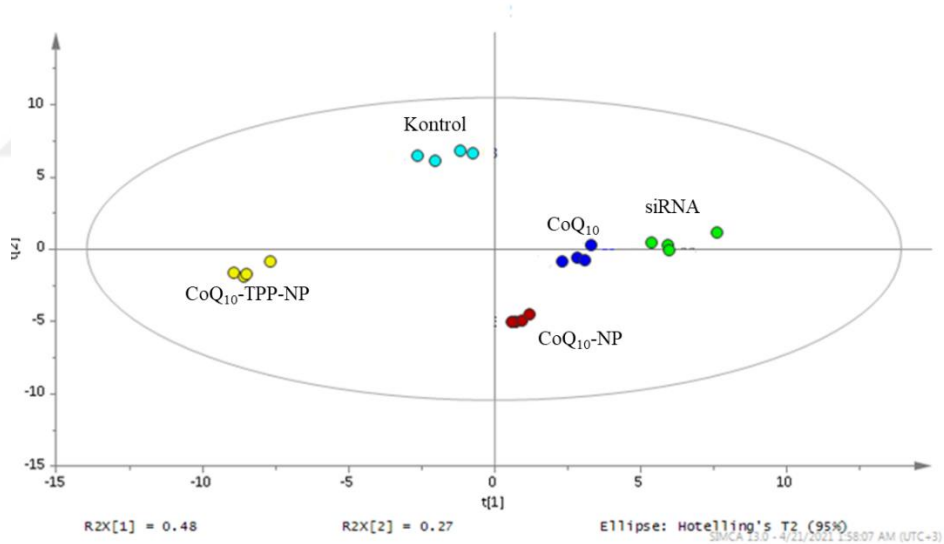
**Tablo 4.6.** Yabanıl tip ve *COQ8B*<sup>-/-</sup> HK-2 hücre hatlarından elde edilen grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmalarına ait P değerleri.

| <b>Metabolitler</b>          | <b>Kontrol/<br/><i>COQ8B</i><sup>-/-</sup></b> | <b><i>COQ8B</i><sup>-/-</sup>/<br/>CoQ<sub>10</sub>-<br/>TPP-NP<br/>(NP11)</b> | <b>Kontrol/<br/>CoQ<sub>10</sub>-<br/>TPP-NP<br/>(NP11)</b> | <b>CoQ<sub>10</sub>/<br/>CoQ<sub>10</sub>-<br/>TPP-NP<br/>(NP11)</b> | <b><i>COQ8B</i><sup>-/-</sup>/CoQ<sub>10</sub></b> | <b>Kontrol/<br/>CoQ<sub>10</sub></b> |
|------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <b>2-amino-1-feniletanol</b> | 0,000                                          | 0,000                                                                          | 0,001                                                       | 0,001                                                                | 0,001                                              | 0,334                                |
| <b>2-hidroksibenzilalkol</b> | 0,001                                          | 0,389                                                                          | 0,068                                                       | 0,258                                                                | 0,040                                              | 0,001                                |
| <b>2-ketoizokaproik asit</b> | 0,001                                          | 0,000                                                                          | 0,001                                                       | 0,000                                                                | 0,002                                              | 0,048                                |
| <b>Alanin</b>                | 0,192                                          | 0,064                                                                          | 0,308                                                       | 0,970                                                                | 0,004                                              | 0,134                                |
| <b>Allo-inozitol</b>         | 0,000                                          | 0,000                                                                          | 0,000                                                       | 0,000                                                                | 0,000                                              | 0,000                                |
| <b>Aspartik asit</b>         | 0,031                                          | 0,000                                                                          | 0,000                                                       | 0,000                                                                | 0,060                                              | 0,003                                |
| <b>Beta- alanin</b>          | 0,059                                          | 0,071                                                                          | 0,005                                                       | 0,254                                                                | 0,032                                              | 0,004                                |
| <b>Beta-gliserolfosfat</b>   | 0,273                                          | 0,000                                                                          | 0,000                                                       | 0,000                                                                | 0,140                                              | 0,065                                |
| <b>Kolesterol</b>            | 0,002                                          | 0,003                                                                          | 0,847                                                       | 0,026                                                                | 0,303                                              | 0,024                                |
| <b>Sitrik asit</b>           | 0,008                                          | 0,002                                                                          | 0,020                                                       | 0,000                                                                | 0,011                                              | 0,000                                |
| <b>D-(+) trehaloz</b>        | 0,038                                          | 0,000                                                                          | 0,000                                                       | 0,000                                                                | 0,436                                              | 0,029                                |
| <b>D-alloz</b>               | 0,010                                          | 0,000                                                                          | 0,000                                                       | 0,000                                                                | 0,982                                              | 0,013                                |
| <b>D-glukoz</b>              | 0,000                                          | 0,000                                                                          | 0,000                                                       | 0,000                                                                | 0,001                                              | 0,000                                |
| <b>D-izolösin</b>            | 0,000                                          | 0,000                                                                          | 0,001                                                       | 0,000                                                                | 0,021                                              | 0,001                                |
| <b>D-malik asit</b>          | 0,000                                          | 0,806                                                                          | 0,001                                                       | 0,000                                                                | 0,000                                              | 0,119                                |
| <b>D-mannoz</b>              | 0,982                                          | 0,001                                                                          | 0,000                                                       | 0,001                                                                | 0,028                                              | 0,018                                |
| <b>D-sorbitol</b>            | 0,016                                          | 0,000                                                                          | 0,000                                                       | 0,000                                                                | 0,039                                              | 0,003                                |
| <b>D-treitol</b>             | 0,228                                          | 0,224                                                                          | 0,089                                                       | 0,000                                                                | 0,001                                              | 0,002                                |

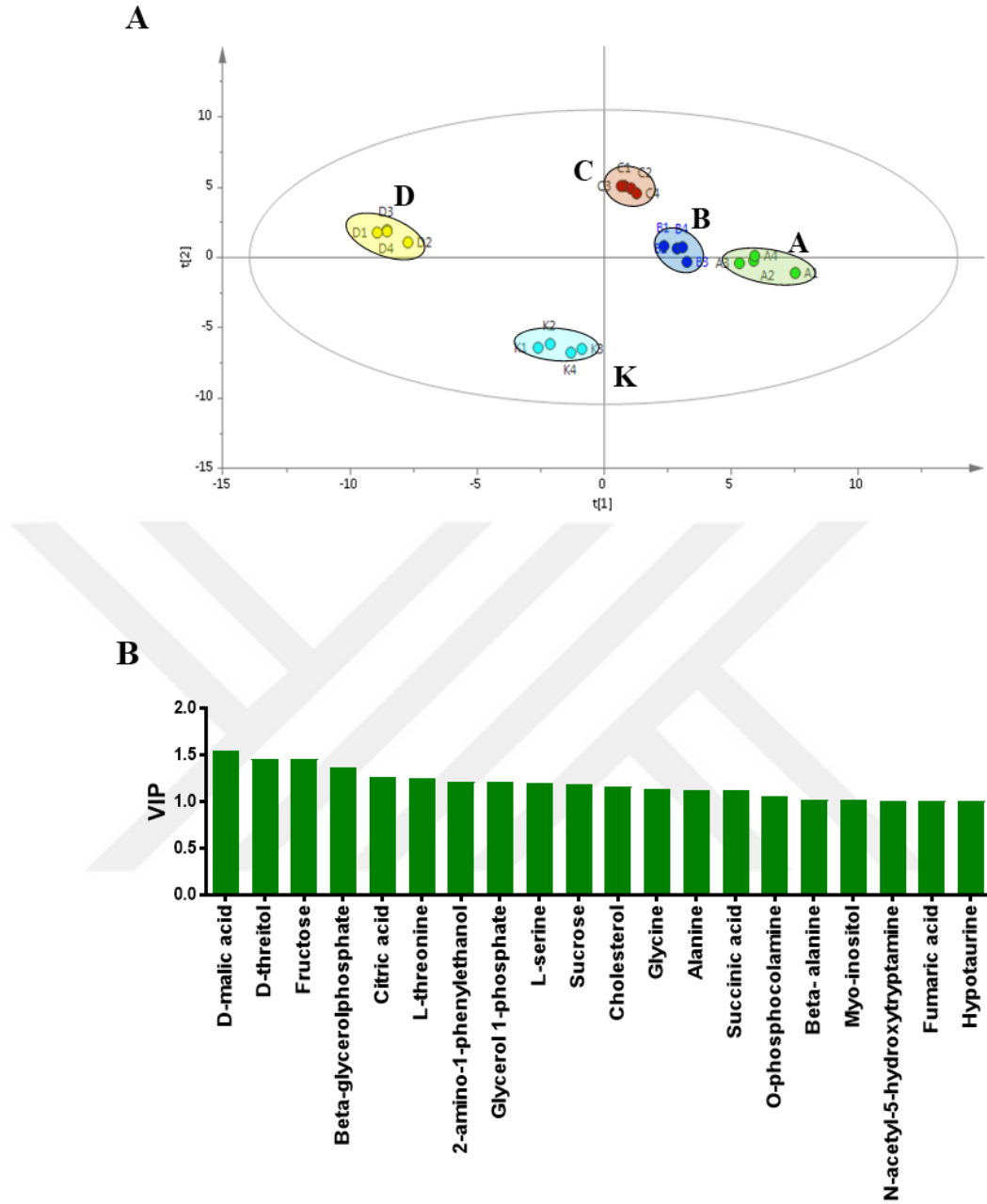
|                                     |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Fruktoz</b>                      | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <b>Fumarik asit</b>                 | 0,000 | 0,066 | 0,000 | 0,103 | 0,006 | 0,001 |
| <b>Glukonik asit</b>                | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,017 |
| <b>Gliserol 1-fosfat</b>            | 0,033 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,461 | 0,018 |
| <b>Glisin</b>                       | 0,213 | 0,802 | 0,344 | 0,958 | 0,424 | 0,099 |
| <b>Hipotaurin</b>                   | 0,126 | 0,881 | 0,106 | 0,014 | 0,021 | 0,017 |
| <b>İzölösın</b>                     | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,040 | 0,001 |
| <b>L-(+) laktik asit</b>            | 0,003 | 0,001 | 0,265 | 0,066 | 0,001 | 0,036 |
| <b>Lösın</b>                        | 0,000 | 0,000 | 0,007 | 0,000 | 0,000 | 0,004 |
| <b>L-glutamik asit</b>              | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,005 |
| <b>L-homoserin</b>                  | 0,170 | 0,019 | 0,083 | 0,036 | 0,035 | 0,093 |
| <b>L-metiyonin</b>                  | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <b>L-piroglutamik asit</b>          | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,002 | 0,001 |
| <b>L-serin</b>                      | 0,027 | 0,014 | 0,001 | 0,123 | 0,017 | 0,009 |
| <b>L-treonin</b>                    | 0,008 | 0,005 | 0,009 | 0,090 | 0,006 | 0,070 |
| <b>L-tirozin</b>                    | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <b>L-valin</b>                      | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,000 | 0,005 |
| <b>Lizin</b>                        | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <b>Miyo-inozitol</b>                | 0,002 | 0,002 | 0,000 | 0,006 | 0,000 | 0,000 |
| <b>Miristik asit</b>                | 0,000 | 0,000 | 0,345 | 0,000 | 0,610 | 0,000 |
| <b>N-asetil-5-hidroksitriptamin</b> | 0,094 | 0,023 | 0,049 | 0,544 | 0,022 | 0,049 |
| <b>N-asetil-l-aspartik asit</b>     | 0,205 | 0,058 | 0,792 | 0,016 | 0,266 | 0,405 |
| <b>N-asetil-l-glutamik asit</b>     | 0,032 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,240 | 0,007 |
| <b>Oleik asit</b>                   | 0,014 | 0,000 | 0,148 | 0,000 | 0,704 | 0,007 |
| <b>O-fosfokolamin</b>               | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,822 | 0,000 |
| <b>Pantotenik asit</b>              | 0,010 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,012 | 0,377 |
| <b>Fenilalanin</b>                  | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| <b>Fosforik asit</b>                | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,011 | 0,000 | 0,002 |
| <b>Pikolonik asit</b>               | 0,065 | 0,640 | 0,059 | 0,950 | 0,466 | 0,058 |
| <b>Serin</b>                        | 0,094 | 0,000 | 0,007 | 0,000 | 0,075 | 0,651 |

|                      |       |       |       |       |       |       |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Stearik asit</b>  | 0,002 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,107 | 0,001 |
| <b>Süksinik asit</b> | 0,002 | 0,822 | 0,005 | 0,067 | 0,027 | 0,005 |
| <b>Sükroz</b>        | 0,004 | 0,000 | 0,570 | 0,000 | 0,072 | 0,001 |
| <b>Treonin</b>       | 0,006 | 0,000 | 0,018 | 0,000 | 0,564 | 0,006 |
| <b>Üre</b>           | 0,000 | 0,149 | 0,000 | 0,027 | 0,167 | 0,000 |
| <b>Valin</b>         | 0,002 | 0,000 | 0,003 | 0,000 | 0,912 | 0,002 |

GC-MS temelli metabolomik analizler sonucunda elde edilen veri matrisleri farklı normalizasyon teknikleri kullanılarak normalize edilmiştir. Daha sonra bu veri matrisi SIMCA-P+ programına aktarılarak; PCA analizleri uygulanmış ve veri setinde herhangi bir sistemik hata veya aykırı bir değer olup olmadığı araştırılmıştır (Şekil 4.20.). Aykırı değerler uzaklaştırıldıktan sonra PLS-DA analizleri gerçekleştirilerek grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler belirlenmiştir (Şekil 4.21.).



**Şekil 4.20.** HK-2 hücrelerine ait metabolomiks verilerine ait PCA skor grafiği (Turkuaz: Kontrol, Yeşil: siRNA, Mavi: siRNA+Serbest CoQ<sub>10</sub>, Kırmızı: siRNA+CoQ<sub>10</sub>-NP (NP9), Sarı: siRNA+CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11)).

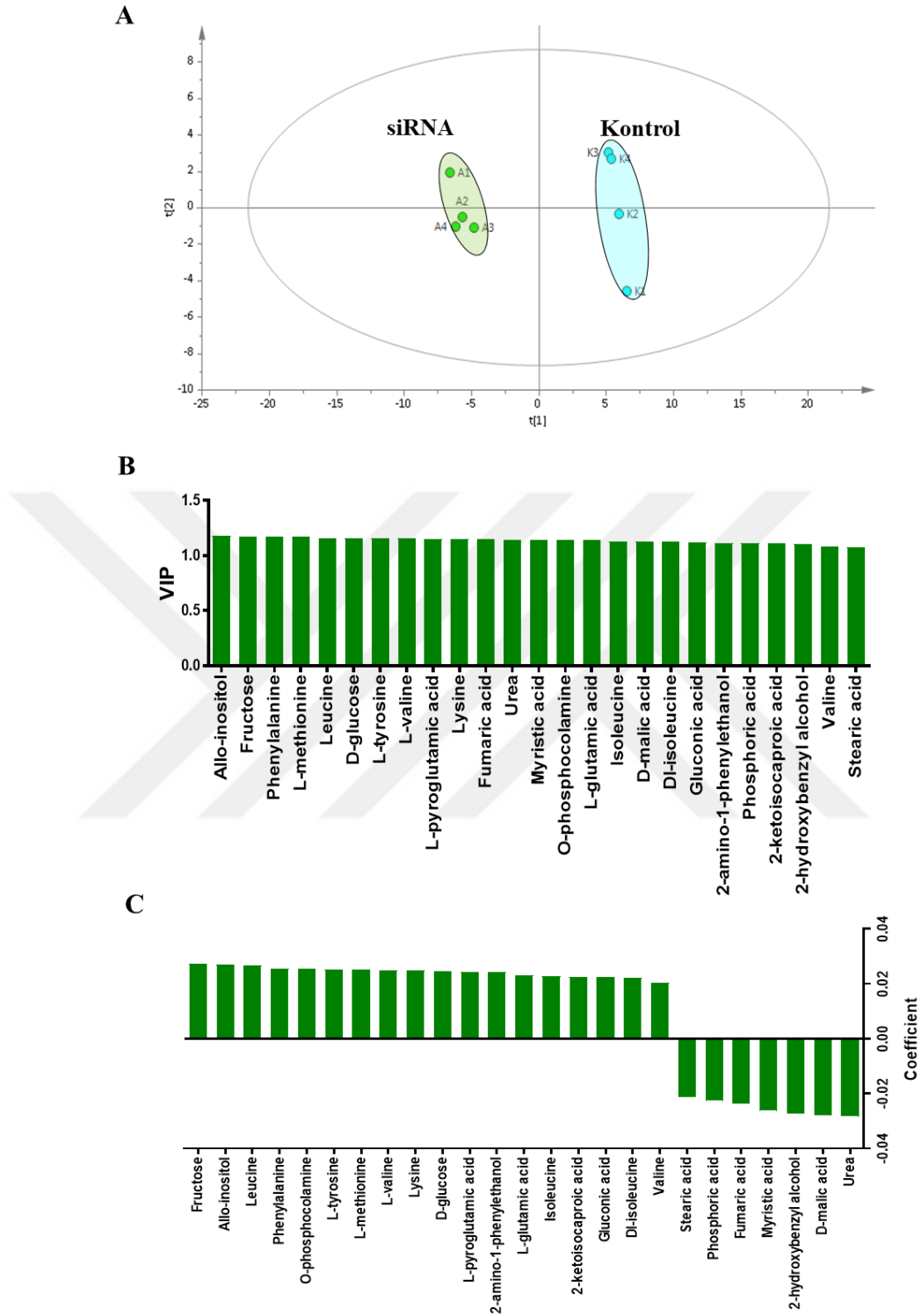


**Şekil 4.21.** HK-2 hücrelerinde gerçekleştirilen metabolomiks analiz verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği, **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği (**K:** Kontrol, **A:** siRNA, **B:** siRNA+Serbest CoQ<sub>10</sub>, **C:** siRNA+CoQ<sub>10</sub>-NP (NP9), **D:** siRNA+CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11)).

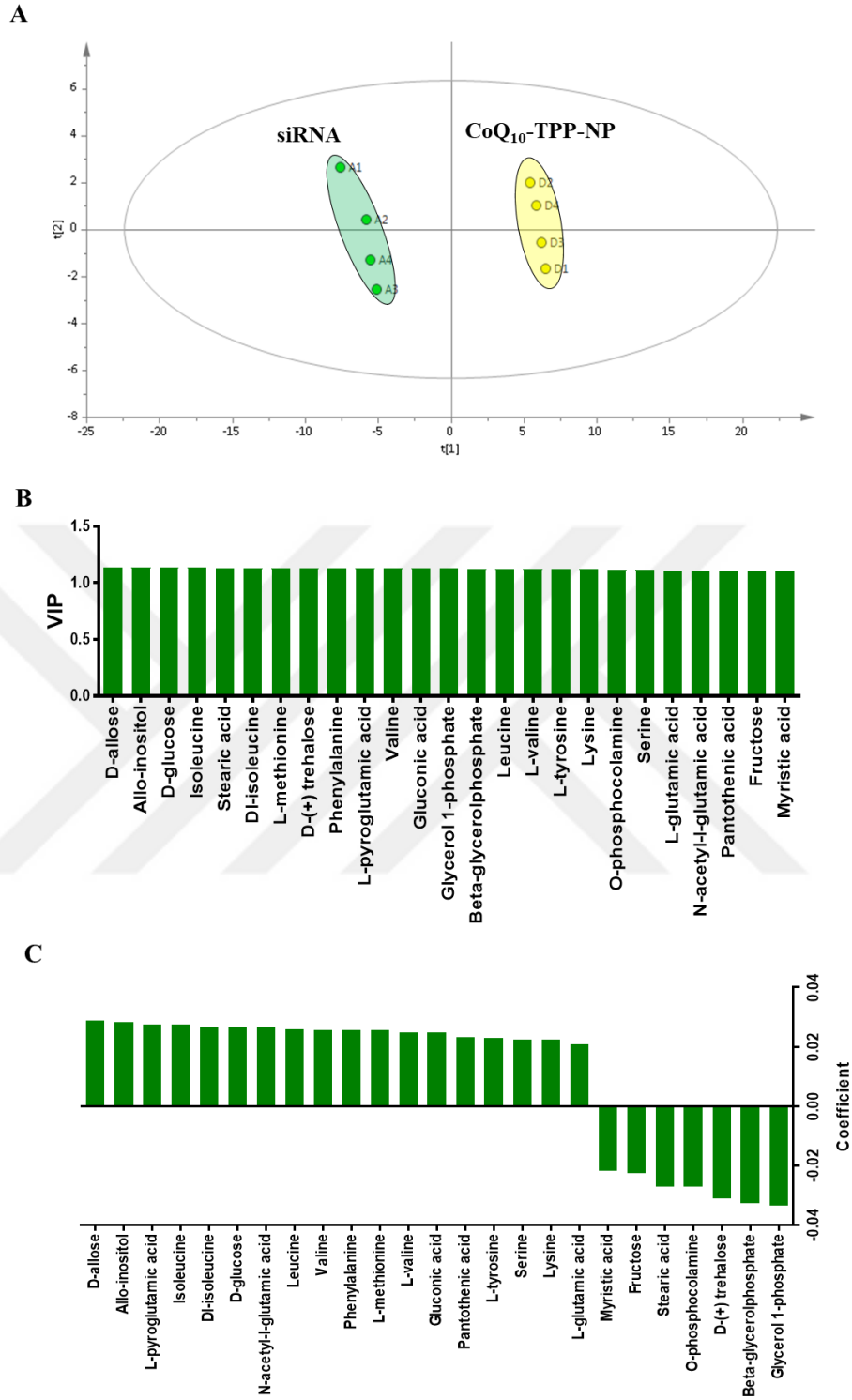
PLS-DA skor grafiğinde tespit edilen metabolitlerdeki farklılıklarla 5 grubun (kontrol, siRNA uygulaması, CoQ<sub>10</sub>-NP (NP9), CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11) ve serbest CoQ<sub>10</sub> uygulamaları) birbirinden net olarak ayrılabilirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.22.-A). HK-2 hücre hattında siRNA aracılığı ile *COQ8B* geninin susturulması sonucu

analiz edilen metabolitler grafikte sağ üst kadrana doğru kayarak kontrol grubunun yer aldığı sol alt kadrandan uzaklaşmıştır. *COQ8B*<sup>-/-</sup> hücre hattına CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP uygulanması sonucu metabolitler sol üst kadrana kayarak kontrol grubuna yaklaşmıştır. Serbest CoQ<sub>10</sub> ve CoQ<sub>10</sub>-NP (NP9) ise siRNA grubu ile aynı kadranda yer almaktadır.

