



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



YENİ KATYONİK LİPO-OLİGOMER İLE DNA TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Ayşenur KAYMAZ

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**YENİ KATYONİK LİPO-OLİGOMER İLE DNA
TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE
TRANSFEKSİYON ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

Ayşenur KAYMAZ

Danışman(lar)
DR. ÖGR. ÜYESİ MUSTAFA KOTMAKÇI

Ortak Danışman
PROF.DR. AYŞE GÜLTEN KANTARCI

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans

İzmir
2022

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: **24.08.2022**

Önsöz

Hayatta bazı anlar vardır. Ne zaman ve ne şekilde yaşayacağınızı asla bilmediğiniz ancak karşılaştığınızda neyi ve ne şekilde yaşamak istediğinizi en iyi bildiğiniz andır. Dokuz yıl önce ilk Farmasötik Biyoteknoloji dersi benim için bu ‘an’ dı.

Hayatta bazı anlar vardır. Seçim yapmak zorunda kaldığınız, istemeyerek de olsa yol ayrımına girdiğiniz kararlar. Mezuniyet sonrası çok sevdiğim akademiye bırakıp kariyerime farklı bir şekilde devam etmek bu zor kararlardandı.

Geçen 4 yıl, farklı ilçeler ve 2 farklı hastanenin ardından Ege F. Biyoteknoloji bilim dalı yüksek lisans ilanını gördüğümde, tekrar o ilk biyoteknoloji dersinde duyduğum heyecanı yaşamıştım. Saygıdeğer Hocalarım Prof. Dr. Gülten Kantarcı ve Prof. Dr. Zeki Topçu, beni öğrencileri olarak kabul ederek, çok üzülerek bıraktığım akademiye geri dönme imkanı sundular.

Yıllar sonra akademiye geri dönmenin heyecanıyla geçen ders döneminin ardından, tez sürecine geçtiğim sırada pandemi krizi başladı. Sağlık bakanlığında çalışıyor olmam nedeniyle iptal olan izinlerim, laboratuvara giremediğim uzun bir süre, eğitimime devam edebilmek için tuttuğum fazla sayıda nöbetler ile imkansızlıklarla ve hastalıklarla geçen yorucu zamanlardı.

Bu zor süreçte her daim sonsuz yardımını ve desteğini gördüğüm danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi. Mustafa Kotmakçı, her durumda pandemi şartlarında kısıtlı imkanları zorlayarak bana destek olan çok değerli hocam Prof. Dr. Gülten Kantarcı ve ne zaman umutsuzluğa düşsem ve yorulsam, motivasyon konuşmalarıyla ve sonsuz desteğiyle bana devam etme gücü veren çok değerli hocam Prof. Dr. Zeki Topçu sayesinde bu zorlu şartlara rağmen tezimi tamamlama imkanı buldum.

Bu tez akademik bir çalışma olmanın yanı sıra benim için yarım kalmış bir hayali tamamlamanın vermiş olduğu mutluluktur.

İzmir, 14.09.2022

Ayşenur KAYMAZ

Özet

Yeni Katyonik Lipo-Oligomer İle DNA Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve Transfeksiyon Etkinliğinin İncelenmesi

Genetik hastalıklar ve özellikle kanser gibi, insan hayatını önemli derecede etkileyen hastalıklara genomik düzeyde müdahale ile tedavi, son dönemlerde oldukça önem kazanmıştır. Terapötik nükleik asitler, organizmaya verildiğinde hızlı bir şekilde enzimatik yıkıma uğrar, hidrofilik yapıları ve negatif yüklü kimyasal özellikleri, hücre membranlarından geçişlerini kısıtlar. Bu faktörler nükleik asitlerin klinik olarak başarılı bir şekilde uygulanmasının önünde büyük bir engel oluşturmaktadır. Bu nedenle, nükleik asitlerin (NA) vücutta stabilitesinin sağlanması ve etkin bir şekilde hedef hücrelere ulaştırılması için, uygun ve etkili taşıyıcı sistemlerin tasarlanması önem arz etmektedir.