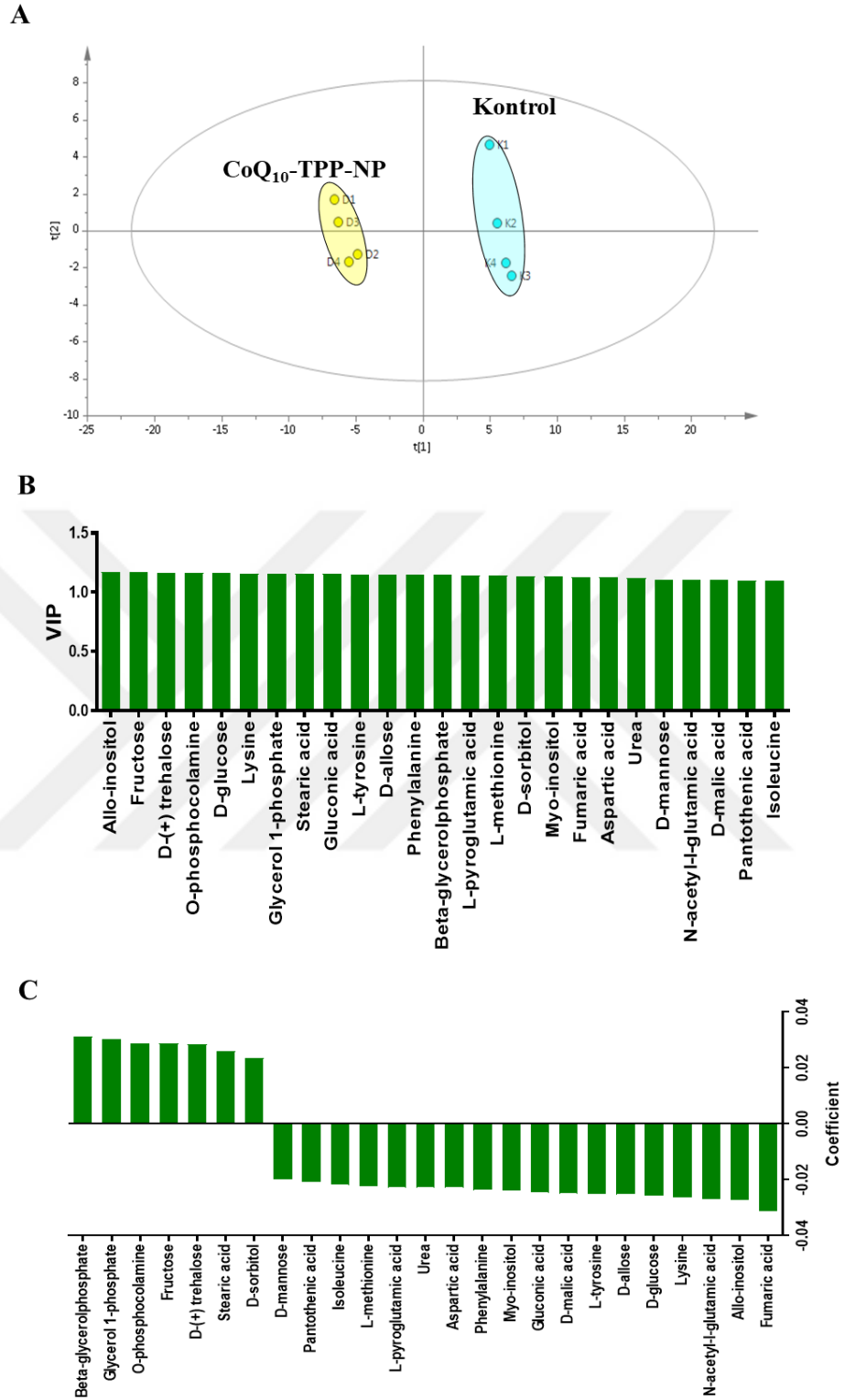
Farklı deney gruplarındaki hücrelerin metabolomik profilleri ikili gruplar halinde karşılaştırılmış ve PLS-DA skor grafikleri oluşturulmuştur. PLS-DA analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin belirlenmesi için VIP (projede önemli değişken) grafiğinden yararlanılmıştır. Bu grafik iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda değişim gösteren ( $P < 0,05$ ) metabolitleri P değerlerine göre küçükten büyüğe doğru sıralamaktadır. Elde edilen PLS-DA modellerinin güvenilirliği  $R^2$  ve tahmin edebilme değerleri  $Q^2$  ile gösterilmiştir. Grupların ikişerli olarak karşılaştırıldığı PLS-DA skor grafiği, VIP grafiği ve düzeyleri azalan/artan metabolitlerin gösterildiği garfikler şekil 4.22.-4.27.'de gösterilmiştir.



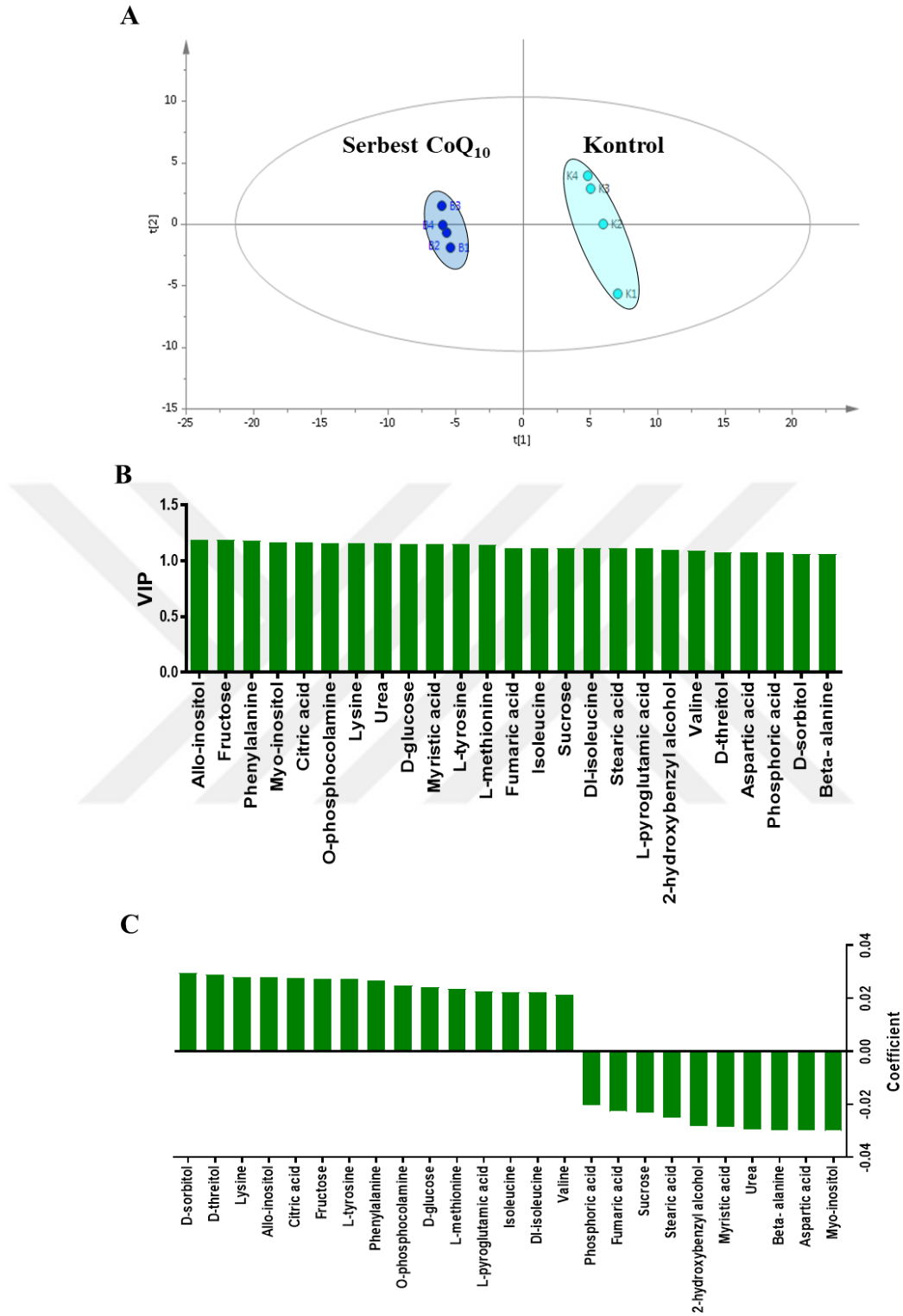
**Şekil 4.22.** HK-2 kontrol grubu ile siRNA uygulaması yapılan hücre grubunun metabolomik verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2:0,9$  ve  $Q^2:0,99$ ), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** siRNA grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler.



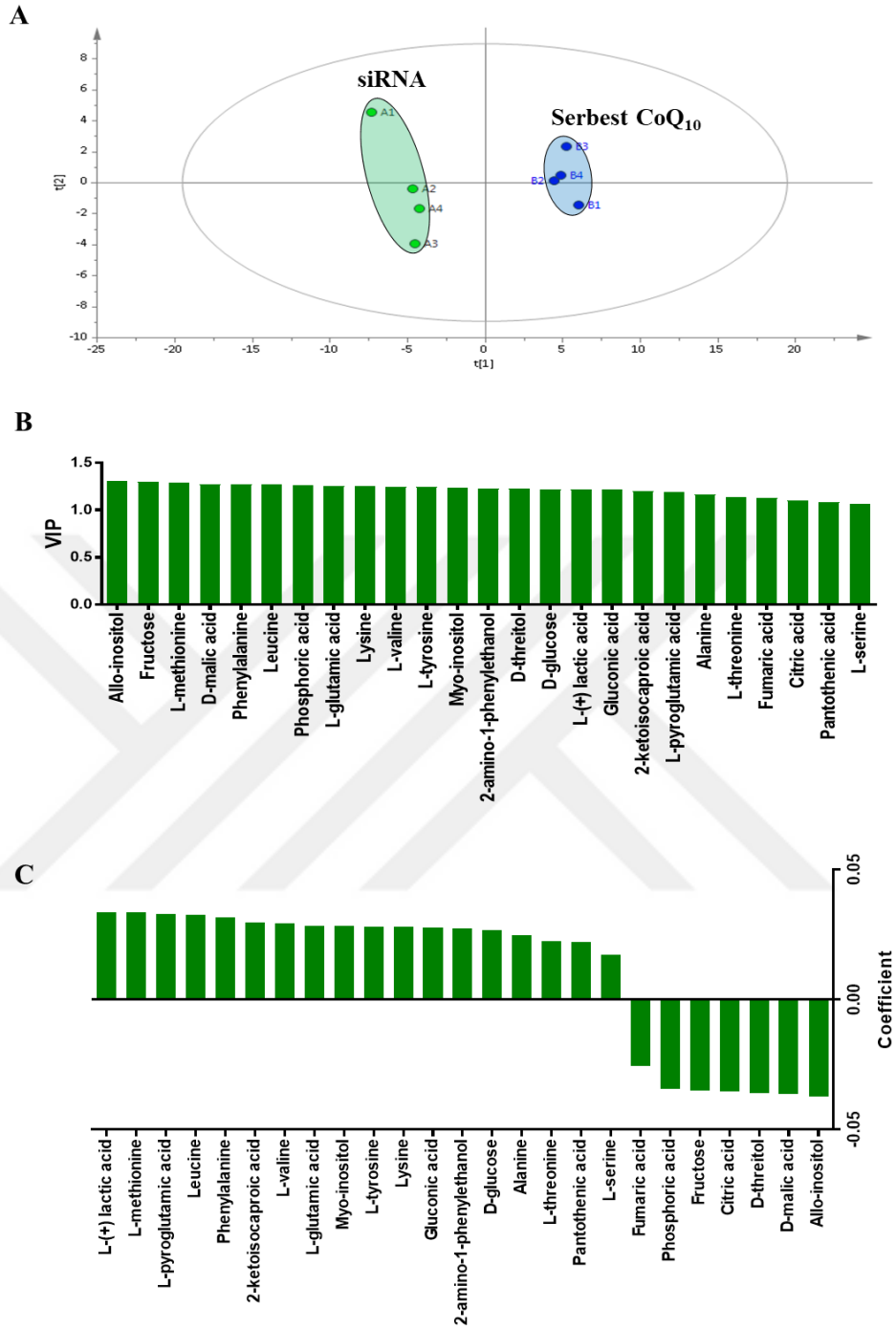
**Şekil 4.23.** siRNA uygulaması yapılan hücre grubu ile mitokondriye hedefli NP (NP11) uygulanan grubun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2:0,99$  ve  $Q^2:0,99$ ), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11) grubunda siRNA grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler.



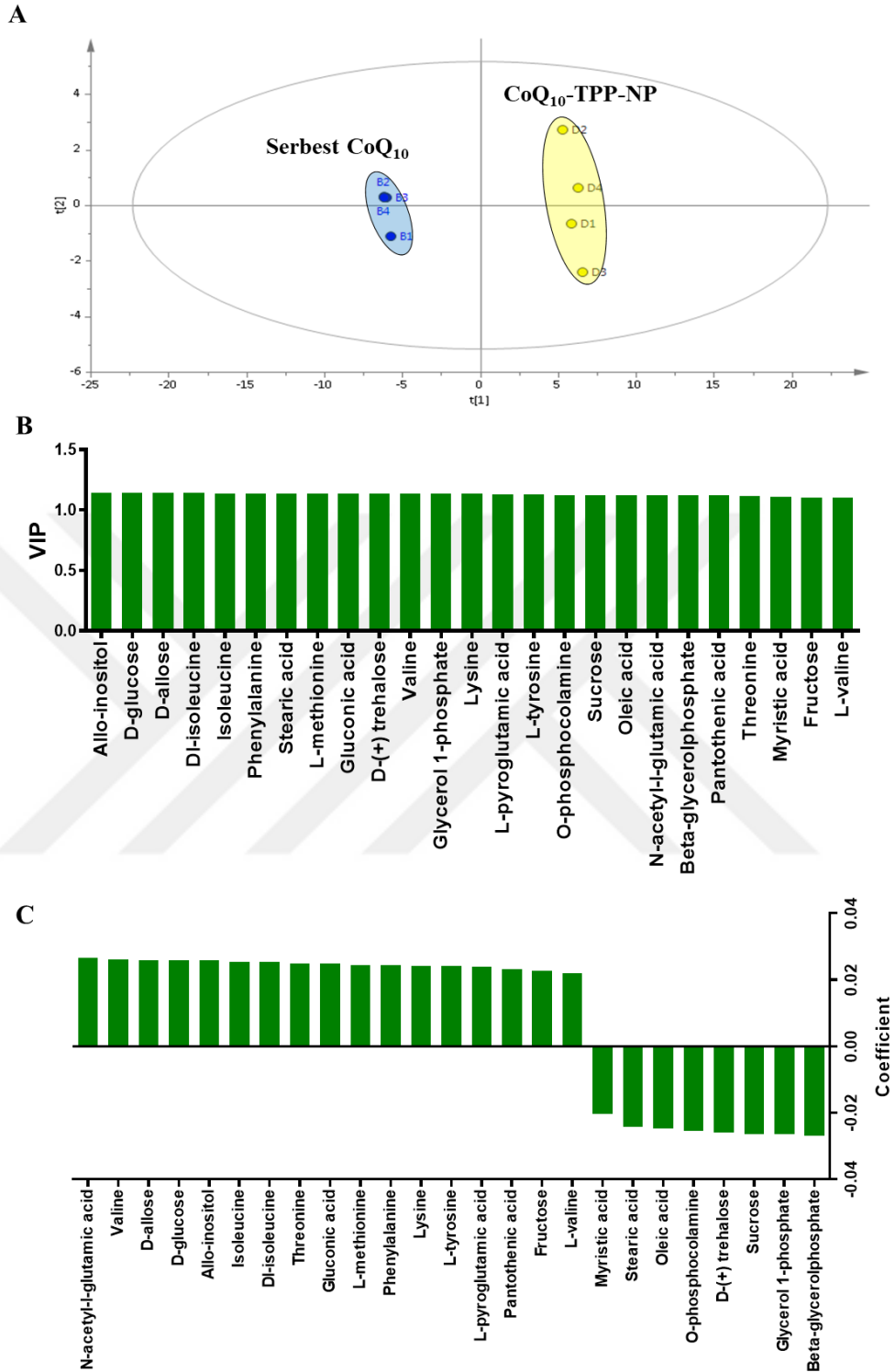
**Şekil 4.24.** HK-2 kontrol grubu ile mitokondriye hedefli NP (NP11) uygulaması yapılan hücre grubunun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0,99 ve  $Q^2$ :0,99), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler.



**Şekil 4.25.** HK-2 kontrol grubu ile serbest CoQ<sub>10</sub> uygulaması yapılan hücre grubunun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0,99 ve  $Q^2$ :0,99), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** Serbest CoQ<sub>10</sub> grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler.

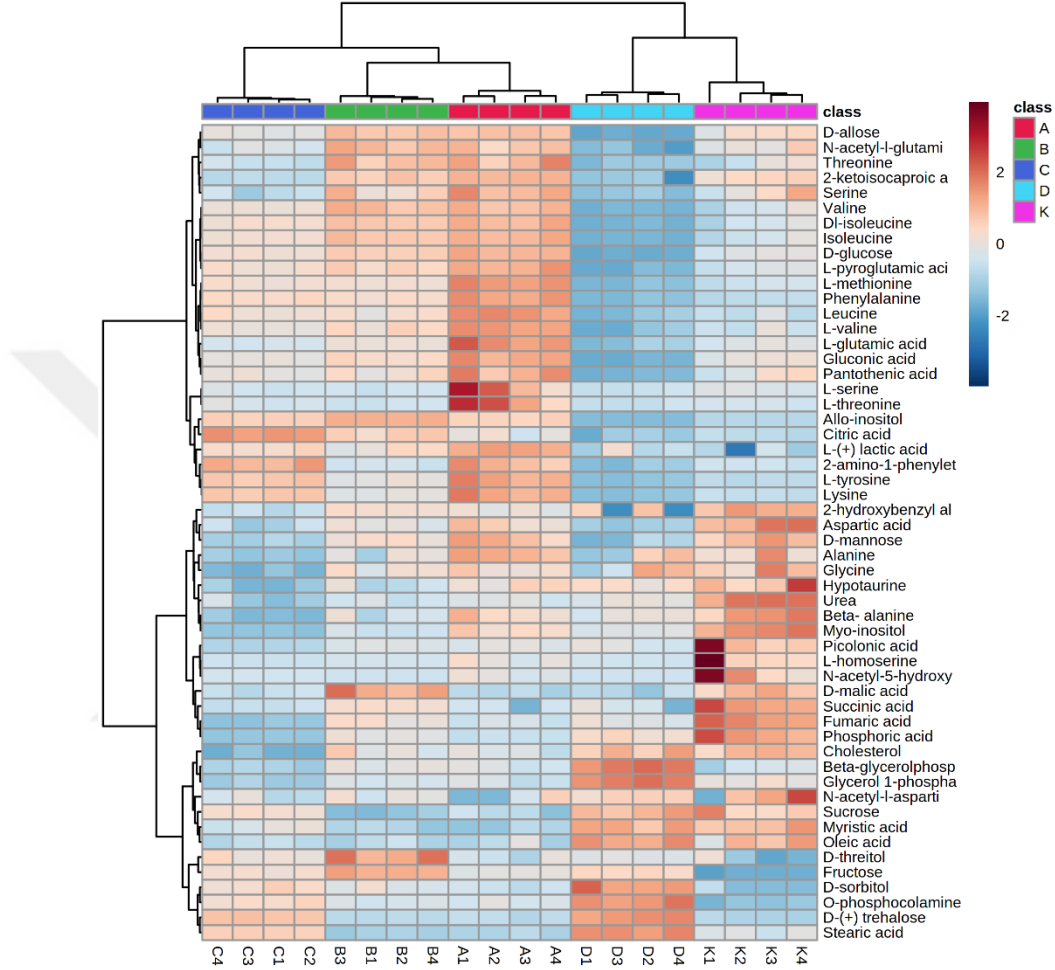


**Şekil 4.26.** siRNA uygulanan grup ile serbest CoQ<sub>10</sub> uygulaması yapılan hücre grubunun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2:0,99$  ve  $Q^2:0,96$ ), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** Serbest CoQ<sub>10</sub> grubunda kontrol grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler.