NA taşıyıcı sistemlere örnek olarak, katyonik polimerler veya katyonik lipidler gösterilebilir. Ancak, bunların temel sorunu toksisitelerinin yüksek olması ve buna bağlı olarak da etkinliklerinin zayıf olmasıdır. Katı faz destekli sentez sayesinde son zamanlarda lipo-oligomerden, sekansı tanımlanmış bileşikler sentezlenmekte ve nükleik asitlerin, proteinlerin ve ilaçların etkili bir şekilde taşınması için geliştirilmektedir. Sekans tanımlı katyonik lipo-oligomerler güçlü nükleik asit taşıyıcılarıdır. Bunlar NA'lerle elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlere dayanan stabil lipopleksler oluşturur. Tanımlı sekansları sayesinde yapılarında değişiklik yapılarak endositoz sonrasında endozomal protonasyonla nükleik asitin sitozole salınmasını sağlarlar.

Bu tezde kullanılacak yeni lipo-oligomerlerin kimyasal sentezi katı faz destekli sentez yöntemiyle (SPS) Almanya'da Ludwig-Maximilians University-Munich, Farmasötik Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. (Lipo-oligomer kütüphanesi sıra numarası:1451).

Tanımlanması MALDI-TOF kütle spektroskopisi ile yapılmış ve deneme çalışmaları gerçekleştirildikten sonra, kullanıma hazır olarak temin edilmiştir.

Deneyler kapsamında; öncelikle geliştirilen pDNA/lipooligomer lipopleks formülasyonlarının karakterizasyonu yapılarak optimal formülasyon belirlenmiştir. Optimal formülasyonda kompleks dayanıklılığı, stabilitesi, komplekslerin toksisitesi (H1299 hücrelerinde) ve transfeksiyon etkinliği incelenmiştir. Geliştirilen yeni katyonik DNA taşıyan lipo-oligomer formülasyonunun transfeksiyon etkinliği *in vitro* olarak model kanser hücre hattında değerlendirilmiştir. Böylece, söz konusu 1451 numaralı lipo-oligomerin gen taşıyıcı sistem olarak kullanılma potansiyeli ilk kez incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler; Lipopleks; Polipleks; Lipozom; Oligomer; pDNA

Abstract

Preparation Of DNA Carrier Systems With New Cationic Lipo-Oligomers And Investigation Of Their Transfection Efficiency

Treatment of genetic diseases and especially cancer, which have a significant impact on human life, by intervening at the genomic level has gained a lot of importance in recent years. Therapeutic nucleic acids undergo rapid enzymatic destruction when given to the organism, chemical properties hydrophilicity and negative surface-charge restrict their diffusion across the cell membranes. These factors represent a major obstacle to the successful clinical application of nucleic acids. Therefore, it is important to design suitable and effective delivery systems to ensure the stability of nucleic acids (NAs) in the body and to effectively deliver them to target cells.

Examples of NA carrier systems are cationic polymers or cationic lipids. However, their main problem is their high toxicity and, consequently their poor effectiveness. Thanks to solid phase-supported synthesis, compounds with a defined sequence have been synthesized from lipo-oligomer recently and nucleic acids, proteins and the drugs are being developed for efficient delivery. Sequence-defined cationic lipo-oligomers are potent nucleic acid carries. These form stable lipoplexes based on electrostatic and hydrophobic interactions with NAs. Their defined sequences allow their structure to be modified, allowing the nucleic acid to be released to cytosole with an endosomal protonation after endocytosis.

The chemical synthesis of new lipo-oligomers to be used in this thesis was carried out in the Pharmaceutical Biotechnology Laboratory of Ludwig-Maximilians University-Munich, Germany, using the solid phase-supported synthesis method (SPS). (Lipo-oligomer library sequence number:1451).

In this study; firstly, the optimal formulation was determined by characterizing the pDNA/lipooligomer lipoplex formulations. Complex strength, stability, toxicity of the complexes (in H1299 cells) and transfection efficiency were investigated in the optimal formulation. The transfection activity of the lipo-oligomer formulation with the new cationic DNA developed was evaluated in vitro in the model cancer cell line. Thus, the potential for use of lipo-oligomer number 1451 as a gene-delivery system has been examined for the first time.