**Şekil 4.27.** Serbest CoQ<sub>10</sub> uygulaması yapılan hücre grubu ile mitokondriye hedefli NP (NP11) uygulanan grubun metabolomiks verilerine ait çok değişkenli veri analizi. **A)** PLS-DA skor grafiği ( $R^2$ : 0,99 ve  $Q^2$ :0,99), **B)** Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, **C)** CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11) grubunda serbest CoQ<sub>10</sub> grubuna kıyasla miktarı artan ve azalan metabolitler.

5 farklı deney grubunun metabolit profillerinin değerlendirilmesi sonucu gruplar arasında metabolit düzeylerinin varyasyonunun -2 ile 2 arasında renk skalası ile gösterildiği “heatmap” grafiği Şekil 4.28.’de gösterilmiştir. Benzer metabolit profile sahip gruplar benzer renk skalasında yer almaktadır.

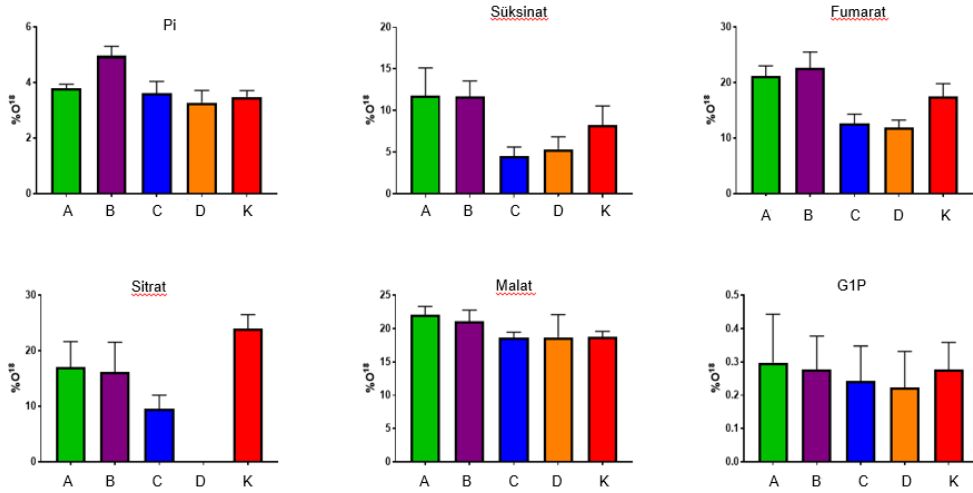


**Şekil 4.28.** HK-2 hücre hattı metabolitlerinin *heatmap* grafiği. Satırlar metabolitleri, sütunlar deney gruplarını göstermektedir (**K**: Kontrol; **A**: siRNA, **B**: siRNA+Serbest CoQ<sub>10</sub>; **C**: siRNA+CoQ<sub>10</sub>-NP (NP9); **D**: siRNA+CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11)).

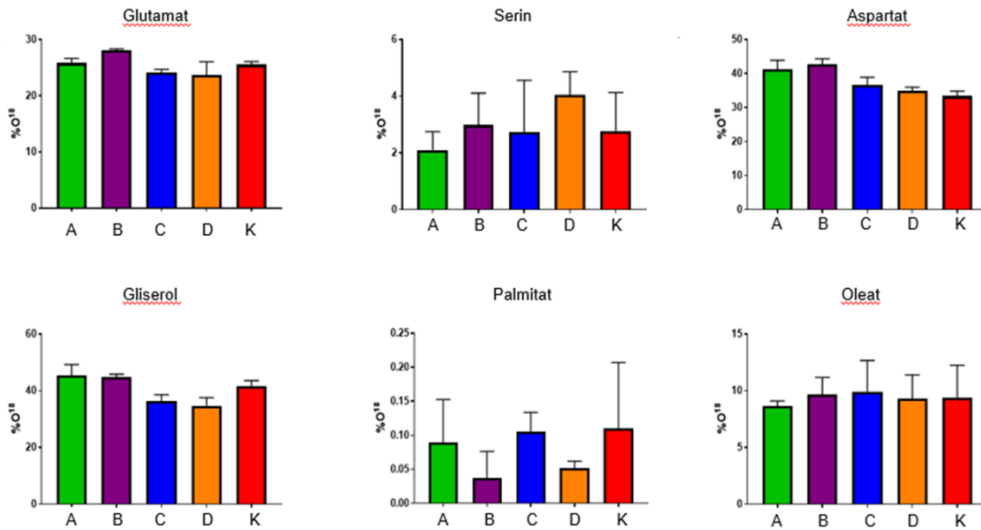
#### 4.9. CoQ<sub>10</sub> Yüklü Nanopartiküllerin Krebs Döngüsü Metabolitlerinin Döngü Hızına Etkisi

Hücrelerde *in vitro* hastalık modelinin oluşturulmasının ardından farklı formülasyonlarda CoQ<sub>10</sub> uygulaması yapılmıştır. 48 saatlik inkübasyonun sonunda %100 doluluğa ulaşmış hücre hatları %30 H<sub>2</sub><sup>18</sup>O içeren hücre besiyerinde 15 dakika işaretlendikten sonra fluksomik analizler gerçekleştirilmiştir. HK-2 hücrelerinde farklı

metabolitler için elde edilen  $^{18}\text{O}$  ile işaretlenme yüzdeleri Şekil 4.29. ve 4.30.'da sunulmuştur.



**Şekil 4.29.** HK-2 hücrelerinde Pi, süksinat, fumarat, sitrat, malat ve G1P metabolitlerinin  $^{18}\text{O}$  işaretlenme yüzdeleri (**K**: Kontrol; **A**: siRNA, **B**: siRNA+Serbest CoQ<sub>10</sub>; **C**: siRNA+CoQ<sub>10</sub>-NP (NP9); **D**: siRNA+CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11)).



**Şekil 4.30.** HK-2 hücrelerinde glutamat, serin, aspartat, gliserol, palmitat ve oleat metabolitlerinin  $^{18}\text{O}$  işaretlenme yüzdeleri (**K**: Kontrol; **A**: siRNA, **B**: siRNA+Serbest CoQ<sub>10</sub>; **C**: siRNA+CoQ<sub>10</sub>-NP (NP9); **D**: siRNA+CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11)).

Fluksomik analizler ile kontrol, siRNA, siRNA+Serbest CoQ<sub>10</sub>, siRNA+CoQ<sub>10</sub>-NP ve siRNA+CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP gruplarında P<sub>i</sub>, sitrat, malat, glutamat gibi krebs döngüsü

metabolitlerinin döngü hızlarını karşılaştırmak amacıyla HK-2 hücreleri  $^{18}\text{O}$  ile işaretlenmiştir. Metabolitlerin  $^{18}\text{O}$  işaretlenme yüzdelerinden yola çıkılarak, hücrelere uygulanan serbest  $\text{CoQ}_{10}$  ve  $\text{CoQ}_{10}$  yüklü NP'lerin geliştirilen in vitro hastalık modelinde krebs döngüsü hızına etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ancak ATP üretiminde kullanılan  $\text{P}_i$ 'in  $^{18}\text{O}$  işaretlenmesi bakımından deney grupları arasında anlamlı farklılığın olmaması, Trikarboksilik asit (TCA) döngü hızının düzenlenmesinde kilit nokta olan sitratın  $^{18}\text{O}$  işaretlenem yüzdesinin hedefli NP grubunda tespit edilememesi; hücre sayısının yetersizliği ve/veya HK-2 hücrelerinin metabolik faaliyetlerinin bu yöntemle tespitinin sınırlı olması nedeniyle fluksomiks analizlerde teknik sıkıntılar yaşanmıştır.



## 5. TARTIŞMA

CoQ<sub>10</sub> eksiklikleri, mitokondri disfonksiyonları ve oksidatif hasarın görüldüğü birçok kronik hastalıkla ilişkilidir. CoQ<sub>10</sub> takviyesi, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kronik böbrek hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıkların semptomları üzerinde olumlu etki göstermektedir (29). CoQ<sub>10</sub>'un yüksek molekül ağırlığı ve hidrofobik özelliği nedeniyle mitokondriye girişi zordur. Bu olumsuzlukları aşmak için son yıllarda birçok ilaç taşıyıcı sistem geliştirmektedir. Bu amaçla geliştirilen bazı formülasyonlar lipozomlar, polimerik NP'ler, polimerik miseller, SLN'ler, nanoemülsiyonlar ve siklodekstrinlerdir (52). Bu formülasyonlar arasında, CoQ<sub>10</sub>'un direkt olarak mitokondriye hedeflendirildiği tek formülasyon CoQ<sub>10</sub> içeren miktoarm misellerdir (63). Ancak bu çalışmada CoQ<sub>10</sub>'un ETZ metabolomik profili üzerindeki etkilerini değerlendiren herhangi bir bulgu elde edilmemiştir.

Bu sebeplerden ötürü bu tez kapsamında, CoQ<sub>10</sub> eksikliğine neden olan mutasyonlara ikincil gelişen CoQ<sub>10</sub> nefropatisinin önlenmesi/iyileştirilmesi için CoQ<sub>10</sub>'un aktif farmasötik içerik olarak kullanıldığı mitokondriye hedeflendirilmiş PLGA-*b*-PEG-TPP NP'leri geliştirilerek *COQ8B* geni susturulmuş proksimal tübül hücre hattında GC-MS temelli metabolomik analizler ile hücre hatları arasındaki mitokondri dinamikleri/fonksiyonlarının karşılaştırılmış ve böylelikle yeni geliştirilen ilacın etkinliği değerlendirilmiştir.

CoQ<sub>10</sub> biyosentez yolağında etkili olan genlerden biri olan *COQ8B* geninde mutasyon olan bireylerde ekzojen CoQ<sub>10</sub> takviyesinin erken dönemde proteinüride azalma sağladığı gösterilmiştir. *COQ8B* mutasyonuna bağlı hastalık modelini oluşturmak amacıyla hücre kültürü ortamında HK-2 hücre hattında siRNA temelli *COQ8B* geninin inhibisyonu sağlanmış ve gen susturma etkinliği gerçek zamanlı PCR ve Western Blot analizleri ile doğrulanmıştır. Optimum düzeyde gen inhibisyonunu sağlayabilmek için farklı konsantrasyonlarda siRNA molekülleri ile çalışılmış ve farklı sürelerde transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. 100 nM siRNA kullanılarak 96 saat süreyle transfeksiyon yapıldığında *COQ8B* geninin ekspresyonunda yaklaşık %80 oranında azalma olduğu gerçek zamanlı PCR ile gösterilmiş ve Western Blot analizi ile bu sonuç doğrulanmıştır. Bu da literatürde ilk kez oluşturulan siRNA temelli *in vitro* modelin hastalık modeli olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Son zamanlarda mitokondri başta kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın tedavisi için ilaç tasarım çalışmalarında önemli bir hedef haline gelmiştir (56). Bununla birlikte, mitokondrinin özel çift katmanlı yapısı ve negatif membran potansiyeli nedeniyle mitokondriye terapötik maddelerin iletilmesinde bazı güçlükler söz konusu olmaktadır (71). İlaçların mitokondriye taşınması için en etkili strateji, ilgili ilaç molekülüne bir alkiltrifenilfosfonyum lipofilik katyon bağlanmasıdır (104). Mitokondriyi ilaç taşınması için lipozomlar, altın NP'ler, dendrimerler ve polimerik NP'ler gibi çeşitli nanopreparatlar geliştirilmiştir (56, 71). Bu taşıyıcı sistemler arasında polimerik NP'ler, biyouyumlulukları nedeniyle *in vivo* uygulamada oldukça avantajlıdır. Polimerik NP'ler doğal veya sentetik polimerlerden oluşan kolloidal sistemlerdir. Polimerik NP'lerin vücut sıvılarında stabilitesi, yüzeylerinin işlevselleştirmeye uygun olması bu taşıyıcı sistemlerin sahip olduğu avantajlardan bazılarıdır. Polimerlerin sahip olduğu özellikler aynı zamanda bölgelere özgü taşınımı da sağlar. PLA, PCL, PGA gibi biyobozunur polimerler; düşük toksisiteye sahip olmaları, vücutla uyumlu olmaları ve uygulama sonrası cerrahi işlem gerektirmeden vücuttan uzaklaştırılabilmesi gibi avantajları nedeni ile ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda PLGA gibi blok kopolimerler de ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. PLGA, FDA onaylı, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen ve güvenli bir şekilde uygulanan bir polimerdir (59). Uzun klinik deneyimi, uygun bozunma özellikleri ve sürekli ilaç dağıtımı olanakları nedeniyle PLGA, diğer biyolojik olarak bozunabilir polimerler arasında en popüler olanıdır. PLGA polimerine PEG gibi FDA onaylı bir hidrofilik blok eklenerek bir blok kopolimer geliştirilebilir (105). PLGA'ya PEG eklenmesi, kan dolaşımında NP'lerin kalış süresinin ve stabilitesinin artmasına neden olur (71). Bu şekilde elde edilen PLGA-*b*-PEG polimeri ile üretilen NP'ler biyobozunur olmanın yanısıra artmış yarılanma ömrüne sahiptir. Başta kanser tedavisi olmak üzere birçok kronik hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere dokuya özgü hedeflendirme sağlayan PLGA temelli NP sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir, ancak mitokondri ilişkili hastalıkların tedavisi için geliştirilen NP'ler henüz yolun başındadır (105).

Marrache ve ark. (96)'nin yaptığı bir çalışmada obezite, alzheimer ve kanser gibi mitokondri temelli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere doğrudan

mitokondriye hedeflendirilmiş NP'ler hazırlanmıştır. Katyonik özelliği sayesinde mitokondri membranını geçebilen TPP molekülü PLGA-*b*-PEG polimerine konjuge edilmiş ve bu yeni polimer ile  $\alpha$ -tokoferol, lonidamin ve 2,4-dinitrofenol gibi ilaçları içeren NP'ler sentezlenmiş ve hücre kültürü ortamında mitokondriye hedeflendirme sağlanmıştır. Mitokondriye hedeflendirilen bu ilaç yüklü NP'ler, hedeflendirilmemiş NP'ler veya serbest ilaç formları ile kıyaslandığında, Alzheimer, obezite ve kanser tedavisi için daha etkili bulunmuştur.

Sharma ve ark. (63), CoQ<sub>10</sub>'un direkt olarak mitokondriye hedeflendirildiği CoQ<sub>10</sub> içeren miktoarm misel formülasyonu geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu ilaç taşıyıcı sistemin *in vitro* etkinliğini değerlendirmek için mikrogliya hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve paraquat ile oluşturulan iki stres modelinde CoQ<sub>10</sub>'un antioksidan etkisi incelenmiştir. CoQ<sub>10</sub>, ROS ve süperoksit anyon seviyelerini azaltmış, ancak serbest CoQ<sub>10</sub> ve mitokondriye hedeflendirilmiş polimerik misellerin etkisi arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Mikrogliya hücrelere hedeflendirilmiş CoQ<sub>10</sub> miselleri veya serbest CoQ<sub>10</sub> uygulanmış ve antimisin A maruziyeti sonrasında TMRM kullanılarak mitokondri membran potansiyeli ölçülmüştür. Her iki deney grubundaki hücrelerin mitokondri membran potansiyelleri korunmuştur, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (63).

Velichkovska ve ark. (99), nöral progenitor hücrelerde anti-retroviral ilaçların oksidatif strese neden olarak hücresel yaşlanmaya neden olduğu ve mitokondri fonksiyonlarının bozulduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada anti-retroviral tedavi (ART) uygulamasının ardından, serbest CoQ<sub>10</sub>, hedeflendirilmemiş ve mitokondriye hedefli CoQ<sub>10</sub> içeren PLGA-*b*-PEG NP'ler nöral progenitor hücrelere verilmiştir. CoQ<sub>10</sub>'un ART'ye bağlı gelişen oksidatif stress ve hücresel yaşlanma sonucu mitokondri disfonksiyonları üzerindeki etkileri ROS düzeyleri, mitokondri membran potansiyeli, hücresel oksijen tüketimi, ATP düzeyleri, telomer uzunluğu gibi parametreler ile değerlendirilmiştir. ART ile bozulan tüm bu parametreler serbest CoQ<sub>10</sub> ile düzelme göstermezken, CoQ<sub>10</sub> içerikli NP'ler ile iyileşme göstermiş ve özellikle mitokondriye hedeflendirilmiş NP'ler daha etkili bulunmuştur.

Tüm bu çalışmalarda CoQ<sub>10</sub>'un ETZ metabolomik profili üzerindeki etkilerini değerlendiren herhangi bir bulgu elde edilmemiştir.

Bu bulgulara dayanarak CoQ<sub>10</sub> ile ilişkili böbrek hastalıklarında da mitokondriye hedeflendirilen polimerik NP'lerin ilacın serbest veya hedeflenmemiş NP formlarından daha etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez kapsamında mitokondriye hedeflendirmeyi sağlamak için TPP molekülü ile konjuge edilmiş PLGA-*b*-PEG polimeri kullanılarak CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'ler nanoçöktürme metodu ile hazırlanmış ve karakterize edilmiştir (96). Geliştirilen bu formülasyonla CoQ<sub>10</sub>'un lipofilik ve yüksek molekül ağırlıklı bir bileşik olmasının neden olduğu biyoyararlanım sorunları aşılmıştır, bu nedenle bu ilaç taşıyıcı sistem mitokondriye ilaç hedeflemek için umut vaat eden bir yaklaşım olma potansiyeline sahiptir.

NP'lerin hazırlanmasında PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> veya PLGA-*b*-PEG-OH polimerleri kullanılarak polimer yüzdesi, ilaç/polimer oranı, yüzey aktif madde, nanopartikül hazırlama yöntemi gibi parametreler değiştirilerek farklı formülasyonlar hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda mitokondriye hedefleme için en uygun özelliklere sahip formülasyon seçilerek sonraki deneylere bu formülasyon ile devam edilmiştir.

Nanoçöktürme yöntemi kullanılarak PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan NP'ler (NP3 ve NP4) mitokondriye hedefleme için uygun boyut ve dağılıma sahiptir. Bu NP'lere yüklenen ilaç miktarının değerlendirilmesi için kullanılan ELISA yöntemi sonucunda anlamlı bir sonuç elde edilemediği için sonraki deneylerde HPLC yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Etkin madde salım çalışmaları kapsamında salım ortamındaki CoQ<sub>10</sub> tayini için ELISA yöntemi kullanılmış ancak, ilacın düşük suda çözünürlük nedeni ile salım ortamına geçememesi veya ilacın NP'lere tam olarak yüklenememesi sebebiyle anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu nedenlerden dolayı nanopartikül hazırlama yönteminde değişikliğe gidilmiştir.

Çift emülsiyon-çözücü uçurma yöntemi kullanılarak PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri ile hazırlanan NP'ler boyut, zeta potansiyelleri ve partikül dağılımları açısından değerlendirildiğinde, NP7 ve NP8'in boyut olarak hedeflenen değerlere uygun olduğu ve aynı zamanda homojen bir dağılım göstermeleri nedeniyle çalışmanın amacına uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Bu NP'lerin mitokondriye hedeflendirilmesi için TPP molekülü ile konjugasyon yapılmış ve FT-IR spektroskopisi ile polimer-TPP bağlanması doğrulanmıştır. NP'lere yüklenen ilaç

miktarı HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve NP'lerin CoQ<sub>10</sub> enkapsülasyon etkinliği %1,5 olarak bulunmuştur. İlaç yükleme etkinliği artırmak için NP formülasyonunda ve hazırlama yönteminde çeşitli modifikasyonlar yapılmış ancak çalışmanın amacına uygun (en az %20 EE) bir sonuç elde edilememiştir. PLGA-*b*-PEG-NH<sub>2</sub> polimeri kullanılarak iki farklı yöntemle hazırlanan NP'ler ilaç yükleme etkinliği ve etken madde salım çalışmaları bakımından istenen özellikleri sağlayamamıştır. Farklı iki yöntem ve birçok farklı formülasyon denenmiş olmasına rağmen istenen özelliklerde NP elde edilememiş olması kullanılan polimerde değişiklik yapılmasını gerekli kılmıştır. Bu nedenle sonraki deneylere hidroksil uçlu PLGA-*b*-PEG (PLGA-*b*-PEG-OH) polimeri ile devam edilmiştir.