Keywords; Lipoplex; Polyplex; Liposom; Oligomer; pDNA



İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	X
Şekiller Dizini	XI
Kısaltma Listesi	XIII
1. Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4. Araştırmanın Amacı	2
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Gen Terapisinde Taşıyıcı Sistemler	3
2.1.1. Viral Taşıyıcı Sistemler.....	4
2.1.2. Viral Olmayan Gen Aktarım Yöntemleri	5
2.1.2.1. Lipid Tabanlı Gen Taşıyıcı Sistemler.....	6
2.1.2.2. Polimer Tabanlı Gen Taşıyıcı Sistemler	8
2.1.2.3. Sekans Tanımlı Makromoleküler Taşıyıcı Sistemler	9
2.1.2.3.1. Oligomerlerin Moleküler Yapısı.....	10
2.1.2.3.2. Oligomerlerin Topolojik Yapısı	11
2.1.2.3.3. Oligomerlerin Fonksiyonelleştirici Yapıları.....	12
2.1.2.3.4. Lipo-oligomer 1451	14
3. Gereç ve Yöntem	16
3.1. Gereç.....	16
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	16
3.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Materyaller	18
3.1.3. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Nükleik Asitler	20
3.2.1.1. Plazmit DNA Karakterizasyonu	20

3.2.1.2. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Analiz	21
3.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi	23
3.2.2. Formülasyon Çalışmaları	24
3.2.2.1. Lipopleks Formülasyonlarının Hazırlanması	24
3.2.3. Karakterizasyon Çalışmaları	30
3.2.3.1. Partikül boyutu, Polidispersite indeksi (PDI), Zeta Potansiyel (ZP) Değerlerinin Ölçülmesi	30
3.2.3.2. Kompleks Stabilitesi Çalışmaları	31
3.2.3.2.1. Lipoplekslerin Anyonik Strese Karşı Dayanıklılığının İncelenmesi	31
3.2.3.2.2. Serum Stabilite Analizleri	32
3.2.3.2.3. DNaz-I Nukleaz Stabilite Analizi.....	33
3.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	34
3.2.4.1. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları	34
3.2.4.2. Floresan Mikroskop ile GFP Transfeksiyonunun Değerlendirilmesi	36
3.2.4.3. Lipoplekslerin Sitotoksosite Analizi	36
3.2.4.4. Akış Sitometri ile GFP Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Ölçülmesi	38
3.2.4.5. Migrasyon Testi.....	39
3.2.4.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	39
4. Bulgular.....	40
4.1. Genetik Materyalin Karakterizasyonu	40
4.1.1. pDNA'nın Restriksiyon Enzim Kesimi ile Analizine Yönelik Bulgular.....	40
4.2. Lipopleks Formülasyonlarının Geliştirilmesine İlişkin Bulgular.....	41
4.2.1. Yardımcı Bileşenler Eklenecek Oluşturulan Lipopleks Formülasyonlarının Geliştirilmesine İlişkin Bulgular	42
4.3. Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular	44
4.3.1. Lipo-oligomer Komplekslerin Partikül Boyutu, Polidispersite İndeks ve Zeta Potansiyel Analizlerine İlişkin Bulgular	44
4.3.2. Lipoplekslerin Stabilite Çalışmalarına ait Bulgular	47
4.3.2.1. Komplekslerin Anyonik Strese Karşı Dayanıklılığının İncelenmesine Ait Bulgular.....	47
4.3.2.2. Serum Stabilite Analizine İlişkin Bulgular	49
4.3.2.3. DNaz-I Nukleaz Stabilite Analizine İlişkin Bulgular	52

4.4. Lipoplekslerin <i>in vitro</i> Biyolojik Değerlendirmesine İlişkin Bulgular	54
4.4.1.Floresan Mikroskop Yöntemi ile GFP Transfeksiyonun	
Değerlendirilmesine Yönelik Bulgular	54
4.4.2. Hücre Canlılığı Çalışmalarına İlişkin Bulgular	55
4.4.3.Akış Sitometrisi ile <i>in vitro</i> GFP Ekspresyonunun Kantitatif Olarak	
İncelenmesine İlişkin Bulgular	57
4.4.4. Çizik Testi ile Migrasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	59
5. Tartışma	61
6. Sonuç ve Öneriler.....	71
Kaynaklar	74
Teşekkür	86
Özgeçmiş	88

Tablolar Dizini

Tablo 1. Restriksiyon enzimleri ve kesim miktarları	22
Tablo 2. Restriksiyon enzimleri ve kesim sonucunda oluşacak DNA fragmanları...	22
Tablo 3. Farklı N/P oranları için hesaplamalar	25
Tablo 4. Farklı N/P oranlarında hazırlanan Lipopleks formülasyonlarının içerikleri	25
Tablo 5. Lipopleks formülasyonlarına Kol, T80 ve TPGS ilavesi	29
Tablo 6. Serum stabilite için kullanılan çözelti bileşenleri ve miktarları.....	33
Tablo 7. DNaz-I nukleaz stabilite için kullanılan çözeltiler ve miktarları	34
Tablo 8. Hücre canlılığı analizi için hazırlanan formülasyon içerikleri.....	37
Tablo 9. Lipopleks formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçüm değerleri	45
Tablo 10. H1299 hücrelerinde GFP ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları ..	58

Şekiller Dizini

Şekil 1. Onaylanan gen terapi ilaçları ve onay tarihleri.....	3
Şekil 2. Gen transfer vektörlerinin 2020'de kullanım dağılımı.....	4
Şekil 3. Katyonik bir lipidin üç temel kısmının gösterimi.....	7
Şekil 4. Katyonik lipidler ve yardımcı lipidlerin kimyasal yapısı	7
Şekil 5. Katyonik polimerler ve kimyasal yapıları	9
Şekil 6. Sentetik oligo-amino asitler ve moleküler yapıları.....	11
Şekil 7. Farklı topolojilere sahip Stp tabanlı oligomerlerin moleküler yapısı	12
Şekil 8. Oligomerlerin fonksiyonelleştirici yapıları.....	13
Şekil 9. Sentezlenmiş bazı oligomerlerin dizileri, topolojileri ve kısaltmaları.....	14
Şekil 10. Lipo-oligomer 1451 kimyasal yapısı	15
Şekil 12. pEZX-MR04-GFP'in plazmit haritası	20
Şekil 13. pEZX-MR04 -EGFP'in restriksiyon enzim kesim haritası	21
Şekil 14. Restriksiyon enzim kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü.....	40
Şekil 15. Farklı N/P oranlarında hazırlanmış lipoplekslerin agaroz jel görüntüsü	41
Şekil 16. Kolesterol ile farklı mol oranlarında hazırlanan lipooligomer taşıyıcı.....	42
Şekil 17. Tween80 ile farklı mol oranlarında hazırlanan lipooligomer taşıyıcı sistemlerin pDNA ile kompleksleşme agaroz jel görüntüsü	43
Şekil 18. TPGS ile farklı mol oranlarında hazırlanan lipooligomer taşıyıcı sistemlerin pDNA ile kompleksleşme agaroz jel görüntüsü.....	44
Şekil 19. Kolesterol (a), Tween 80 (b), TPGS (c) ilave edilen kompleks formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyel (mV) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi	46
Şekil 20. Lipoplekslerin heparin testine ilişkin agaroz jel görüntüsü.....	47
Şekil 21. T80 ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının 0, 5, 10, 15 IU/mL heparin varlığında normalize edilmiş spektrofotometrik ölçüm sonuçları	48
Şekil 22. TPGS ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının 0, 5, 10, 15 IU/mL heparin varlığında normalize edilmiş spektrofotometrik ölçüm sonuçları	48
Şekil 23. Kolesterol içeren lipoplekslerin %10 serum içerisinde 2 .ve 24.saat inkübe edilmesinden sonra elde edilen agaroz jel görüntüleri.....	50
Şekil 24. T80 içeren lipoplekslerin %10 serum içerisinde 2 .ve 24.saat inkübe edilmesinden sonra elde edilen agaroz jel görüntüleri.....	51

Şekil 25. TPGS içeren lipoplekslerin %10 serum içerisinde 2 .ve 24. saat inkübe edilmesinden sonra elde edilen agaroz jel görüntüleri	52
Şekil 26. T80 içeren lipoplekslerin DNaz-I stabilitesine ait agaroz jel görüntüsü ..	53
Şekil 27. TPGS içeren lipoplekslerin DNaz-I stabilitesine ait agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 28. Lipopleks formülasyonlarının H1299 hücrelerini transfekte etme kabiliyetinin 48. saat floresans mikroskop ile incelenmesi (x10 büyütme)	55
Şekil 29. H1299 hücre hattında 48. saat formülasyonların uygulamalarına ait hücre canlılığı bulguları	56
Şekil 30. H1299 hücre hattında 72. saat formülasyonların uygulamalarına ait hücre canlılığı bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$)	56
Şekil 31. Lipopleks formülasyonlarının H1299 hücrelerinde GFP ekspresyonunun kantitatif bulguları	58
Şekil 32. Kontrol pDNA ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının H1299 hücrelerinin migrasyonun görüntüleri (x10)	59
Şekil 33. pDNA-miR34a ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının H1299 hücrelerinin migrasyonuna etkisi (x10)	60