NP'lerin boyut ve yüzey özelliklerindeki değişimleri en aza indirmek için PLGA-*b*-PEG-OH polimeri ile NP hazırlama aşamasından önce TPP molekülü polimer ile konjuge edilmiş ve bağlanma FT-IR ve NMR spektrumları ile doğrulanmıştır. Hazırlanan yüklü olmayan ve ilaç yüklü NP'lerin karakterizasyonu kapsamında NP'lerin zeta potansiyel değerlerine bakarak NP'lerin stabil olduğu ve agregasyon eğilimlerinin olmadığını söylemek mümkündür. CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'ler negatif zeta potansiyeline sahiptir, bunun yanı sıra TPP molekülünden dolayı mitokondriye hedeflendirilmiş CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'lerin (NP10 ve NP11) zeta potansiyeli pozitifdir. Taşıdığı fenil ve fosfor grupları nedeniyle oldukça lipofilik ve pozitif yüklü olan TPP molekülü mitokondriye ilaç hedeflendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimer yüzeyine TPP molekülünün bağlanması NP'lerin lipofilik özellikleri ve yüzey yükünü değiştirmektedir. NP'lerin pozitif yüzey yüküne sahip olması, negatif membran potansiyeline sahip mitokondriye giriş avantaj sağlar, bunun için en uygun zeta potansiyel değeri +22 mV'tur (96). Hazırlanan NP'lerden +20 mV zeta potansiyele sahip CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'ler (NP11) yüzey yükü bakımından mitokondriye giriş için uygun özelliktedir. Geliştirilen NP'lerin PDI değerlerinin 0,1 ile 0,2 arasında olması NP'lerin homojen dağıldıklarını göstermektedir. NP'lerin ortalama boyutları 140-160 nm aralığındadır. CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'ler, CoQ<sub>10</sub>-NP'lere kıyasla daha büyük boyuttadır. NP hazırlama aşamasından önce PLGA-*b*-PEG polimer yüzeyine TPP molekülünün konjugasyonu partikül boyutudaki artışı açıklamaktadır. Bununla birlikte NP'ler mitokondriye hedefleme için istenen boyut aralığındadır (<200 nm) (96). NP'lere ait tüm bu özellikler değerlendirildiğinde,

hazırlanan NP'lerin boyut, yüzey yükü ve parikül dağılımı açısından bu tezin amacına uygun özellikte olduğu görülmektedir.

NP9, NP10, ve NP11 formülasyonları için ilaç yükleme etkinliği sırasıyla %90, %80 ve %40 olarak bulunmuştur. Polimer yüzeyine TPP molekülü konjugasyonu sonucu NP'lere yüklenen ilaç miktarının azalması beklenen bir sonuçtur. Nitekim NP10 ve NP11 formülasyonları kıyaslandığında polimer yüzeyine konjuge edilen TPP miktarı arttıkça ilaç enkapsülasyon etkinliği azalmaktadır.

PLGA-*b*-PEG polimeri FDA onaylı bir polimer olarak birçok ilaç hedefleme çalışmasında güvenle kullanılmasına rağmen TPP molekülünden dolayı NP'lerin sitotoksik olma potansiyeli mevcuttur (106). Bu nedenle hücre kültüründe NP'lerin hücre canlılığı üzerindeki etkisini göstermek için XTT deneyi yapılmıştır ve NP'lerin hücreler üzerinde toksik etki göstermediği bulunmuştur. Yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına dayanarak, CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'lerin (NP11) sitotoksik etki göstermeksizin boyut, zeta potansiyeli, boyut dağılımı, morfoloji ve ilaç yükleme etkinliği açısından bu çalışmanın amacına uygun olduğu kanıtlanmıştır.

CoQ<sub>10</sub> mitokondri membranında bulunan ve ETZ'de görev alan bir molekül olması sebebiyle eksikliği durumunda elektron transferinde ve dolayısıyla TCA döngü hızında yavaşlama söz konusudur. siRNA aracılı *COQ8B* mutasyonu oluşturulan hücrelerde CoQ<sub>10</sub> formülasyonlarının etkilerini mitokondri fonksiyonları üzerinden değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen metabolomik analizlerin sonucu değerlendirilirken CoQ<sub>10</sub> eksikliği durumunda birincil olarak etkilenen TCA döngüsü metabolitleri ve özellikle hücrede temel enerji kaynağı olan karbohidratların metabolizması üzerinde durulmuştur.

TCA döngüsünün ana düzenlenme noktasında yer alan sitrik asitin siRNA uygulaması yapılarak *in vitro* hastalık modeli oluşturulan hücre grubunda kontrol grubuna ( $0,77 \pm 0,01$ 'den  $0,97 \pm 0,05$ 'e) kıyasla artışı (Tablo 4.5.), *COQ8B*<sup>-/-</sup> hücrelerinde TCA döngüsünün yavaşladığını göstermektedir. CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'lerin (NP11) uygulanmasından sonra sitrik asit konsantrasyonunun azalması ( $0,58 \pm 0,06$ ) (Tablo 4.5.) bu NP'lerin TCA döngüsünü hızlandırmaya katkı sağladığını göstermektedir. Sitrik asit düzeyleri üzerinde NP'ler serbest CoQ<sub>10</sub>'a göre daha etkili bulunmuştur ( $0,58 \pm 0,06$ 'ya karşı  $1,2 \pm 0,04$ ) (Tablo 4.5.), bu da bu etkinin CoQ<sub>10</sub> molekülünden ziyade formülasyon ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Fruktoz ve glukoz gibi enerji metabolizmasının temel prekürsörü olan karbohidratların *COQ8B*<sup>-/-</sup> hücrelerinde miktarlarının kontrol grubuna kıyasla artış göstermiş olması (Fruktoz  $0,56 \pm 0,02$ 'den  $0,98 \pm 0,01$ 'e; glukoz  $0,94 \pm 0,03$ 'ten  $1,32 \pm 0,02$ 'ye) (Tablo 4.5.) TCA döngüsünün hızının azalması ile ilişkilendirilebilir. siRNA ile *COQ8B* gen inhibisyonu oluşturulan hücre grubunda TCA döngüsünün baskılanmış olmasına paralel olarak hücrelerde meydana gelen enerji açığı sinyali, sukrozun parçalanarak monomerleri olan glukoz ve fruktoza dönüşümünü tetiklemiş olabilir. Glukoz ve fruktoz düzeylerindeki artış ve sukroz düzeyindeki azalma ( $1,15 \pm 0,06$ 'dan  $0,86 \pm 0,04$ 'e) (Tablo 4.5.) bu varsayımı doğrulamaktadır. CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'lerin (NP11) hücrelere uygulanmasından sonra TCA döngüsünün hızlanması ve dolayısıyla CoQ<sub>10</sub>'un yer aldığı ETZ'nin hızlanması sebebiyle glukoz tüketiminde artış olmuştur ( $1,32 \pm 0,02$ 'den  $0,48 \pm 0,01$ 'e) (Tablo 4.5.). Serbest CoQ<sub>10</sub>'un glukoz düzeylerini azaltmada nanopartiküller kadar etkili olmadığı görülmüştür ( $1,32 \pm 0,02$ 'den  $1,19 \pm 0,01$ 'e) (Tablo 4.5.). CoQ<sub>10</sub>-NP'lerin (NP9) ise glukoz düzeyini azaltmada serbest CoQ<sub>10</sub>'dan daha etkili olmakla birlikte CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'ler (NP11) kadar etkili değildir ( $1,06 \pm 0,01$ ) (Tablo 4.5.)

siRNA uygulaması yapılan hücrelerde TCA döngüsünün yavaşlamış olması nedeniyle glukozun alternatif yollara yönelmesi sonucu glukonik asit ve laktik asit gibi metabolitlerin konsantrasyonunda artış meydana gelmiştir (Glukonik asit  $1 \pm 0,04$ 'ten  $1,46 \pm 0,05$ 'e; laktik asit  $0,61 \pm 0,15$ 'ten  $1,39 \pm 0,02$ 'ye) (Tablo 4.5.). *COQ8B*<sup>-/-</sup> hücrelere CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'ler (NP11) uygulandıktan sonra glukoz, ana yıkım yolu olan glikoliz yolağına girdiği için glukonik asit ve laktik asit miktarı azalmıştır (Glukonik asit  $0,41 \pm 0,02$ ; laktik asit  $0,83 \pm 0,09$ ) (Tablo 4.5.). Serbest CoQ<sub>10</sub> uygulaması, glukonik asit ve laktik asit miktarının azalmasında hedefli nanopartiküllere kıyasla daha az etkili bulunmuştur (Glukonik asit  $1,14 \pm 0,02$ ; laktik asit  $1,05 \pm 0,05$ ) (Tablo 4.5.).

İntrinsik CoQ<sub>10</sub> ve kolesterol sentez basamakları farnezilpirofosfat ara bileşiğine kadar ortak ilerlemektedir ve her iki basamğın da prekürsörü asetil-koA'dır. Her iki yolak da pirüvat dehidrogenaz (PDH) basamağıda denetime tabidir ve artan asetil-koA miktarı PDH kompleksini inhibe eder. siRNA uygulaması ile beraber *COQ8B* gen inhibisyonuna bağlı olarak CoQ<sub>10</sub> yapım yolu baskılanacağı için feed-back mekanizma ile pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksi inhibisyona uğrar. Buna

paralel olarak kolesterol düzeyinin de kontrol grubuna kıyasla azalmış olması beklenen bir durumdur ( $1,14 \pm 0,03$ 'ten  $0,96 \pm 0,02$ 'ye) (Tablo 4.5.). CoQ<sub>10</sub>'un her iki formu da (CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11) ve serbest CoQ<sub>10</sub>) kolesterol düzeyini kontrol düzeyine yaklaştırmış, NP formu daha etkin bulunmuştur (Serbest CoQ<sub>10</sub>  $1,01 \pm 0,04$ , CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP  $1,15 \pm 0,03$ ) (Tablo 4.5.). Bu da NP'lerin mitokondriye hedeflendirilmesinin spesifik etkisini ortaya koymaktadır.

Metabolomik analizler kapsamında tespit edilen aminoasitlerden aspartik asit haricindeki aminoasitlerin düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında siRNA uygulaması ile artmıştır (izolösin  $0,89 \pm 0,05$ 'ten  $1,27 \pm 0,02$ 'ye; glutamik asit  $0,93 \pm 0,03$ 'ten  $1,56 \pm 0,07$ 'ye; metiyonin  $0,86 \pm 0,02$ 'den  $1,44 \pm 0,03$ 'e; serin  $0,81 \pm 0,04$ 'ten  $2,37 \pm 0,54$ 'e; treonin  $0,68 \pm 0,03$ 'ten  $2,46 \pm 0,45$ 'e; tirozin  $0,72 \pm 0,01$ 'den  $1,53 \pm 0,07$ 'ye; valin  $0,89 \pm 0,04$ 'ten  $1,39 \pm 0,02$ 'ye; lösin  $0,82 \pm 0,04$ 'ten  $1,5 \pm 0,03$ 'e; lizin  $0,64 \pm 0,01$ 'den  $1,77 \pm 0,11$ 'e) (Tablo 4.5.). Bu artışın nedeni siRNA uygulaması sonrası TCA döngüsünün yavaşlaması sonucu TCA döngüsü ara ürünlerinin aminoasit sentez yollarına yönelmiş olmasıdır. Hücrelere uygulanan CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'ler (NP11) TCA döngüsünü hızlandırarak ara ürünlerin aminoasit sentez yollarına gidişini azaltmıştır, böylece bu aminoasitlerin konsantrasyonu azalmıştır (izolösin  $0,59 \pm 0,01$ ; glutamik asit  $0,59 \pm 0,05$ ; metiyonin  $0,58 \pm 0,02$ ; serin  $0,54 \pm 0,03$ ; treonin  $0,52 \pm 0,03$ ; tirozin  $0,47 \pm 0,02$ ; valin  $0,6 \pm 0,05$ ; lösin  $0,56 \pm 0,05$ ; lizin  $0,22 \pm 0,03$ ) (Tablo 4.5.).

siRNA uygulaması ile tespit edilen aspartat düzeyindeki kontrol grubuna göre azalma, ETZ ve TCA döngüsündeki inhibisyon sonucu aspartatın alternatif olarak serin, treonin, lizin, pantotenik asit yapımına yönelmesi ile açıklanabilir ( $1,25 \pm 0,05$ 'ten  $1,08 \pm 0,03$ 'e) (Tablo 4.5.). Buna paralel olarak hücrelere uygulanan CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'lerin (NP11) ve serbest CoQ<sub>10</sub>'un ETZ'yi hızlandırması nedeniyle aspartatın oksaloasetat üzerinden TCA döngüsüne yönelerek miktarının azaldığı sonucuna varılabilir (Serbest CoQ<sub>10</sub> ile  $0,99 \pm 0,02$ ; CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP (NP11) ile  $0,82 \pm 0,01$ ) (Tablo 4.5.). Bu nedenle CoQ<sub>10</sub> uygulaması ile beraber izlenen serin, treonin, lizin, lösin, izolösin gibi aminoasitlerin düzeyindeki azalma bu aminoasitlerin prekürsörü olan ve TCA döngüsüne yönelen aspartatın düzeyinin azalmasına bağlanabilir.

Fluksomik analizleri için hücre sayısının yetersiz kalması ve/veya HK-2 hücrelerinin metabolik hızlarının sınırlı olması sebebiyle  $^{18}\text{O}$  ile işaretleme beklendiği gibi yapılamamıştır. Bunun yerine LC-q-TOF-MS ile hücre gruplarında ATP düzeylerine bakılması alternatif bir yöntem olabilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, mitokondriye hedeflendirilmiş CoQ<sub>10</sub> yüklü NP'lerin endojen biyosentezinde rol alan *COQ8B* geninin siRNA aracılı susturulması ile geliştirilen *in vitro* hastalık modelinde, mitokondri fonksiyonları üzerindeki etkilerini metabolomik analizler ile değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır. ETZ'de yer alan bu molekülün eksikliğinde TCA döngüsünün yavaşlaması sonucu bu döngüye dahil olan veya dolaylı olarak ilgili metabolitlerin düzeylerinde değişiklikler meydana gelmiştir. Hücrelere uygulanan CoQ<sub>10</sub>-TPP-NP'lerin değişen metabolit düzeyleri üzerindeki iyileştirici etkisi serbest CoQ<sub>10</sub> ile kıyaslandığında daha fazladır. Bu tez kapsamında geliştirilen mitokondriye aktif olarak hedeflendirilmiş NP formülasyonu, serbest CoQ<sub>10</sub>'un düşük biyoyararlanımı ve suda çözünürlüğü ile ilgili dezavantajların üstesinden gelinmiştir. Bu ilaç taşıyıcı sisteminin avantajı, ilaç hedeflemede en yaygın kullanılan FDA onaylı polimer olan PLGA-*b*-PEG içermesidir. Sonuç olarak, bu formülasyon CoQ<sub>10</sub> nefropatileri de dahil olmak üzere CoQ<sub>10</sub> ile ilişkili bozuklukların tedavisi için güçlü bir aday olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Korkmaz E, Lipska-Zietkiewicz BS, Boyer O, Gribouval O, Fourrage C, Tabatabaei M, et al. ADCK4-Associated Glomerulopathy Causes Adolescence-Onset FSGS. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):63-8.
2. Atmaca M, Gulhan B, Korkmaz E, Inozu M, Soylemezoglu O, Candan C, et al. Follow-up results of patients with ADCK4 mutations and the efficacy of CoQ10 treatment. *Pediatr Nephrol*. 2017;32(8):1369-75.
3. Antignac C. Genetic models: clues for understanding the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *J Clin Invest*. 2002;109(4):447-9.
4. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*. 2003;362(9384):629-39.
5. Downie ML, Gallibois C, Parekh RS, Noone DG. Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management. *Paediatr Int Child Health*. 2017;37(4):248-58.
6. Malaga-Dieguez L, Susztak K. ADCK4 "reenergizes" nephrotic syndrome. *J Clin Invest*. 2013;123(12):4996-9.
7. Akalın N, Koroğlu M. İdiyopatik Nefrotik Sendrom İmmünopatogenezinin Tedavi Yaklaşımları Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri J Intern Med*. 2016;1(2):84-90.
8. Sakai O, Inoue M. [Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in internal medicine]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1975;17(5):353-62.
9. Ashraf S, Gee HY, Woerner S, Xie LX, Vega-Warner V, Lovric S, et al. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest*. 2013;123(12):5179-89.
10. Ozaltın F. Primary coenzyme Q10 (CoQ 10) deficiencies and related nephropathies. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(6):961-9.
11. Barcelos IP, Haas RH. CoQ10 and Aging. *Biology (Basel)*. 2019;8(2).
12. Watmough NJ, Frerman FE. The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(12):1910-6.
13. Gutierrez-Mariscal FM, Yubero-Serrano EM, Villalba JM, Lopez-Miranda J. Coenzyme Q10: From bench to clinic in aging diseases, a translational review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(14):2240-57.
14. Lopez-Lluch G, Rodriguez-Aguilera JC, Santos-Ocana C, Navas P. Is coenzyme Q a key factor in aging? *Mech Ageing Dev*. 2010;131(4):225-35.
15. Navas P, Villalba JM, de Cabo R. The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses. *Mitochondrion*. 2007;7 Suppl:S34-40.
16. Blatt T, Littarru GP. Biochemical rationale and experimental data on the antiaging properties of CoQ(10) at skin level. *Biofactors*. 2011;37(5):381-5.
17. Forsmark-Andree P, Dallner G, Ernster L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med*. 1995;19(6):749-57.
18. Echtay KS, Winkler E, Klingenberg M. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature*. 2000;408(6812):609-13.
19. Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when

- activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1416-21.
20. Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, et al. Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem*. 2003;278(30):28220-8.
  21. Ferreira FM, Seica R, Oliveira PJ, Coxito PM, Moreno AJ, Palmeira CM, et al. Diabetes induces metabolic adaptations in rat liver mitochondria: role of coenzyme Q and cardiolipin contents. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1639(2):113-20.
  22. Bessler H, Bergman M, Blumberger N, Djaldetti M, Salman H. Coenzyme Q10 decreases TNF-alpha and IL-2 secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010;56(1):77-81.
  23. Tarry-Adkins JL, Fernandez-Twinn DS, Hargreaves IP, Neergheen V, Aiken CE, Martin-Gronert MS, et al. Coenzyme Q10 prevents hepatic fibrosis, inflammation, and oxidative stress in a male rat model of poor maternal nutrition and accelerated postnatal growth. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(2):579-88.
  24. Fan L, Feng Y, Chen GC, Qin LQ, Fu CL, Chen LH. Effects of coenzyme Q10 supplementation on inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res*. 2017;119:128-36.
  25. Zhai J, Bo Y, Lu Y, Liu C, Zhang L. Effects of Coenzyme Q10 on Markers of Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170172.
  26. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1660(1-2):171-99.
  27. Acosta MJ, Vazquez Fonseca L, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E, et al. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(8):1079-85.
  28. Wang Y, Hekimi S. Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013;48(1):69-88.
  29. Hernandez-Camacho JD, Bernier M, Lopez-Lluch G, Navas P. Coenzyme Q10 Supplementation in Aging and Disease. *Front Physiol*. 2018;9:44.
  30. Bhagavan HN, Chopra RK. Coenzyme Q10: absorption, tissue uptake, metabolism and pharmacokinetics. *Free Radic Res*. 2006;40(5):445-53.
  31. Tomono Y, Hasegawa J, Seki T, Motegi K, Morishita N. Pharmacokinetic study of deuterium-labelled coenzyme Q10 in man. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1986;24(10):536-41.
  32. Doimo M, Desbats MA, Cerqua C, Cassina M, Trevisson E, Salviati L. Genetics of coenzyme q10 deficiency. *Mol Syndromol*. 2014;5(3-4):156-62.
  33. Desbats MA, Lunardi G, Doimo M, Trevisson E, Salviati L. Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ 10) deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2015;38(1):145-56.
  34. Chung WK, Martin K, J alas C, Braddock SR, Juusola J, Monaghan KG, et al. Mutations in COQ4, an essential component of coenzyme Q biosynthesis, cause lethal neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *J Med Genet*. 2015;52(9):627-35.
  35. Emma F, Montini G, Parikh SM, Salviati L. Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(5):267-80.

36. Lagier-Tourenne C, Tazir M, Lopez LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, et al. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q(10) deficiency. *Am J Hum Genet.* 2008;82(3):661-72.
37. Mollet J, Delahodde A, Serre V, Chretien D, Schlemmer D, Lombes A, et al. CABP1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet.* 2008;82(3):623-30.
38. Atmaca M, Gulhan B, Atayar E, Bayazit AK, Candan C, Arici M, et al. Long-term follow-up results of patients with ADCK4 mutations who have been diagnosed in the asymptomatic period: effects of early initiation of CoQ10 supplementation. *Turk J Pediatr.* 2019;61(5):657-63.
39. Deichmann R, Lavie C, Andrews S. Coenzyme q10 and statin-induced mitochondrial dysfunction. *Ochsner J.* 2010;10(1):16-21.
40. Avis HJ, Hargreaves IP, Ruiter JP, Land JM, Wanders RJ, Wijburg FA. Rosuvastatin lowers coenzyme Q10 levels, but not mitochondrial adenosine triphosphate synthesis, in children with familial hypercholesterolemia. *J Pediatr.* 2011;158(3):458-62.
41. Eroglu FK, Ozaltin F, Gonc N, Nalcacioglu H, Ozcakar ZB, Yalnizoglu D, et al. Response to Early Coenzyme Q10 Supplementation Is not Sustained in CoQ10 Deficiency Caused by CoQ2 Mutation. *Pediatr Neurol.* 2018;88:71-4.
42. Villalba JM, Parrado C, Santos-Gonzalez M, Alcain FJ. Therapeutic use of coenzyme Q(10) and coenzyme Q(10)-related compounds and formulations. *Expert Opin Inv Drug.* 2010;19(4):535-54.
43. Montini G, Malaventura C, Salviati L. Early coenzyme Q10 supplementation in primary coenzyme Q10 deficiency. *N Engl J Med.* 2008;358(26):2849-50.
44. Feng C, Wang Q, Wang J, Liu F, Shen H, Fu H, et al. Coenzyme Q10 supplementation therapy for 2 children with proteinuria renal disease and ADCK4 mutation: Case reports and literature review. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(47):e8880.
45. Sourris KC, Harcourt BE, Tang PH, Morley AL, Huynh K, Penfold SA, et al. Ubiquinone (coenzyme Q10) prevents renal mitochondrial dysfunction in an experimental model of type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(3):716-23.
46. Persson MF, Franzen S, Catrina SB, Dallner G, Hansell P, Brismar K, et al. Coenzyme Q10 prevents GDP-sensitive mitochondrial uncoupling, glomerular hyperfiltration and proteinuria in kidneys from db/db mice as a model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2012;55(5):1535-43.
47. Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, et al. COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest.* 2011;121(5):2013-24.
48. Salviati L, Trevisson E, Rodriguez Hernandez MA, Casarin A, Pertegato V, Doimo M, et al. Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. *J Med Genet.* 2012;49(3):187-91.
49. Saiki R, Lunceford AL, Shi Y, Marbois B, King R, Pachuski J, et al. Coenzyme Q10 supplementation rescues renal disease in Pdss2kd/kd mice with mutations in prenyl diphosphate synthase subunit 2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(5):F1535-44.
50. Rotig A, Appelkvist EL, Geromel V, Chretien D, Kadhon N, Edery P, et al. Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q(10) deficiency. *Lancet.* 2000;356(9227):391-5.

51. Lopez LC, Quinzii CM, Area E, Naini A, Rahman S, Schuelke M, et al. Treatment of CoQ(10) Deficient Fibroblasts with Ubiquinone, CoQ Analogs, and Vitamin C: Time- and Compound-Dependent Effects. *Plos One*. 2010;5(7).
52. Kumar S, Rao R, Kumar A, Mahant S, Nanda S. Novel Carriers for Coenzyme Q10 Delivery. *Curr Drug Deliv*. 2016;13(8):1184-204.
53. Kakudo T, Chaki S, Futaki S, Nakase I, Akaji K, Kawakami T, et al. Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry*. 2004;43(19):5618-28.
54. Yamada Y, Akita H, Kogure K, Kamiya H, Harashima H. Mitochondrial drug delivery and mitochondrial disease therapy--an approach to liposome-based delivery targeted to mitochondria. *Mitochondrion*. 2007;7(1-2):63-71.
55. Zhang Y. A Review of the Delivery System of Coenzyme-Q10 Based on Nanotechnology. *IOP Conf Ser: Earth Environ Sci*; 2019; Xi'an, China: IOP Publishing; 2019. p. 242.
56. Pathak RK, Kolishetti N, Dhar S. Targeted nanoparticles in mitochondrial medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2015;7(3):315-29.
57. Ankola DD, Viswanad B, Bhardwaj V, Ramarao P, Kumar MN. Development of potent oral nanoparticulate formulation of coenzyme Q10 for treatment of hypertension: can the simple nutritional supplements be used as first line therapeutic agents for prophylaxis/therapy? *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;67(2):361-9.
58. Nehilla BJ, Bergkvist M, Popat KC, Desai TA. Purified and surfactant-free coenzyme Q10-loaded biodegradable nanoparticles. *Int J Pharm*. 2008;348(1-2):107-14.
59. Swarnakar NK, Jain AK, Singh RP, Godugu C, Das M, Jain S. Oral bioavailability, therapeutic efficacy and reactive oxygen species scavenging properties of coenzyme Q10-loaded polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(28):6860-74.
60. Torchilin VP. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release*. 2001;73(2-3):137-72.
61. Uekaji Y, Onishi M, Nakata D, Terao K, Paananen A, Partanen R, et al. Micelle formation of coenzyme Q10 with dipotassium glycyrrhizate using inclusion complex of coenzyme Q10 with gamma-cyclodextrin. *J Phys Chem B*. 2014;118(39):11480-6.
62. Liu L, Mao K, Wang W, Pan H, Wang F, Yang M, et al. Kolliphor(R) HS 15 Micelles for the Delivery of Coenzyme Q10: Preparation, Characterization, and Stability. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17(3):757-66.
63. Sharma A, Soliman GM, Al-Hajaj N, Sharma R, Maysinger D, Kakkar A. Design and evaluation of multifunctional nanocarriers for selective delivery of coenzyme Q10 to mitochondria. *Biomacromolecules*. 2012;13(1):239-52.
64. Joshi MD, Muller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71(2):161-72.
65. Piao H, Ouyang M, Xia D, Quan P, Xiao W, Song Y, et al. In vitro-in vivo study of CoQ10-loaded lipid nanoparticles in comparison with nanocrystals. *Int J Pharm*. 2011;419(1-2):255-9.
66. Schwarz JC, Baisaeng N, Hoppel M, Low M, Keck CM, Valenta C. Ultra-small NLC for improved dermal delivery of coenzyme Q10. *Int J Pharm*. 2013;447(1-2):213-7.

67. Singh B, Bandopadhyay S, Kapil R, Singh R, Katare O. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): formulation development, characterization, and applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2009;26(5):427-521.
68. Rao S, Tan A, Boyd BJ, Prestidge CA. Synergistic role of self-emulsifying lipids and nanostructured porous silica particles in optimizing the oral delivery of lovastatin. *Nanomedicine (Lond).* 2014;9(18):2745-59.
69. Merkus FW, Verhoef JC, Marttin E, Romeijn SG, van der Kuy PH, Hermens WA, et al. Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;36(1):41-57.
70. Yang HY, Song JF. [Inclusion of coenzyme Q10 with beta-cyclodextrin studied by polarography]. *Yao Xue Xue Bao.* 2006;41(7):671-4.
71. Wang Z, Guo W, Kuang X, Hou S, Liu H. Nanopreparations for mitochondria targeting drug delivery system: Current strategies and future prospective. *Asian J Pharm Sci.* 2017;12(6):498-508.
72. Zhang Y, Avalos JL. Traditional and novel tools to probe the mitochondrial metabolism in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2017;9(2).
73. Gerencser AA, Chinopoulos C, Birket MJ, Jastroch M, Vitelli C, Nicholls DG, et al. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J Physiol.* 2012;590(12):2845-71.
74. Frommer WB, Davidson MW, Campbell RE. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem Soc Rev.* 2009;38(10):2833-41.
75. Antoniewicz MR. Methods and advances in metabolic flux analysis: a mini-review. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2015;42(3):317-25.
76. Juranic N, Nemutlu E, Zhang S, Dzeja P, Terzic A, Macura S. (31)P NMR correlation maps of (18)O/(16)O chemical shift isotopic effects for phosphometabolite labeling studies. *J Biomol NMR.* 2011;50(3):237-45.
77. Dzeja PP, Hoyer K, Tian R, Zhang S, Nemutlu E, Spindler M, et al. Rearrangement of energetic and substrate utilization networks compensate for chronic myocardial creatine kinase deficiency. *J Physiol.* 2011;589(Pt 21):5193-211.
78. Nemutlu E, Zhang S, Juranic NO, Terzic A, Macura S, Dzeja P. 18O-assisted dynamic metabolomics for individualized diagnostics and treatment of human diseases. *Croat Med J.* 2012;53(6):529-34.
79. Nemutlu E, Zhang S, Gupta A, Juranic NO, Macura SI, Terzic A, et al. Dynamic phosphometabolomic profiling of human tissues and transgenic models by 18O-assisted (31)P NMR and mass spectrometry. *Physiol Genomics.* 2012;44(7):386-402.
80. Nemutlu E, Juranic N, Zhang S, Ward LE, Dutta T, Nair KS, et al. Electron spray ionization mass spectrometry and 2D 31P NMR for monitoring 18O/16O isotope exchange and turnover rates of metabolic oligophosphates. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(3):697-706.
81. Stempel KE, Boyer PD. Refinements in oxygen-18 methodology for the study of phosphorylation mechanisms. *Methods Enzymol.* 1986;126:618-39.
82. Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Kinetics and compartmentation of energy metabolism in intact skeletal muscle determined from 18O labeling of metabolite phosphoryls. *J Biol Chem.* 1991;266(23):15110-9.

83. Pucar D, Janssen E, Dzeja PP, Juranic N, Macura S, Wieringa B, et al. Compromised energetics in the adenylate kinase AK1 gene knockout heart under metabolic stress. *J Biol Chem*. 2000;275(52):41424-9.
84. Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Juranic N, Macura S, Terzic A. Cellular energetics in the preconditioned state: protective role for phosphotransfer reactions captured by <sup>18</sup>O-assisted <sup>31</sup>P NMR. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44812-9.
85. Pucar D, Dzeja PP, Bast P, Gumina RJ, Drahl C, Lim L, et al. Mapping hypoxia-induced bioenergetic rearrangements and metabolic signaling by <sup>18</sup>O-assisted <sup>31</sup>P NMR and <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Mol Cell Biochem*. 2004;256-257(1-2):281-9.
86. Pucar D, Bast P, Gumina RJ, Lim L, Drahl C, Juranic N, et al. Adenylate kinase AK1 knockout heart: energetics and functional performance under ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(2):H776-82.
87. Dawis SM, Walseth TF, Deeg MA, Heyman RA, Graeff RM, Goldberg ND. Adenosine triphosphate utilization rates and metabolic pool sizes in intact cells measured by transfer of <sup>18</sup>O from water. *Biophys J*. 1989;55(1):79-99.
88. Zeleznikar RJ, Dzeja PP, Goldberg ND. Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem*. 1995;270(13):7311-9.
89. Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol*. 2006;571(Pt 2):253-73.
90. Trushina E, Nemutlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(2):e32737.
91. Zhang S, Nemutlu E, Terzic A, Dzeja P. Adenylate Kinase Phosphotransfer and AMP Signaling Regulate Cardiomyocyte Cell Cycle and Heart Regenerative Capacity. *Circulation*. 2012;126(21).
92. Zhang S, Nemutlu E, Terzic A, Dzeja P. Regenerative Metabolome and Energetic Signaling Mechanisms Governing Heart Renewal Capacity. *Circulation Research*. 2012;111(4).
93. Mangalam A, Poisson L, Nemutlu E, Datta I, Denic A, Dzeja P, et al. Profile of Circulatory Metabolites in a Relapsing-remitting Animal Model of Multiple Sclerosis using Global Metabolomics. *J Clin Cell Immunol*. 2013;4.
94. Basaran E, Aras S, Cansaran Duman D. General Outlook and Applications of Genomics, Proteomics and Metabolomics. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2010;67(2):85-96.
95. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:653-83.
96. Marrache S, Dhar S. Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(40):16288-93.
97. Baysal I, Yabanoglu-Ciftci S, Tunc-Sarisozen Y, Ulubayram K, Ucar G. Interaction of selegiline-loaded PLGA-b-PEG nanoparticles with beta-amyloid fibrils. *J Neural Transm (Vienna)*. 2013;120(6):903-10.
98. Orozco D, Skamarack J, Reins K, Titlow B, Lunetta S, Li F, et al. Determination of ubiquinone (coenzyme Q10, ubiquinol-10) in raw materials and

dietary supplements by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation. *J AOAC Int.* 2007;90(5):1227-36.

99. Velichkovska M, Surnar B, Nair M, Dhar S, Toborek M. Targeted Mitochondrial COQ10 Delivery Attenuates Antiretroviral-Drug-Induced Senescence of Neural Progenitor Cells. *Mol Pharm.* 2019;16(2):724-36.

100. Bergamini C, Moruzzi N, Sblendido A, Lenaz G, Fato R. A water soluble CoQ10 formulation improves intracellular distribution and promotes mitochondrial respiration in cultured cells. *PLoS One.* 2012;7(3):e33712.

101. Eylem CC, Yilmaz M, Derkus B, Nemutlu E, Camci CB, Yilmaz E, et al. Untargeted multi-omic analysis of colorectal cancer-specific exosomes reveals joint pathways of colorectal cancer in both clinical samples and cell culture. *Cancer Letters.* 2020;469:186-94.

102. Mishra PR, Al Shaal L, Müller RH, Keck CM. Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International journal of pharmaceutics.* 2009;371(1-2):182-9.

103. Marrache S, Pathak RK, Dhar S. Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014;111(29):10444-9.

104. Zielonka J, Joseph J, Sikora A, Hardy M, Ouari O, Vasquez-Vivar J, et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem Rev.* 2017;117(15):10043-120.

105. Gagliardi A, Giuliano E, Venkateswararao E, Fresta M, Bulotta S, Awasthi V, et al. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Front Pharmacol.* 2021;12:601626.

106. Kloepping KC, Kraus AS, Hedlund DK, Gnade CM, Wagner BA, McCormick ML, et al. Triphenylphosphonium derivatives disrupt metabolism and inhibit melanoma growth in vivo when delivered via a thermosensitive hydrogel. *Plos One.* 2020;15(12).

## 8. EKLER

### EK-1: Tez çalışması orijinallik raporu

KOENZİM Q10 NEFROPATİSİNDE KOENZİM Q10 İÇERİKLİ  
NANOTERAPÖTİKLERİN TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI  
VE İN VİTRO MODELDE MİTOKONDİYAL FONKSİYONLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI

#### ORJİNALLİK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>10</b>       | % <b>9</b>          | % <b>3</b> | % <b>4</b>       |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |             |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a><br>İnternet Kaynağı                                                                                                                                                                              | % <b>6</b>  |
| <b>2</b> | Hamide Sena Ozbay, Samiye Yabanoglu-Ciftci, Ipek Baysal, Merve Gultekinoglu et al.<br>"Mitochondria-targeted CoQ10 loaded PLGA-b-PEG-TPP nanoparticles: Their effects on mitochondrial functions of COQ8B HK-2 cells",<br>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2022<br>Yayın | % <b>1</b>  |
| <b>3</b> | Submitted to Hacettepe University<br>Öğrenci Ödevi                                                                                                                                                                                                                                              | % <b>1</b>  |
| <b>4</b> | <a href="http://www.freepatentsonline.com">www.freepatentsonline.com</a><br>İnternet Kaynağı                                                                                                                                                                                                    | <% <b>1</b> |
| <b>5</b> | <a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a><br>İnternet Kaynağı                                                                                                                                                                                                              | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a><br>İnternet Kaynağı                                                                                                                                                                                      |             |

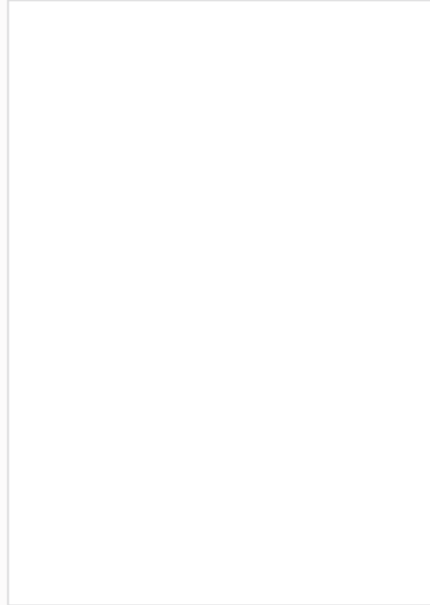
**EK-2: Turnitin dijital makbuz**

## Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Hamide Sena Özbay  
Ödev başlığı: Sena tez  
Gönderi Başlığı: KOENZİM Q10 NEFROPATİSİNDE KOENZİM Q10 İÇERİKLİ NAN...  
Dosya adı: SENA\_TEZ-son\_orjinallik.docx  
Dosya boyutu: 6.87M  
Sayfa sayısı: 88  
Kelime sayısı: 15,287  
Karakter sayısı: 111,125  
Gönderim Tarihi: 13-Nis-2022 02:14ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 1809631944



## EK-3: Tezden Üretilen Yayın

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 173 (2022) 22–33



Contents lists available at ScienceDirect  
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejpb](http://www.elsevier.com/locate/ejpb)

## Mitochondria-targeted CoQ<sub>10</sub> loaded PLGA-*b*-PEG-TPP nanoparticles: Their effects on mitochondrial functions of COQ8B<sup>-/-</sup> HK-2 cells

Hamide Sena Ozbay<sup>a</sup>, Samiye Yabanoglu-Ciftci<sup>a,\*</sup>, Ipek Baysal<sup>b</sup>, Merve Gultekinoglu<sup>c</sup>, Cemil Can Eylem<sup>d</sup>, Kezban Ulubayram<sup>c,e</sup>, Emirhan Nemutlu<sup>d,f</sup>, Rezan Topaloglu<sup>g</sup>, Fatih Ozaltin<sup>h,\*</sup>

<sup>a</sup> Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Sıhhiye, Ankara 06100, Turkey

<sup>b</sup> Hacettepe University, Hacettepe University, Faculty of Health Sciences, Ankara, Turkey

<sup>c</sup> Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Sıhhiye, Ankara 06100, Turkey

<sup>d</sup> Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Sıhhiye, Ankara 06100, Turkey

<sup>e</sup> Hacettepe University, Graduate Department of Bioengineering, Beytepe, Ankara 06800, Turkey

<sup>f</sup> Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Bioanalytic and Omic Laboratory, Sıhhiye, Ankara 06100, Turkey

<sup>g</sup> Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Division of Pediatric Nephrology, Sıhhiye, Ankara 06100, Turkey

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Coenzyme Q<sub>10</sub>

COQ8B

Polymeric nanoparticle

Targeting Mitochondria

Metabolomics, Treatment

## ABSTRACT

Coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) deficiency exhibits signs of multiple organ dysfunctions, particular subtypes present isolated kidney involvement progressing to chronic kidney disease. In these patients, early administration of oral CoQ<sub>10</sub> has been shown to decrease proteinuria and to delay development of chronic kidney disease, which suggests that it may have a renoprotective potential in these patients. However, CoQ<sub>10</sub> bioavailability in mitochondria is low, therefore its efficacy is limited. We aimed to develop mitochondria-targeted CoQ<sub>10</sub> loaded poly (lactic-co-glycolic acid)-poly(ethylene glycol)-triphenylphosphonium nanoparticles (CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs) that would be more efficient in the treatment of CoQ<sub>10</sub> nephropathies. These nanoparticles were found to have a size of approximately 150 nm and a zeta potential of + 20 mV. The entrapment efficiency of the nanoparticles was determined as 40%. Cytotoxicity studies showed no effect on the viability of the human kidney proximal tubule epithelial cells exposed to the nanoparticles. The efficacy of the formulated nanoparticles on *in vitro* disease model, which was developed in the human kidney proximal tubule epithelial cells by siRNA based silencing of the COQ8B, was evaluated through mitochondrial functions by means of metabolomic analyses. We showed that the treatment of COQ8B<sup>-/-</sup> cells with mitochondria-targeted nanoparticles was more effective in increasing the tricarboxylic acid cycle rate compared to free-CoQ<sub>10</sub>. Our formulation would be more effective in treatment of CoQ<sub>10</sub>-related nephropathies than conventional formulations.

## 1. Introduction

Coenzyme Q (CoQ, Ubiquinone), is a lipophilic vitamin-like molecule involved in many crucial cellular processes, such as adenosine triphosphate (ATP) production through the mitochondrial respiratory chain, beta oxidation of fatty acids. It is one of the most important cellular antioxidants and is the cofactor of several mitochondrial dehydrogenases. It has also a role in the pyrimidine nucleoside

biosynthesis. It is comprised of a quinone group and a polyisoprenoid tail of variable length in different species: six units in yeast (CoQ<sub>6</sub>), nine in mice (CoQ<sub>9</sub>) and 10 in humans (CoQ<sub>10</sub>) [1].

The CoQ<sub>10</sub> biosynthetic pathway is highly complex and requires the products of at least 16 different genes (PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ3, COQ4, COQ5, COQ6, COQ7, COQ8A, COQ8B, COQ9, COQ10A, COQ10B, FDX1L, FDXR, and ALDH3A1) [1,2]. Mutations in some of these genes have already been identified in a wide spectrum of patients with primary

Abbreviations: CoQ<sub>10</sub>, Coenzyme Q<sub>10</sub>.

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [senaobay@hacettepe.edu.tr](mailto:senaobay@hacettepe.edu.tr) (H. Sena Ozbay), [samiye@hacettepe.edu.tr](mailto:samiye@hacettepe.edu.tr) (S. Yabanoglu-Ciftci), [ipekbaysal@hacettepe.edu.tr](mailto:ipekbaysal@hacettepe.edu.tr) (I. Baysal), [merve.g@hacettepe.edu.tr](mailto:merve.g@hacettepe.edu.tr) (M. Gultekinoglu), [cemilcaneylem@gmail.com](mailto:cemilcaneylem@gmail.com) (C. Can Eylem), [ukezban@hacettepe.edu.tr](mailto:ukezban@hacettepe.edu.tr) (K. Ulubayram), [enemutlu@hacettepe.edu.tr](mailto:enemutlu@hacettepe.edu.tr) (E. Nemutlu), [rezantopaloglu@hacettepe.edu.tr](mailto:rezantopaloglu@hacettepe.edu.tr) (R. Topaloglu), [fozaltin@hacettepe.edu.tr](mailto:fozaltin@hacettepe.edu.tr) (F. Ozaltin).

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.02.018>

Received 26 December 2021; Received in revised form 22 February 2022; Accepted 23 February 2022

Available online 26 February 2022

0939-6411/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

CoQ<sub>10</sub> deficiencies including patients with steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) and some adolescents with chronic kidney disease (CKD) of unknown origin [3,4].

Patients with *COQ8B* mutations have been reported to have reduced cellular CoQ<sub>10</sub> levels and intracellular mitochondrial respiratory enzyme activities [3]. Progression of CoQ<sub>10</sub>-related nephropathies may be delayed with oral CoQ<sub>10</sub> supplementation, if it is diagnosed early [5]. Hence we hypothesized that kidney disease resulting from *COQ8B* mutations can be ameliorated with more efficient CoQ<sub>10</sub> supplementation, that would not possible with current formulations in the market.