Kısaltma Listesi

AAV	: Adeno–ilişkili virus
a/a	: Ağırlık/ağırlık
a/h	: Ağırlık/hacim
ASO	: Antisens oligonükleotit
bp	: Baz çifti
Chol.	: Kolesterol
CRISPR-Cas9	: Kümelenmiş düzenli aralıklarla kısa palindromik tekrar ile ilişkili nükleaz 9
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNAase I	: Deoksiribonükleaz I enzimi
DOPE	: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DOTMA	: N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
DOTAP	: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride
EDTA	: Etilenediamintetraasetik asit
FBS	: Fetal sığır serumu
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GFP	: Yeşil floresans protein
Gtt	: Glutary-triethylenetetramine

HBG	: Hepes glukoz tamponu
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetanesulfonik asit
h/h	: Hacim/hacim
HSV	: Herpes simpleks virüsü
Kolesterol	: 10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-2-yl)- 2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H- cyclopenta[a]phenanthren-3-ol
mRNA	: Haberci RNA
miRNA	: mikro RNA
NA	: Nükleik asit
N/P	: Katyonik amin/anyonik fosfat oranı
P/S	: Penisilin/streptomisin çözeltisi
PBS	: Fosfat tamponu
PDI	: Polidispersite indeksi
pDNA	: Plazmid DNA
PEI	: Polietilenimin
PK	: Proteinaz K
PMO	: Phosphorodiamidate morpholino oligomer
Ptp	: Ftalyl-tetraethylenepentamine
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans

siRNA	: Küçük interferans yapan RNA
Sph	: Suksinoil pentaethylene hexamine
Stp	: Suksinoil-tetraetilen-pentamin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
T80	: Tween 80
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA tamponu
TRIS	: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol
TPGS 1000	: D- α -Tocoferol polietilen glikol 1000 succinate
ZP	: Zeta potansiyel

1. Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Genetik hastalıklar ve özellikle kanser gibi, insan hayatını önemli derecede etkileyen hastalıklara genomik düzeyde müdahale ile tedavi, son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Plazmid DNA (pDNA), küçük interferans yapan RNA (siRNA: small interfering RNA), mikro RNA (miRNA: micro RNA), haberci RNA (mRNA: messenger RNA), antisens oligonükleotitler (ASO'lar) ve kümelenmiş düzenli aralıklarla kısa palindromik tekrar ile ilişkili nükleaz 9 (CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9) gen tedavisinde kullanılan önemli terapötik makromoleküllerdir (Y. Wang & Wagner, 2020). Bunlar organizmaya verildiğinde hızlı bir şekilde enzimatik degradasyona uğrarlar. Diğer yandan hidrofilik yapıları ve negatif yüklü kimyasal özellikleri, hücre membranlarından geçişlerini kısıtlar. Bu faktörler nükleik asitlerin klinik olarak başarılı bir şekilde uygulanmasının önünde büyük bir engel oluşturmaktadır.

Başarılı bir taşıyıcı sistem stratejisi, terapötik molekülü serum degradasyonundan ve makrofaj fagositozundan koruyabilen, dolaşımında uzun süre kalmasını sağlayabilen, minimum toksisite ile hedef hücrelere aktarabilen ve hücre içine endositoz ile alındıktan sonra endozomal kaçışlarını sağlayan, güvenli ve etkin taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine bağlıdır.

Başlangıçta, gen tedavisinde nükleik asitleri hedef hücrelere aktarmak için viral vektörlerin kullanılmasına yönelik çalışmalar yaygın olsa da klinik denemeler sırasında şiddetli immünojenite ve güvenlik problemleri nedeniyle gen tedavisinde viral vektörlere alternatifler (non-viral gen taşıyıcı sistemler) aranmaya başlanmıştır.

Katyonik lipid aracılı gen taşıyıcı sistemler, viral gen transferine kıyasla; düşük immünojenite, kolay üretim ve onkogenik özellik göstermemeleri gibi avantajları nedeniyle yaygın olarak çalışmalarda kullanımı araştırılmaktadır. Katyonik lipidlerin uygulanmasının ana dezavantajı, düşük transfeksiyon verimliliğidir (Ma, Zhang, Jiang, Zhao, & Lv, 2007).

Katyonik lipidlerin ve formülasyonlarının yüksek transfeksiyon verimliliği ile tasarlanması böylece *in vivo* uygulamalarda yeni ve etkili taşıyıcı sistem olarak geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir (Hall et al., 2017b).