Due to its chemical structure, CoQ<sub>10</sub> has low bioavailability and high tissue distribution. Reaching effective concentrations of CoQ<sub>10</sub> in the mitochondria is challenging [6]. It was suggested that extremely high levels of CoQ<sub>10</sub> such as > 10  $\mu$ M are required to reach therapeutic concentrations in cell culture experiments [7]. Instead of the use of high dose CoQ<sub>10</sub>, development of strategies that aim to target the CoQ<sub>10</sub> directly into mitochondria would be rational.

Recently, mitochondria have become an attractive target in drug design for many diseases [8], however there are some difficulties to deliver therapeutics to the mitochondria due to the mitochondrial special bilayer structure and negative membrane potential [9]. The most effective strategy for delivering drugs to the mitochondria is binding an alkyltriphenylphosphonium lipophilic cation to the drug molecule [10]. In this context, polymeric NPs are prominent candidates for effective drug delivery due to their biocompatibility [8]. In comparison to the other polymers, due to its properties such as amphiphilicity and easier synthesis PLGA-*b*-PEG has attracted attention [11]. During formation of nanoparticles with PLGA-*b*-PEG polymer, PLGA, which is hydrophobic in nature remains inside the nanoparticles and the hydrophilic PEG moiety creates a stabilizing shell by facing outside. PLGA-*b*-PEG is considered as a promising biomaterial for drug delivery applications as it possesses all the desired properties of its components, PLGA and PEG, and shows improved qualities with respect to the single PLGA or PEG polymers. PLGA-*b*-PEG is biocompatible and biodegradable like PLGA polymer and also due to its PEG moiety, formulated nanoparticles with PLGA-*b*-PEG undergo slower uptake by the reticulo-endothelial system (RES) in the liver, spleen and have increased circulation time, are stable in aqueous solutions, and have increased solubility [12,13]. Moreover, it is possible to entrap hydrophobic drugs in the inner core region of these nanoparticles and protect them against hydrolysis or enzymatic degradation and to transport them at desired concentration to the site of action. Additionally, for targeting tissues or cell compartments PEG chains can be used for conjugation of active targeting molecules [13].

In this study, we employed a mitochondria-targeted PLGA-*b*-PEG nanoparticle-based strategy for more effective CoQ<sub>10</sub> delivery and aimed to determine how this nanotherapeutic affects the mitochondrial functions. We showed that our developed NPs are effective by means of accelerating the rate of TCA cycle compared to free-CoQ<sub>10</sub> in *COQ8B* silenced HK-2 cells. Our findings indicate that this formulation is promising and therefore a strong candidate in the treatment of CoQ<sub>10</sub>-related nephropathies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Poly(lactic-co-glycolic acid)-block-poly(ethylene glycol) (PLGA-*b*-PEG) (RGP d 50155) from Evonik (Germany), Coenzyme Q<sub>10</sub> (C9538), (5-Carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide (TPP) (21935) and other chemicals from Sigma-Aldrich (Germany), gene specific siRNA molecules from Dharmacon (USA), and HK-2 cell line from ATCC (USA) were purchased.

### 2.2. Cell culture

HK-2 cells, immortalized by transduction with human papilloma

virus 16 E6/E7 genes, were cultured on T75 culture plates at 5% CO<sub>2</sub> and 37 °C, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-High Glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin following the procedures of the manufacturer (ATCC, USA). Culture medium was changed with fresh growth medium every 2 days until confluence. Cells were subcultured by trypsinization at 80–90% confluence. For siRNA transfection and drug-loaded nanoparticle treatment, cells were cultured on 96-well culture plates.

### 2.3. siRNA transfection

ON-TARGETplus Human *COQ8B* siRNA was transfected into HK-2 cells to silence the expression of *COQ8B*. Cells were transfected using DharmaFect 1 transfection reagent by modifying the method used by Chen et al [14]. Before transfection, HK-2 cells were seeded at an initial density of  $5 \times 10^3$  cells/well in 96-well plates in complete medium, and allowed to adhere overnight. Then, 100  $\mu$ L of transfection mixture (10  $\mu$ M siRNA + DharmaFECT1 + antibiotics-free medium) was added to each well. To optimize transfection efficiency, cells were treated with 25, 50 or 100 nM of siRNA for 48 h.

### 2.4. Real-time PCR

Total RNA was extracted from HK-2 cells with RNA extraction kit (GeneAll Biotechnology, Korea) according to the manufacturer's instructions. 1  $\mu$ g of total RNA from each sample was used for reverse transcription (RT) using a SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline, USA). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed by Viia 7 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, USA) using WIZPURE qPCR Master (SYBR) (WIZBIO Solutions, South Korea) according to the manufacturer's instructions.

Primers used to amplify specific gene products from the cDNA of HK-2 cells were as follows:

*COQ8B* sense: 5'-CACATTGCCTGGAGGAGAAGA-3'  
*COQ8B* antisense: 5'-CTAGCAACCCAGGGGAGAACC-3'  
*GAPDH* sense: 5'-ATGGGAGCCGTTAGGAAA-3'  
*GAPDH* antisense: 5'-GCATCGCCCCACTTGATTTT-3'

The relative gene expression levels were calculated using the comparative C<sub>t</sub> ( $\Delta\Delta C_t$ ) method [15] where the relative expression was calculated as  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  and C<sub>t</sub> represented the threshold cycle.

### 2.5. Western blot analysis

COQ8B protein expression levels of HK-2 cells were determined by modifying the Western blot method used by Chen et al [14]. HK-2 cells were plated onto 96 well plate at  $0.5 \times 10^4$  cells/well and cultured for siRNA transfection. Cells were harvested and lysed in RIPA buffer for 30 min on ice. Cell lysates were centrifuged at 20,000g for 20 min at 4 °C and protein concentrations measured using BCA protein assay kit. Equal amounts of protein were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels, transferred onto nitrocellulose membranes and blocked in the blocking solution in the Tris buffered saline (TBS) solution containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% Tween®20 at the room temperature overnight. Membranes were probed overnight at 4°C with primary rabbit polyclonal anti-COQ8B. Then, membranes were washed with the TBS solution containing 0.1% Tween®20. After washing step, membranes were incubated with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) at the room temperature for 1 h. After the incubation membranes were washed with TBS solution containing 0.1% Tween®20. Sites of antibody-antigen reaction were viewed using Advanta Western Bright ECL HRP substrate.

## 2.6. TPP conjugation with PLGA-b-PEG polymer and synthesis of CoQ<sub>10</sub> loaded nanoparticles

Mitochondria-targeted NPs were developed by encapsulating CoQ<sub>10</sub> using a biocompatible polymer PLGA-b-PEG, which functionalized with a terminal lipophilic TPP cation. CoQ<sub>10</sub> loaded NPs (CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs) were synthesized by the nanoprecipitation method with slight modification [16]. TPP directs NPs to the mitochondria by exploiting the negative membrane potential ( $\Delta\psi$ m) of the inner mitochondrial membrane (IMM). In preparation of CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs as a first step PLGA-b-PEG-OH polymer was conjugated with TPP (Fig. 1A). For this purpose, PLGA-b-PEG-OH (0.022 mmol), dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (0.136 mmol), 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (0.07 mmol) and TPP (0.136 mmol) were dissolved in dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). The reaction was carried out at 0 °C for 16 h. Then cold diethyl ether was added to the resulting mixture to precipitate the polymer. The polymer was washed with diethyl ether-methanol (1:1) mixture and the solvent was evaporated under vacuum. The resulting polymer was characterized by Fourier transform infrared (FT-IR) and Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Chemical structures of PLGA-b-PEG, TPP and PLGA-b-PEG-TPP were confirmed by <sup>1</sup>H NMR analysis. Samples were dissolved in d-chloroform (CDCl<sub>3</sub>) prior to analysis. The spectra were recorded at 25 °C by using 300 MHz Bruker Biospin NMR Spectrometer (Germany).

For NPs preparation, PLGA-b-PEG-TPP and CoQ<sub>10</sub> (polymer/ CoQ<sub>10</sub> ratio 5:1 (w/w)) were dissolved in 1 mL acetonitrile. The mixture was added dropwise to nanopure water with constant stirring at 900 rpm. This solution was then stirred overnight to remove organic solvent and trigger nanoparticle formation. Nanoparticle suspension was centrifuged at 40,000g for 30 min. and then nanoparticles were rinsed to remove residual polymer and unloaded drug. The non-targeted NPs (CoQ<sub>10</sub>-NPs) were also prepared using PLGA-b-PEG-OH polymer as control. Schematic view of the formulated targeted and non-targeted NPs is shown in Fig. 1B.

## 2.7. Characterization of nanoparticles

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements of prepared nanoparticle formulations were performed to determine NP size, polydispersity index (PDI) and zeta potential with Malvern Zetasizer Nano ZS (UK) particle size analyzer. All measurements were performed at 25 °C for at least 3 independent experiments and results were expressed as mean  $\pm$  SEM.

Morphological properties of NPs such as shape, geometry, size and distribution were evaluated by Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) (TESCAN Gaia3, Czech Republic). After the samples were dripped onto the STEM grids, they were dried and the sample preparation process was completed. Prepared samples were analyzed at 100 kX magnification, 2.07  $\mu$ m area, 30.0 kV voltage in bright STEM mode.

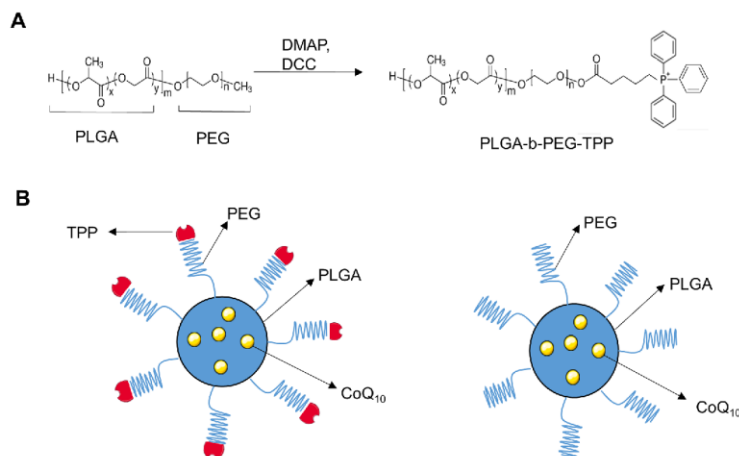
## 2.8. Determination of CoQ<sub>10</sub> loading efficiency in nanoparticles by HPLC method

CoQ<sub>10</sub> loading efficiencies of the targeted and non-targeted NPs were determined directly by quantifying loaded CoQ<sub>10</sub> amount in the NPs. The amount of CoQ<sub>10</sub> in the NPs was quantified by modifying the HPLC method developed by Orozco et al [17]. In this method, acetonitrile-tetrahydrofuran-water mixture was used as the mobile phase in a ratio of 55:40:5. ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (4.6  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m) was used for analytical separation (25 °C) and CoQ<sub>10</sub> detection was performed at  $\lambda$  = 274 nm. Flow rate and injection volume were set as 1 mL/min and 20  $\mu$ L, respectively. 1 mg/mL stock solution of CoQ<sub>10</sub> was prepared in acetonitrile and eight different calibration points were prepared by dilution (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.1, 0.05, 0.0125, 0.005 mg/mL). CoQ<sub>10</sub> entrapment efficiency was calculated with the following formula.

$$\text{Entrapment Efficiency (\%)} = \frac{W_{\text{entrapped drug}}}{W_{\text{total drug}}} \times 100$$

$W_{\text{total drug}}$ : Amount of CoQ<sub>10</sub> used for NP synthesis

$W_{\text{entrapped drug}}$ : Amount of CoQ<sub>10</sub> in the NPs



**Fig. 1.** (A) Synthesis of PLGA-b-PEG-TPP conjugated polymer. (B) Schematic view of the formulated CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs and CoQ<sub>10</sub>-NPs on the left and right side respectively. (PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid); PEG: poly ethylene glycol; DMAP: dimethylaminopyridine; DCC: dicyclohexylcarbodiimide; TPP: (5- Carboxy-pentyl)triphenylphosphonium bromide; CoQ<sub>10</sub>: Coenzyme Q<sub>10</sub>).

## 2.9. XTT assay

XTT assay was performed to evaluate the effect of CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs on the proliferation of HK-2 cells. Approximately  $4 \times 10^3$  to  $6 \times 10^3$  cells were seeded in each well of 96-well cell culture plates in DMEM medium containing 10% FBS. After the cells were treated with different doses of NPs (25, 50, 100, 200 and 300  $\mu$ M) for 48 h, 50  $\mu$ L of XTT reaction solution was added per well according to the kit instructions. After 4 h of incubation at 37 °C, the absorbance values were recorded in the plate reader at 450 nm. The group with the highest cell viability without any treatment was accepted as 100% (control) and the viability rates of the experimental cells were expressed as % of control. Experiments were performed in triplicate and the results were expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments.

The following equation was used to determine the cell viability.

$$\text{Cell viability (\%)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{negative}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{negative}})] \times 100$$

In the equation;  $A_{\text{sample}}$  refers to the absorbance value of the sample cell group (nanoparticle application group),  $A_{\text{negative}}$  refers to the absorbance value of the medium and  $A_{\text{control}}$  refers to the absorbance value of the control cell group without any treatment.

## 2.10. Nanoparticle treatment

Following 72 h of siRNA treatment, experimental groups; Control (Group 1), siRNA (Group 2), siRNA + Free-CoQ<sub>10</sub> (Group 3), siRNA + CoQ<sub>10</sub>-NPs (non-targeted NPs, Group 4) and siRNA + CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs (mitochondria-targeted NPs, Group 5) were set up for nanoparticle application. The amount of NP to be administered to the cells was calculated based on the concentration of CoQ<sub>10</sub> in the NPs as determined by HPLC. Free-CoQ<sub>10</sub> or NPs were applied to the cells for 48 h with a final CoQ<sub>10</sub> concentration of 100  $\mu$ M. CoQ<sub>10</sub> concentration and incubation time were determined based on the results of previous studies [18,19].

## 2.11. Metabolomics analyses

HK-2 cells that reached 100% confluency were quickly washed with isotonic sodium chloride (NaCl) solution for three times. Cell culture plates were gently shaken, then placed in liquid nitrogen to freeze the cells. 100  $\mu$ L of methanol:water (9:1, v/v) mixture was added to the frozen cells and the cell culture plates were placed on liquid nitrogen again. Frozen cells were scraped by cell scraper and collected into eppendorf tubes. Another 100  $\mu$ L of methanol:water (9:1, v/v) mixture was added to each well of the cell culture plates to collect the remaining cells and combined with other cell suspensions. After the cells were precipitated for 10 min at 25,000xg at 4 °C, the supernatant was transferred to a 2 mL Eppendorf tube and stored at –20 °C till analysis with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Metabolomics analyses were performed with GC-MS as described in our previous study [20]. Briefly, the samples were evaporated in a vacuum centrifuge and methoxylated with 20  $\mu$ L of methoxyamine hydrochloride (20 mg/mL in pyridine) by keeping them in an oven at 30 °C for 90 min. Then, 80  $\mu$ L of N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide + trimethylchlorosilane (MSTFA + 1% TMCS) was added to the samples for derivatization at 37 °C for 30 min. Derivatized samples were transferred into silylated GC-MS vials and then analyzed by GC-MS system using DB5-MS column under optimized conditions. The complex chromatograms were deconvoluted and aligned using MS-DIAL software. The peaks of the metabolites were annotated using the Fiehn retention index library.

Data matrices obtained from GC-MS based metabolomic analyses were normalized using total peak area. Then, this data matrix was transferred to the SIMCA-P+ (v13.0, Umetrics, Umea, Sweden) program for multivariate analysis such as principal component analysis (PCA) for any systemic errors or outliers in the data set and partial least square-

discriminant analysis (PLS-DA) for reveal class discrimination and identification of the significantly altered metabolites in the groups. The variable importance in projection (VIP) values were used to differentiate the most important metabolites for group stratification. Lastly, the mean relative concentrations of metabolites were calculated and unpaired *t*-test was performed to compare the groups' changes in mean expression per metabolite.

## 2.12. Statistical analyses

All *in vitro* experiments were performed at least 3 times. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error mean (SEM). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 (Graphpad Software, USA). For metabolomics analyses unpaired *t*-test was performed to compare the changes between groups in mean expression per metabolite. Student *t*-test was applied to the metabolite values obtained from normal HK-2 cell line and COQ8B<sup>-/-</sup> cell lines *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. siRNA knockdown of COQ8B in HK-2 cells

The gene silencing efficiencies of different siRNA concentrations (25, 50 and 100 nM) in HK-2 cells transfected with siRNA are shown in Fig. 2A. The highest gene silencing efficiency was observed with the application of 100 nM siRNA for 48 h. Silencing efficiency was confirmed by western blot analysis for 100 nM siRNA concentration at 96 h (Fig. 2B).

### 3.2. FT-IR and NMR spectrum of PLGA-b-PEG-TPP

The FT-IR spectra of PLGA-b-PEG-TPP, TPP and PLGA-b-PEG are presented comparatively in Fig. 3. The asymmetric stretch vibrations of the P – O – P bridge from the structure of TPP at a wavelength of about 800 cm<sup>-1</sup> indicate the symmetrical and asymmetric stretching vibrations of the PO<sub>3</sub> group at a wavelength of about 1000 cm<sup>-1</sup>. Symmetrical and asymmetrical stretching vibrations at 1130 cm<sup>-1</sup> wavelength indicate the presence of O – P = O group and P = O stretching vibrations at 1210 cm<sup>-1</sup> wavelength. In addition, multiple peaks seen at a wavelength of 900–675 cm<sup>-1</sup> confirm the C-H bonds of aromatic structures. The shift created by carbonyl groups in the wavelength range of 1700–1750 cm<sup>-1</sup> in the PLGA-b-PEG-TPP structure after TPP conjugation also confirms the binding.

<sup>1</sup>H NMR spectra of PLGA-b-PEG-OH and PLGA-b-PEG-TPP confirm the conjugation of TPP to PLGA-b-PEG-OH polymer (Fig. 4). PLGA-b-PEG-OH <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  1.30–1.70 (lactic acid, –OCHCH<sub>3</sub>COO–), 3.60–3.80 (PEG, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O–), 4.70–4.90 (glycolic acid, HOCH<sub>2</sub>CO–), 5.20–5.30 (lactic acid, –OCHCH<sub>3</sub>COO–), 7.20–7.40 (d-chloroform, CDCl<sub>3</sub>). PLGA-b-PEG-TPP <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  1.30–1.70 (lactic acid, –OCHCH<sub>3</sub>COO–), 3.30–3.80 (PEG, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O–), 4.20–4.90 (glycolic acid, HOCH<sub>2</sub>CO–), 5.20–5.30 (lactic acid, –OCHCH<sub>3</sub>COO–), 7.20–7.40 (d-chloroform, CDCl<sub>3</sub>) and 7.70–7.90 (TPP, PPh<sub>3</sub> + ) [16,21]. The correlation of the PPh<sub>3</sub> + peak in the range of 7.70–7.90 with the TPP NMR spectrum confirms the conjugation of TPP with PLGA-b-PEG. Average size, PDI and zeta potential values of NPs are shown in Table 1 and Fig. 5. Average PDI values for prepared nanoparticles were observed between the range of 0.1 and 0.2, which indicate that the nanoparticles are distributed homogeneously. The size of the prepared NPs was in the range of 140–160 nm. CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs were found to be bigger in size compared to the size of CoQ<sub>10</sub>-NPs. Conjugation of the TPP cation to the PLGA-b-PEG polymer surface before nanoparticle synthesis led to an increase in particle size. Nevertheless, these NPs were still in the desired size range (<200 nm) for targeting the mitochondria. Based on their size, surface charge and monodisperse distribution CoQ<sub>10</sub>-NPs (NP1) and CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs (NP3) were found to

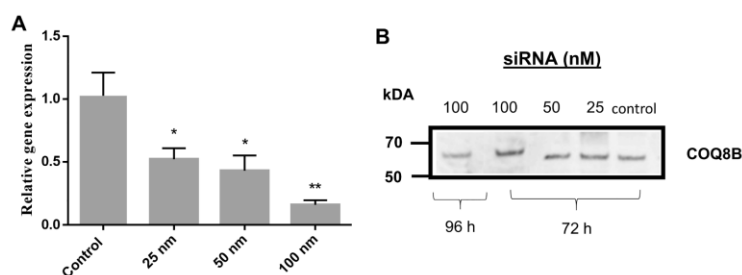


Fig. 2. Silencing efficiency of HK-2 cells transfected with different concentrations of siRNA. (A) *COQ8B* gene expression levels of HK-2 cell transfected with siRNA (0, 25 nM, 50 nM, 100 nM). Real-time PCR was used to quantify the mRNA expression of *COQ8B*. Gene expression level of *COQ8B* siRNA at 100 nM is 20% and silencing efficiency is ~80%. (B) *COQ8B* protein levels of HK-2 cells transfected with 25 nM, 50 nM and 100 nM siRNA for 72 and 96 h. Results (means  $\pm$  SEM) are from 3 sets of experiments. (\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  vs. control; by one-way ANOVA).

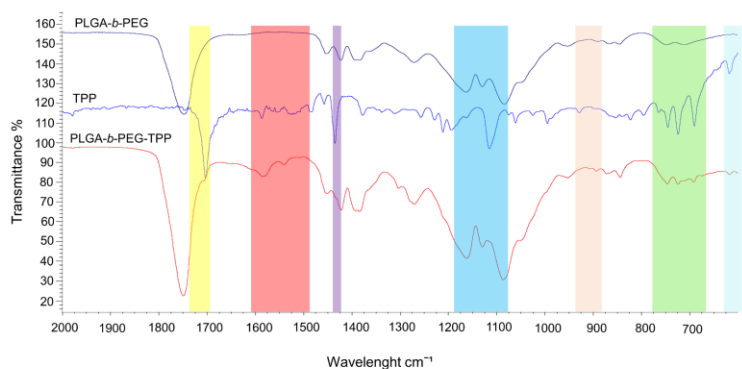


Fig. 3. FT-IR Spectrum of TPP, PLGA-b-PEG and PLGA-b-PEG-TPP polymers in between 700 and  $2000 \text{ cm}^{-1}$  wavelength. Colored bars indicate asymmetric stretch vibrations at specific wavelengths. TPP binding confirmed by the shift created by carbonyl groups. (TPP: (5-Carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide; PLGA-b-PEG: Poly(lactic-co-glycolic acid)-block-poly(ethylene glycol)).

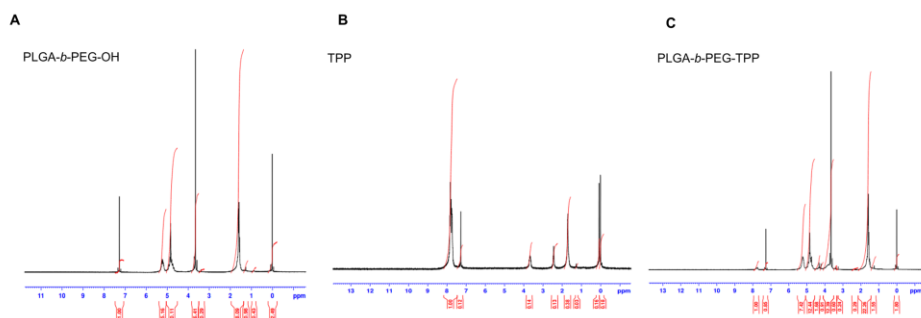


Fig. 4. NMR spectra of (A) PLGA-b-PEG-OH, (B) TPP and (C) PLGA-b-PEG-TPP. The correlation of the  $\text{PPh}_3$  + peak in the range of 7.70–7.90 with the TPP NMR spectrum confirms the conjugation of TPP with PLGA-b-PEG (TPP: (5-Carboxypentyl)triphenylphosphonium bromide; PLGA-b-PEG: Poly(lactic-co-glycolic acid)-block-poly(ethylene glycol)).

**Table 1**  
Average size, zeta potential and PDI data of nanoparticles.

| Nanoparticle Formulation         | TPP/ Polymer | Size (nm)    | Zeta Potential (mV) | Polydispersity Index (PDI) | Entrapment Efficiency % |
|----------------------------------|--------------|--------------|---------------------|----------------------------|-------------------------|
| CoQ <sub>10</sub> -NPs (NP1)     | –            | 141 ± 2.8    | −26.9               | 0.183                      | 91                      |
| CoQ <sub>10</sub> -TPP-NPs (NP2) | 1:2          | 131.8 ± 7.2  | +2.24               | 0.237                      | 82                      |
| CoQ <sub>10</sub> -TPP-NPs (NP3) | 1:1          | 157.8 ± 0.87 | +20.3               | 0.187                      | 40                      |

be appropriate to be used in further experiments. STEM images revealed that all nanoparticles were spherical and uniform in shape with standard dimensions and stable without aggregation (Fig. 6).

The cell viability of HK-2 cells treated with different doses of NPs (25, 50, 100, 200 and 300  $\mu$ M) is shown in Fig. 7.

### 3.3. CoQ<sub>10</sub> entrapment efficiency

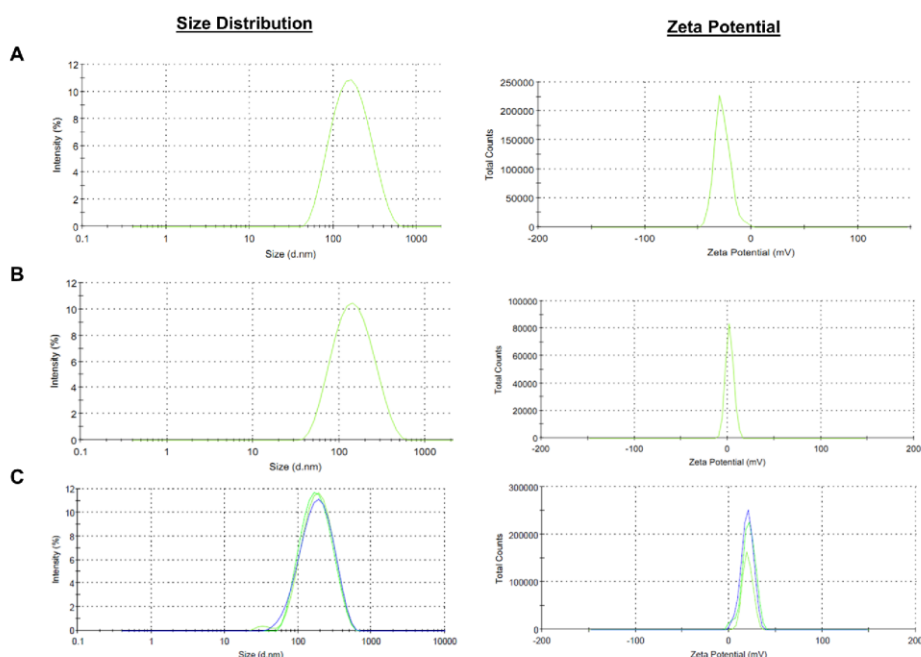
To determine the amount of CoQ<sub>10</sub> load in NPs by HPLC, CoQ<sub>10</sub> standard solutions were used to obtain a calibration curve (Fig. 8). HPLC peaks of standards containing 0.005; 0.0125; 0.05; 0.1; 0.125; 0.25; 0.5 and 1 mg/mL CoQ<sub>10</sub> were symmetrical to allow quantification, and the peak areas were calculated automatically by chromeleon software version 6.5 SP1 Build 956. The drug loading efficiency of the NPs are shown in Table 1. Drug loading efficiencies of prepared NPs were found to be approximately 90%, 80% and 40 for NP1, NP2 and NP3

respectively. This decrease in drug loading efficiency with the conjugation of TPP to the polymer was a predictable result. As a matter of fact, the encapsulation efficiency decreases as the amount of TPP-conjugated to the polymer surface increases as observed between NP2 and NP3.

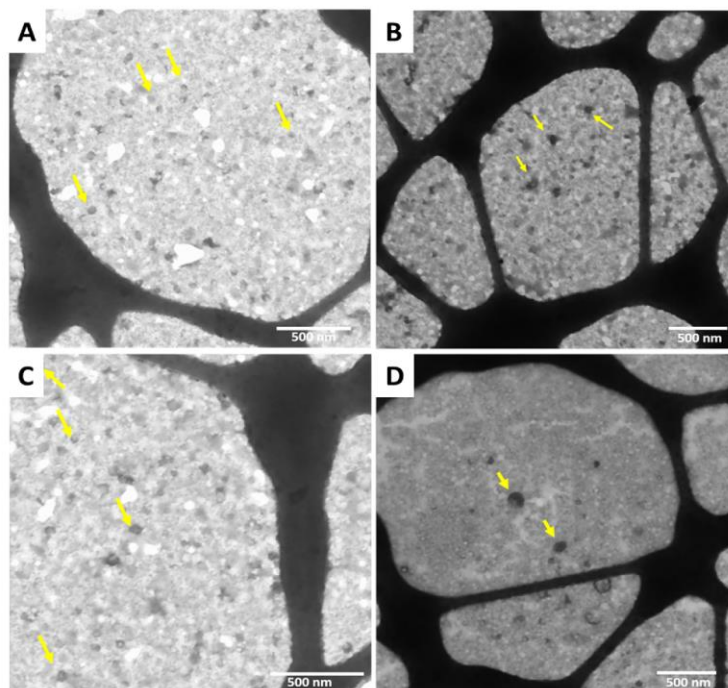
### 3.4. Effect of CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs on the concentration of krebs cycle metabolomic profile

As a result of GC-MS-based metabolomic analyses, 56 metabolites were identified in the HK-2 control cell group and the COQ8B<sup>−/−</sup> cell group in which mitochondria-targeted CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs were treated. (Supplementary Material, Table S1). The results were visualized using multivariate data analysis. First, PCA and PLS-DA analyses showed a clear separation between groups and no outliers in the data (Figs. 9 and 10). To enhance metabolomic changes, PLS-DA analyses were applied for binary comparisons (Fig. 11). In addition, Student *t*-test was applied to the metabolite values obtained from normal HK-2 cell line and COQ8B<sup>−/−</sup> cell lines (Supplementary Material, Table S2).

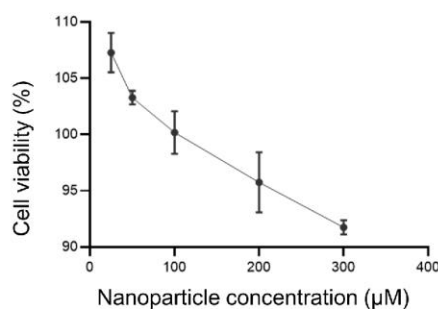
It was determined that 5 groups (control, siRNA, CoQ<sub>10</sub>-NPs, CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs and free-CoQ<sub>10</sub>) could be clearly separated from each other with the differences in the metabolites detected in the PLS-DA score plot (Fig. 10). Metabolites detected as a result of silencing of the COQ8B gene by siRNA in the HK-2 cell line shifted towards the right upper quadrant of the graph and moved away from the left lower quadrant where the control group was located. As a result of the treatment with CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs in the COQ8B<sup>−/−</sup> cell line, the metabolites shifted to the left upper quadrant and converged with the control group. Metabolic profiles with free-CoQ<sub>10</sub> and CoQ<sub>10</sub>-NPs were in the same quadrant with the siRNA



**Fig. 5.** Particle size distribution and zeta potential of NP1 (A), NP2 (B) and NP3 (C). (NP1: CoQ<sub>10</sub>-NPs; NP2: CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs (TPP/polymer ratio 1:2); NP3: CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs (TPP/polymer ratio 1:1).



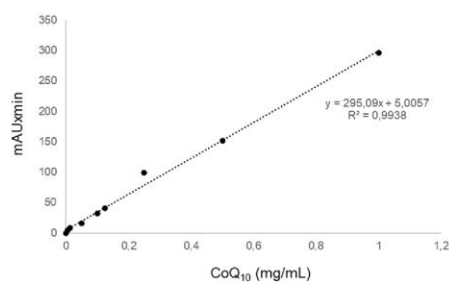
**Fig. 6.** STEM images of the formulated nanoparticles. Empty (A) and CoQ<sub>10</sub> loaded (B) NPs prepared with PLGA-*b*-PEG polymer. Empty (C) and CoQ<sub>10</sub> loaded (D) NPs prepared with PLGA-*b*-PEG-TPP polymer. Yellow arrows show nanoparticle structure. Samples were analyzed at 100,000 X magnification, 2.07  $\mu$ m area, 30.0 kV voltage in bright STEM mode. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 7.** Impact of CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs on cell viability. Cell viability assay (XTT assay) was performed on HK-2 cells with different doses of CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs for 48 h.

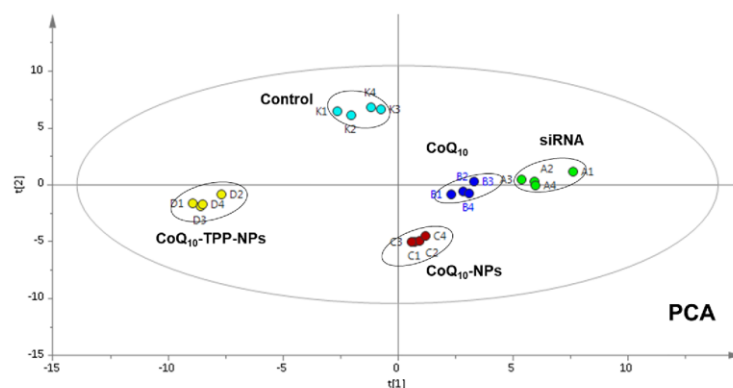
group.

The metabolomic profiles of cells in different experimental groups were compared in pairs and PLS-DA score graphs were created. The VIP graph was used to determine the metabolites that caused the

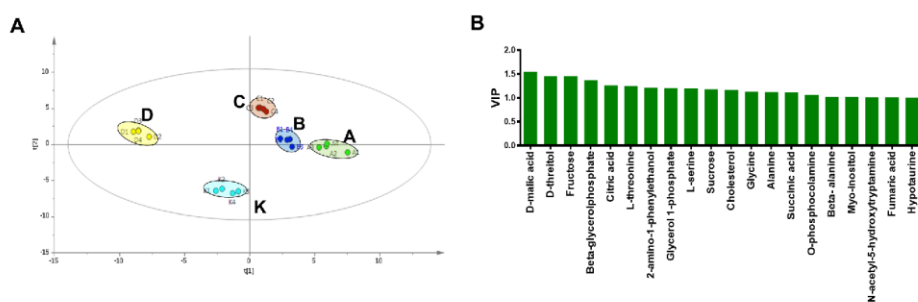


**Fig. 8.** Calibration curve of CoQ<sub>10</sub>.

differentiation in PLS-DA analyses. In this graph, metabolites that show statistically significant changes ( $P < 0.05$ ) between two groups were ranked according to their  $p$  values. The reliability and predictability of the obtained PLS-DA models were shown with high  $R^2$  ( $>0.990$ ) and  $Q^2$  ( $>0.966$ ). Score plots, VIP graphs and the regression coefficient plots of PLS-DA analyses are presented in Fig. 11 for control versus siRNA, free-CoQ<sub>10</sub> and CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs groups; siRNA versus free CoQ<sub>10</sub> and CoQ<sub>10</sub>-



**Fig. 9.** PCA score plot for metabolomics data of HK-2 cell. (Control: Non-treated cells; siRNA: *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells; CoQ<sub>10</sub>: Free-CoQ<sub>10</sub> treatment on *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells; CoQ<sub>10</sub>-NPs: Non-targeted CoQ<sub>10</sub> loaded PLGA-b-PEG NPs treatment on *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells; CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs: Mitochondria targeted CoQ<sub>10</sub> loaded PLGA-b-PEG NPs treatment on *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells).



**Fig. 10.** Multivariate data analysis of metabolomics data from HK-2 cells. **A)** PLS-DA score plot, **B)** VIP plot of metabolites causing differentiation in data analysis (K: Control, A: siRNA, B: Free CoQ<sub>10</sub>, C: CoQ<sub>10</sub>-NPs, D: CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs).

NPs groups; free-CoQ<sub>10</sub> versus CoQ<sub>10</sub>-NPs group.

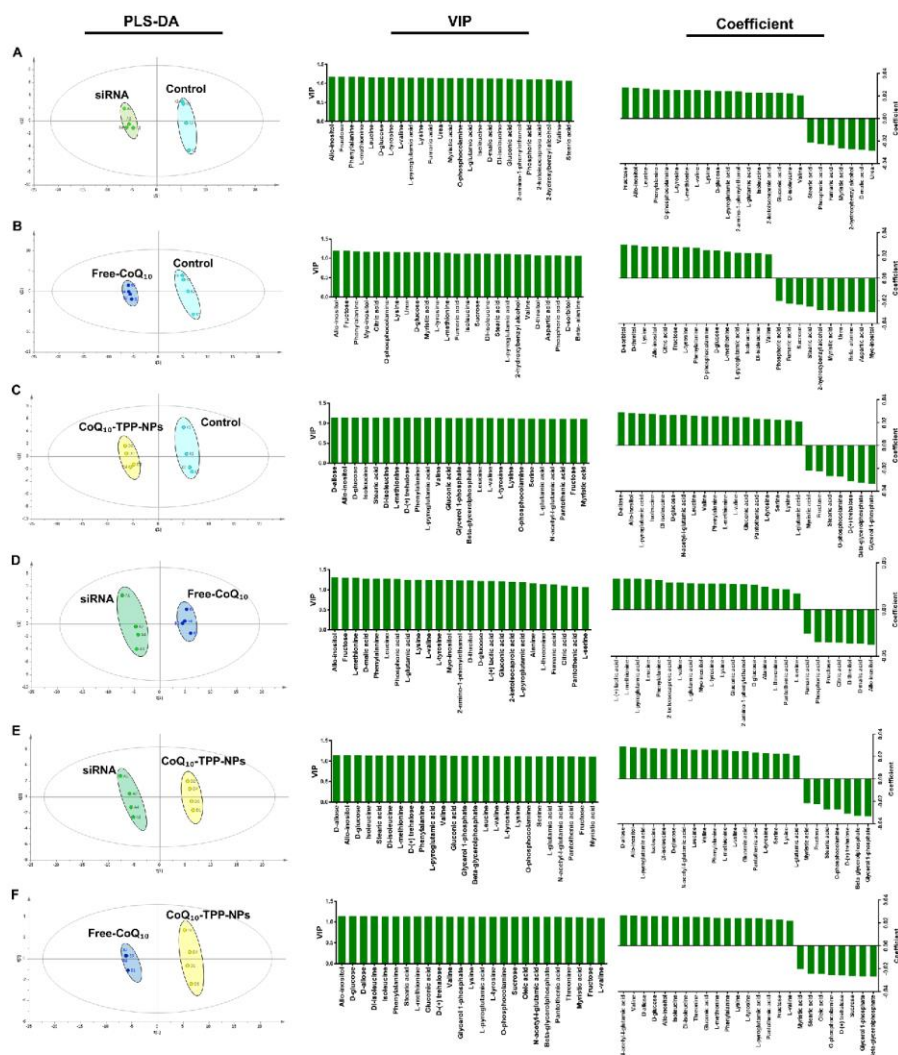
A heatmap diagram showed that there is a significant difference between the control and siRNA groups in terms of metabolite profile. However, the metabolite profile of targeted nanoparticle group was found to have similar pattern with the control group (Fig. 12).

#### 4. Discussion

In many years, huge efforts have been made to develop more effective drug delivery systems to overcome the negative biochemical properties of CoQ<sub>10</sub>, which limit its mitochondrial delivery. Liposomes, polymeric nanoparticles, polymeric micelles, solid lipid nanoparticles, nanoemulsions and cyclodextrins are some of the formulations that were developed for this purpose [22]. Among these formulations, the mitochondria-targeted micelles containing CoQ<sub>10</sub> was the only formulation in which CoQ<sub>10</sub> is directly targeted to the mitochondria. To evaluate the *in vitro* efficacy of this drug delivery system, the antioxidant effect of CoQ<sub>10</sub> was investigated in two stress models induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or paraquat in microglia cells. It was shown that CoQ<sub>10</sub> decreased reactive oxygen species (ROS) and superoxide anion levels, but no significant difference was found between free-CoQ<sub>10</sub> and mitochondria-targeted polymeric micelles. Microglia cells were treated with targeted CoQ<sub>10</sub> micelle or

free-CoQ<sub>10</sub> and mitochondrial membrane potential was measured by Tetramethylrhodamine Ethyl Ester (TMRE) following antimycin A exposure. Mitochondrial membrane potential was retained partially following treatment with CoQ<sub>10</sub> or targeted CoQ<sub>10</sub> micelle without any significant difference [23]. In this study, there was no any evaluation about the effects of CoQ<sub>10</sub> on the metabolomic profile in electron transport chain (ETC). In the present study, we developed CoQ<sub>10</sub> loaded PLGA-b-PEG-TPP NPs targeting mitochondria to have more effective therapeutic solutions that would be relevant in treatment of CoQ<sub>10</sub>-related nephropathies and their effects were investigated by means of metabolomics analyses for the first time.

Another difference of our study from the previous studies is to establish an *in vitro* disease model, in which *COQ8B* has been efficiently silenced by siRNA. In addition to studies conducted in patients with SRNS associated with *COQ8B* mutations [2–5], various *in vivo* and *in vitro* studies have been performed to establish the nephrotic syndrome disease model. Ashraf et al. performed knockdown of the *COQ8B* ortholog in zebrafish to confirm the role of *COQ8B* for the SRNS phenotype. They also performed siRNA-mediated gene silencing in podocytes [3]. In another study, to establish *COQ8B* knockout (KO) cells, lentiCRISPR v2, pMD2.G, and pSPAX2 were transfected into Lenti-X 298 T cells. Cultured podocytes and HK-2 cells were transfected with

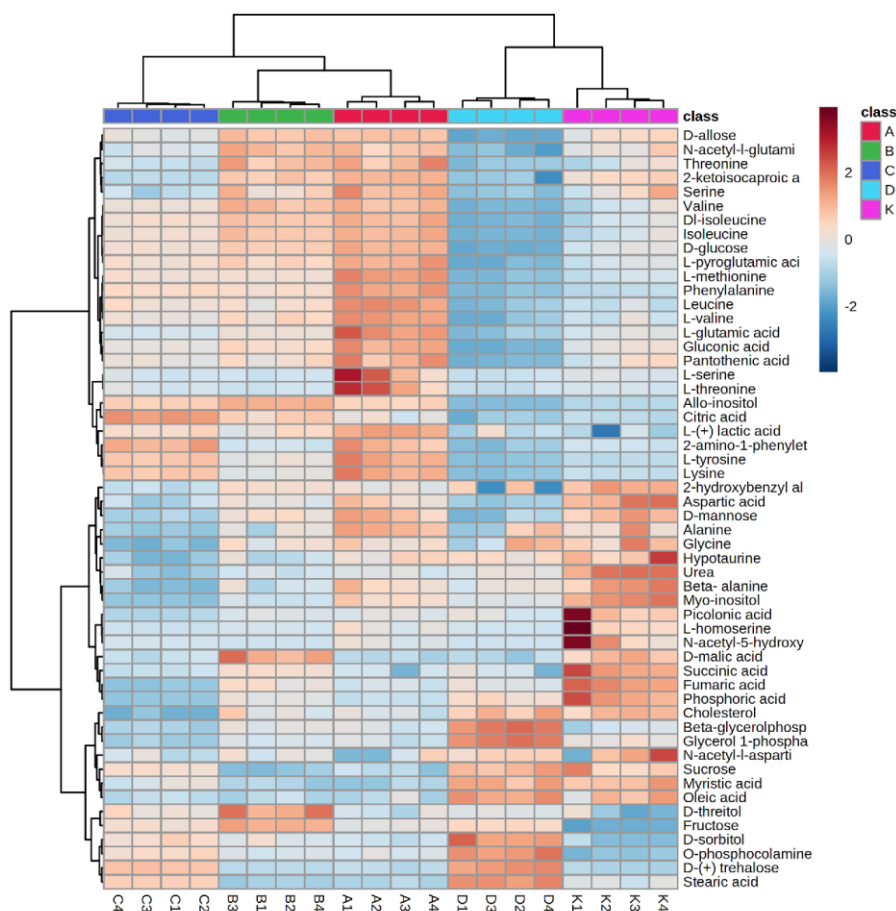


**Fig. 11.** Comparison of metabolomic profiles of control versus siRNA, free CoQ<sub>10</sub> and CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs groups (A,B,C); siRNA versus free CoQ<sub>10</sub> and CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs (D, E); free CoQ<sub>10</sub> versus CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs group (F). Left panels: PLS-DA score plots showing metabolomic profiles ( $R^2$ : 0.99 and  $Q^2$ : 0.99). Middle panels: Plots of variable importance in the projection (VIP) showing the most significant metabolites in discriminating between metabolomic profiles. Right panels: The regression coefficient plot of PLS-DA analysis indicating metabolite levels in groups.

lentivirus [24]. However, the silencing efficiency of the *COQ8B* was not demonstrated in these studies. We established a siRNA-based *in vitro* disease model that reproduced *COQ8B*-related disease and achieved approximately 80% gene silencing efficiency, which can be used in *COQ8B*-related studies.

The fact that NPs have a positive surface charge is an advantage for

them to cross the mitochondria membrane that has a negative membrane potential [16]. The zeta potential of CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs (NP3) was measured as +20 mV, which is suitable for targeting of mitochondria. The average size and PDI values of the synthesized NPs were evaluated. It was suggested that the NPs are in desired limits and compositions for mitochondrial targeting and could be efficiently used as a drug delivery



**Fig. 12.** Heatmap of HK-2 cell metabolites. Rows show metabolites, columns show experimental groups. (K: Control, A: siRNA, B: Free CoQ<sub>10</sub>, C: CoQ<sub>10</sub>-NPs, D: CoQ<sub>10</sub>-TPP-NPs).

system.

In recent years, surface modification of polymeric nanocarriers with lipophilic cations, peptides, or aptamers become an attractive approach to deliver several therapeutic agents to mitochondria [25]. Lipophilic cations are distinguished by their substantial hydrophobic surface area, which allows them to pass easily across the phospholipid bilayer and accumulate in the mitochondrial matrix in response to the membrane potential [26]. Several lipophilic cations, including triphenylphosphine (TPP), dequalinium (DQA), heptamethine dye, cyclometalated iridium (III) complexes, and rhodamine derivatives, have been used to polymeric nanocarriers for mitochondria-targeted delivery [25]. TPP cation has some advantages to generate mitochondria-targeted compounds [26]. TPP has good stability in biological systems, relatively simple synthesis and purification procedure. Its interactions with mitochondria are reasonably well understood, the TPP-conjugated molecules are

chemically tractable and most importantly MitoQ, a combination of TPP and CoQ<sub>10</sub> was shown to be relatively safe in humans, thereby enhancing the potential clinical and translational significance of TPP-based compounds [27,28]. TPP is frequently used in surface modifications of mitochondria-targeted polymeric nanoparticles, due to its direct binding with different types of polymers with minimal interference to the properties and functions of nanomaterials after binding to polymers [25]. Moreover, it is rapidly taken into the mitochondria within the organs following oral, intravenous or intraperitoneal administration and can be used safely in heart, liver and kidney, thanks to its relatively low toxicity [26].

Marrache et al. [16] formulated a variety of mitochondria-acting therapeutics with PLGA-b-PEG copolymer with a single terminal lipophilic TPP cation. The applicability of this drug delivery was demonstrated by studying various mitochondria-acting therapeutics used in

Alzheimer's disease, obesity and cancer. Curcumin, mitochondrial decoupler 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), lonidamine and  $\alpha$ -tocopheryl succinate ( $\alpha$ -TOS) were loaded into this drug delivery system. Considering the efficacy of these formulations, mitochondria-targeted NPs provide a significant therapeutic improvement for cancer, Alzheimer's disease and obesity compared to non-targeted NPs or therapeutics in their free form [16]. Therefore, it is anticipated that this would also be relevant in kidney diseases associated with CoQ10 deficiency.

In the present study, we synthesized CoQ10-loaded NPs by nanoprecipitation method using PLGA-*b*-PEG polymer conjugated with TPP cation due to its aforementioned advantages to provide active targeting to mitochondria. Our formulation has been well-characterized and has overcome the bioavailability problems observed due to lipophilic and high molecular weight structural characteristics of CoQ10, therefore offers a promising tool for more effective drug delivery to the mitochondria associated with a more effective therapeutic potential.

Although PLGA-*b*-PEG polymer is an FDA-approved polymer that can be used safely in many drug delivery studies, NPs could have a cytotoxic effect because of the TPP molecule [29]. We, therefore, performed XTT assay to determine the effect of NPs treated in cell culture on cell viability, however we did not observe any cytotoxic effect on cell viability.

CoQ10 is a molecule found in the mitochondrial membrane and is involved in ETC, and might be of benefit in the activity of TCA cycle [30]. We, therefore reasoned metabolomic analyzes in order to evaluate the effects of CoQ10 formulations on mitochondrial functions in *COQ8B*-silenced HK-2 cells. We mainly focused on TCA cycle metabolites that may be affected by CoQ10 deficiency and the metabolism of carbohydrates, which are the main energy source in the cell during evaluation of the metabolomics results.

Citric acid formation is one of the regulation step and also rate-limiting step of the TCA cycle. Accordingly, the increase in citric acid concentration in the *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells was compared to the control group, which indicated that the TCA cycle slowed down in *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells. We observed a decrease in citric acid concentration after the treatment of CoQ10-TPP-NPs, which indicated that this nanotherapeutic system contributes the acceleration in TCA cycle. Moreover, nanoparticles were found to be more effective in decreasing citric acid concentration when compared to free-CoQ10, suggesting that the increased efficiency is associated with the formulation itself rather than the CoQ10 molecule. It is well known that fructose and glucose are precursors of energy metabolism and serve as substrates during TCA cycle. Accordingly, another finding in our study regarding TCA cycle was the increased levels of fructose and glucose in *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells as compared to the control cells further supporting the fact of TCA cycle inhibition.

In *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells, a signal for energy deficit resulting from suppression of the TCA cycle may have triggered the breakdown of sucrose into its monomers glucose and fructose. The increase in glucose and fructose levels and the decrease in sucrose levels confirmed this assumption. We observed a decrease in glucose concentration after the treatment of HK-2 cells with CoQ10-TPP-NPs, which may be the consequence of increased ETC rate by the effect of CoQ10. We did not observe such a decrease with free-CoQ10. Notably, the CoQ10-NPs were more effective than free-CoQ10 in reducing glucose levels, but were not found to be as effective as CoQ10-TPP-NPs, an observation that further supports the positive effects of mitochondrial targeting.

The concentration of metabolites such as gluconic acid and lactic acid increased as a result of glucose shifting to alternative pathways due to the slowdown of the TCA cycle in siRNA-treated cells. After the treatment of *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells with CoQ10-TPP-NPs, gluconic acid and lactic acid levels were found to be decreased since glucose entered into the aerobic glycolysis that is the main degradation pathway. Free-CoQ10 was found to be less effective in reducing the amount of gluconic acid and lactic acid compared to CoQ10-TPP-NPs.

Intrinsic CoQ10 and cholesterol synthesis pathways are common up to farnesylpyrophosphate; the precursor of both pathways is acetyl-CoA.

Acetyl-CoA is a regulation factor for pyruvate dehydrogenase enzyme (PDH) complex, therefore increased acetyl-CoA levels inhibit PDH complex. Since the CoQ10 synthesis pathway was suppressed in *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells, the PDH enzyme complex might be inhibited due to the increased acetyl-CoA levels. As such, a decrease in the cholesterol level in the *COQ8B*<sup>-/-</sup> cells compared to the control group would be an expected result, and we observed accordingly. Both free-CoQ10 and CoQ10-TPP-NPs increased the cholesterol levels to control level, however the CoQ10-TPP-NPs were found to be more effective, suggesting the specific effect of the mitochondrial targeting.

The amino acid levels, except for aspartic acid, determined by metabolomic analyzes increased with siRNA treatment compared to the control group. It was concluded that this may be due to the slowing of the TCA cycle after siRNA administration, and the redirection of TCA cycle metabolites to the pathways of amino acid synthesis. We thought that CoQ10-TPP-NPs accelerated the TCA cycle in HK-2 cells, and that TCA cycle intermediates were directed to the TCA cycle rather than to the pathways of amino acid synthesis, which resulted in a decrease in the concentration of the corresponding amino acids.

Directing aspartate to alternative serine, threonine, lysine and panthothenic acid production in parallel with the inhibition of the ETC and TCA cycle may be the explanation for the observed decrease in aspartate level with siRNA treatment compared to the control group.

The amount of aspartate was found to be decreased in HK-2 cells treated either with CoQ10-TPP-NPs or free-CoQ10. We speculated that aspartate was directed to the TCA cycle via oxaloacetate due to the acceleration in ETC by the action of CoQ10. Therefore, the decrease in amino acid levels such as serine, threonine, lysine, leucine, and isoleucine with CoQ10 treatment can be attributed to the decrease in aspartate, which is the precursor of mentioned amino acids that are directed to TCA cycle.

## 5. Conclusion

This study is the first in the literature to evaluate effects of mitochondria-targeted CoQ10 NPs on the mitochondrial functions in an *in vitro* disease model induced by siRNA-mediated *COQ8B* gene silencing that leads interruption of endogenous CoQ10 biosynthesis. In the absence of this molecule in ETC, the levels of metabolites involved or indirectly related to this cycle have changed due to the slowing of the TCA cycle. The therapeutic effect of CoQ10-TPP-NPs applied to these cells is significant when compared to free-CoQ10. We overcame the disadvantages with low bioavailability and water solubility of free-CoQ10 with this formulation. The advantage of this delivery system is that it contains PLGA-*b*-PEG, a most widely used FDA-approved polymer in drug delivery. In conclusion, nanotherapeutic systems formulated with FDA approved, non-toxic polymers such as PLGA-*b*-PEG having lipophilic TPP cation on the surface to target mitochondria are currently attracting great interest for the treatment of mitochondrial dysfunction-based diseases. As proved with the results of this *in vitro* cell culture-based metabolomics study, this promising therapeutic system have the ability to deliver the active substance, CoQ10, to the mitochondria efficiently by increasing its local concentration, without losing its therapeutic action. Thus, this nanotherapeutic formulation would be a strong candidate for mitochondrial targeting and the treatment of CoQ10-related disorders including CoQ10 nephropathies. Nevertheless, to determine the potential use of the formulation in clinical settings, pre-clinical and clinical studies should be conducted.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This work was supported by the Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: TSA-2018-16993).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eipb.2022.02.018>.

## References

- [1] F. Ozatkin, Primary coenzyme Q10 (CoQ10) deficiencies and related neurophospholiposis, *Pediatr. Neurol.* 29 (6) (2014) 961–969.
- [2] L. Vazquez-Fonseca, M. Doimo, C. Calderan, M.A. Desbats, M.J. Acosta, C. Cerquina, M. Cassina, S. Ashraf, F. Hildebrandt, G. Sartori, P. Navas, E. Trevisson, L. Salvati, Mutations in COQ8B (ADCK4) found in patients with steroid-resistant nephrotic syndrome alter COQ8B function, *Hum. Mutat.* 39 (3) (2018) 406–414.
- [3] S. Ashraf, H.Y. Gee, S. Woerner, L.X. Xie, V. Vega-Warner, S. Lovric, H. Feng, S. Xiong, D.C. Gattner, C. Avila-Casado, A.D. Paterson, P. Nitschke, G. Bole-Peygout, P. Cochot, J. Esteve-Rudd, R. Haberberger, S.J. Allen, W. Zhou, R. Aitik, E.A. Otto, M. Barua, M.H. Al-Hamed, J.A. Kari, J. Evans, A. Bierzynska, M.A. Saleem, D. Böckenbauer, R. Rieta, S. B. Desoky, D.O. Hachimioglu, F. Gök, J. Washburn, R.C. Wiggins, M. Choi, R.P. Lifton, S. Levy, Z. Han, L. Salvati, H. Prokisch, D. S. Williams, M. Pollak, C.F. Garke, Y. Pei, C. Antignac, F. Hildebrandt, ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndromes through CoQ10 biosynthesis disruption, *J. Clin. Invest.* 127 (12) (2017) 5179–5189.
- [4] E. Korkmaz, B.S. Lipka-Zelkiewicz, O. Koyner, O. Gribouval, C. Fontaine, M. Tabatabaei, S. Schmidt, S. Gücer, F. Bayraktar, M. Aitici, A. Dinckan, S. Mir, A. K. Bayazit, S. Emre, A. Balat, I. Rees, R. Shroff, C. Bergmann, C. Mourani, C. Antignac, F. Ozatkin, F. Schaefer, ADCK4-Associated Glomerulopathy Causes Adolescence-Onset FSGS, *J. Am. Soc. Nephrol.* 27 (1) (2016) 63–68.
- [5] M. Atmaca, B. Gulhan, E. Korkmaz, M. Inozu, O. Soyfemenoglu, C. Candan, A. K. Bayazit, A.M. Elmaci, G. Parmaksiz, A. Duzova, N. Besbas, R. Topaloglu, F. Ozatkin, Follow-up results of patients with ADCK4 mutations and the efficacy of CoQ10 treatment, *Pediatr. Neurol.* 32 (8) (2017) 1369–1375.
- [6] M.A. Desbats, G. Lunardi, M. Doimo, E. Trevisson, L. Salvati, Genetic bases and clinical manifestations of coenzyme Q10 (CoQ10) deficiency, *J. Inher. Metab. Dis.* 38 (1) (2015) 145–156.
- [7] K.E. Duberley, S.J. Heal, A.Y. Abramov, A. Chausani, J.M. Land, S. Rahman, I. P. Hargreaves, Effect of Coenzyme Q10 supplementation on mitochondrial electron transport chain activity and mitochondrial oxidative stress in Coenzyme Q10 deficient human neuronal cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 50 (2014) 60–63.
- [8] R.K. Pathak, H. Kishikoshi, S. Dhar, Targeted nanoparticles in mitochondrial medicine, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 7 (3) (2015) 315–329.
- [9] Z. Wang, W. Guo, X. Kuang, S. Hou, H. Liu, Nanopreparations for mitochondria targeting drug delivery system: Current strategies and future prospective, *Asian J. Pharm. Sci.* 12 (6) (2017) 498–508.
- [10] J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, M. Hardy, O. Ouari, J. Vasquez-Vivar, G. Cheng, M. Lopez, B. Kalyanaram, Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications, *Chem. Rev.* 117 (15) (2017) 10043–10120.
- [11] K.M. Huh, Y.W. Cho, K. Park, PLGA-PEG block copolymers for drug formulations, *Drug Deliv. Technol.* 3 (5) (2003) 42–44.
- [12] D. Oupický, M. Ogris, K.A. Howard, P.R. Smith, K. Ubrich, I.W. Seymour, Implications of lipid and surface properties of polymeric drug delivery vectors for extended systemic circulation, *Mol. Ther.* 5 (4) (2002) 643–672.
- [13] E. Locatelli, F.M. Comes, Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system, *J. Nanopart. Res.* 14 (12) (2012) 11–17.

- [14] Y. Chen, S. Jiang, J. Zou, Y. Zhong, X. Ding, Silencing HIF-1 $\alpha$  aggravates growth inhibition and necrosis of proximal renal tubular epithelial cell under hypoxia, *Ren. Fail.* 38 (10) (2016) 1726–1734.
- [15] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$  method, *Methods* 25 (4) (2001) 402–408.
- [16] S. Marrache, S. Bhar, Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondrial-acting therapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109 (40) (2012) 16288–16293.
- [17] D. Orozco, J. Skamarcak, K. Reins, B. Tidow, S. Lunetta, F. Li, et al., Determination of ubiquinone (coenzyme Q10, ubiquinol-10) in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: single-laboratory validation, *J. AOAC Int.* 90 (5) (2007) 1227–1236.
- [18] C. Bergamini, N. Morizzi, A. Smeraldi, G. Lenaz, R. Fato, S. Pandey, A water-soluble Q10 formulation improves mitochondrial distribution and promotes mitochondrial respiration in cultured cells, *PLoS ONE* 7 (3) (2012) e33712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g001>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0010>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0011>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0012>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0013>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0014>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0015>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0016>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0017>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0018>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0019>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0020>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0021>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033712.g0022>.
- [19] M. Velichkovska, B. Surnar, M. Nair, S. Dhar, M. Toborek, Targeted Mitochondrial CoQ10 Delivery Attenuates Antifretroviral-Drug-Induced Senescence of Neural Progenitor Cells, *Mol. Pharm.* 16 (2) (2019) 724–736.
- [20] C.C. Bylén, M. Vilmar, B. Jerkås, E. Hernim, M. B. Gamel, E. Yilmaz, M. A. Carlén, B. Ayturk, N. Ozkan, E. Bregstad, Untargeted multi-mole analysis of colorectal cancer specific exosomes reveals joint pathways of colorectal cancer in both clinical samples and cell culture, *Cancer Lett.* 469 (2020) 186–194.
- [21] S. Marrache, R.K. Pathak, S. Bhar, Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (29) (2014) 10444–10449.
- [22] S. Karnar, R. Rao, A. Kumar, S. Mahant, S. Nanda, Novel Carriers for Coenzyme Q10 Delivery, *Curr. Drug Deliv.* 13 (8) (2016) 1184–1204.
- [23] A. Sharma, G.M. Soliman, N. Al-Hajaj, R. Sharma, D. Maysinger, A. Kulkar, Design and evaluation of multifunctional nanocarriers for selective delivery of coenzyme Q10 to mitochondria, *Biomacromolecules* 13 (1) (2012) 239–252.
- [24] E. Widmeier, S. Yu, A. Biag, Y.W. Cheng, M. Hakayama, L. Fernández-de-Río, H. Pöhlmann, D. S. El-Sayed, M. G. Le, M. B. Gamel, E. Yilmaz, J. H. Ryu, M.G. Lee, C.F. Clarke, F. Hildebrandt, H.Y. Gee, ADCK4 Hydrolyzes Destabilizes the Coenzyme Q Complex, Which Is Rescued by a 2,4-Dihydroxybenzoic Acid Treatment, *J. Am. Soc. Nephrol.* 31 (6) (2020) 1191–1211.
- [25] Y. San, Q. Yang, X. Xia, X. Li, W. Ruan, M. Zheng, Y. Zou, B. Shi, Polymeric Nanoparticles for Mitochondria Targeting Mediated Robust Cancer Therapy, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9 (2021), <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.755727>.
- [26] R.A.J. Smith, R.C. Hartley, M.P. Murphy, Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (12) (2011) 3021–3038.
- [27] M.P. Murphy, R.A.J. Smith, Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47 (1) (2007) 629–656.
- [28] B. Kalyanaram, G. Cheng, M. Hardy, O. Ouati, M. Lopez, J. Joseph, J. Zelenka, M. DeWitt, A review of the roles of mitochondrial biogenesis, metabolism, and related signaling pathways in cancer cell Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds, *Redox Biol.* 14 (2018) 316–327.
- [29] K.C. Kloeppel, A.S. Kraus, D.R. Hedlund, C.M. Guade, B.A. Wagner, M. L. McCormick, M.A. Fath, D. Seed, T. H. Lim, G. R. Buettner, P. C. Goswami, F. C. Pigge, D.R. Spitz, M.K. Schultz, S.V. Pizzo, Triphenylphosphonium derivatives disrupt metabolism and inhibit melanoma growth in vivo when delivered via a thermosensitive hydrogel, *PLoS ONE* 15 (12) (2020) e0244540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g001>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0010>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0011>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0012>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0013>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0014>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0015>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0016>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0017>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0018>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0019>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0020>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0021>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0022>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0023>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0024>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0025>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0026>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0027>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0028>, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244540.g0029>,

## 9. ÖZGEÇMİŞ