1.2. Araştırmanın Sorusu

Yeni sentezlenen tokoferil Oligomer 1451 ile pDNA taşıyıcı lipopleksler *in vitro* olarak hücre transfeksiyonu sağlar mı ?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Oligomer 1451 temelli lipopleks formülasyonun geliştirilmesi ve optimal formülasyonun belirlenmesi:

- ✓ DNA'yı kompleksleştirebilme yeteneği en uygun formülasyonun seçimi ve stabil bir lipopleks formülasyonu elde etmek
- ✓ Lipoplekslerin partikül boyutunun, zeta potansiyelinin ve polidispersite indeksinin uygun aralıkta olması
- ✓ H1299 hücrelerinde Rezasurin ile yapılacak olan sitotoksosite çalışmalarında hücre canlılığının devamı
- ✓ *In vitro* biyolojik aktivite çalışmalarında H1299 hücrelerinde etkili transfeksiyonun gözlemlenmesi

1.4. Araştırmanın Amacı

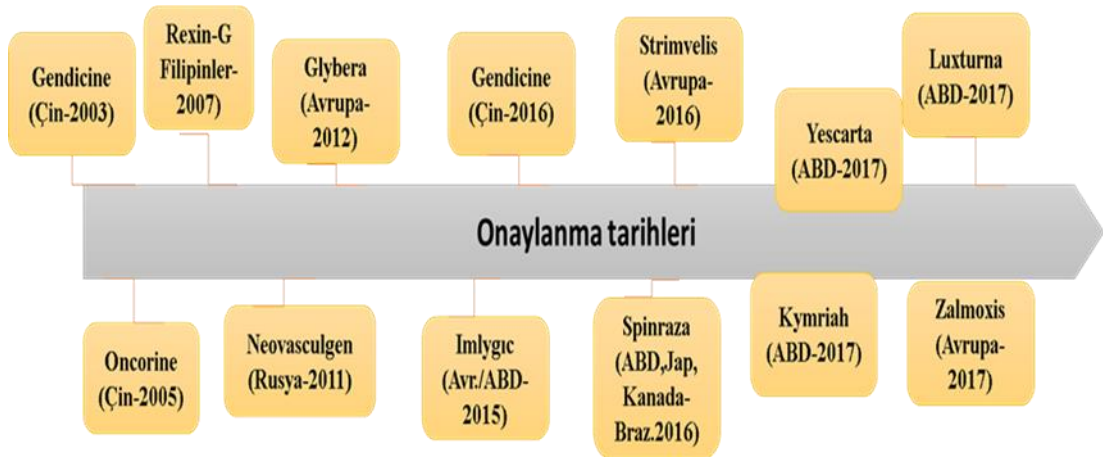
Bu çalışmanın amacı yeni katyonik lipo-oligomer 1451 ile geliştirilen lipooligomer:pDNA lipoplekslerin *in vitro* transfeksiyon etkinliğinin incelenmesi ve formülasyonlara eklenen yardımcı bileşenlerin (kolesterol, T80, TPGS) bu lipoplekslerin transfeksiyon etkinliğine katkısını incelemektir.

2. Genel Bilgiler

2.1. Gen Terapisinde Taşıyıcı Sistemler

Gen terapisi, monogenik bozukluklar veya spesifik olarak bir proteinin ekspresyonunu indüklemek için eksojen genetik materyalin (DNA/RNA) hücreye aktarılmasını amaçlayan terapötik bir yaklaşımdır. Son yıllarda gen terapisine yönelik klinik çalışmalar gittikçe artmaktadır (Jin, Zeng, Liu, Deng, & He, 2014). Şekil 1’de onaylanan gen terapisi ilaçları ve onay tarihleri kronolojik olarak verilmiştir.

Çıplak nükleik asitler, hücreleri transfekte etmenin en güvenli yolunu olmuşturmasına rağmen, nükleazlar tarafından degradasyona uğramaları nedeniyle etkinlikleri oldukça düşüktür (Niidome & Huang, 2002). Gen tedavisinin etkinliği, DNA’nın hedef hücrelere verilmesine ve genin uzun süreli ekspresyonuna bağlıdır. Bu nedenle DNA’nın hedef hücrelere ulaştırılmasını ve bu hücrelerde anlatım yapabilmesini sağlayacak uygun gen taşıyıcı sistemler (vektörler) gerekmektedir. Gen taşıyıcı sistemler viral vektörler ve viral olmayan vektörler olarak sınıflandırılmaktadır.

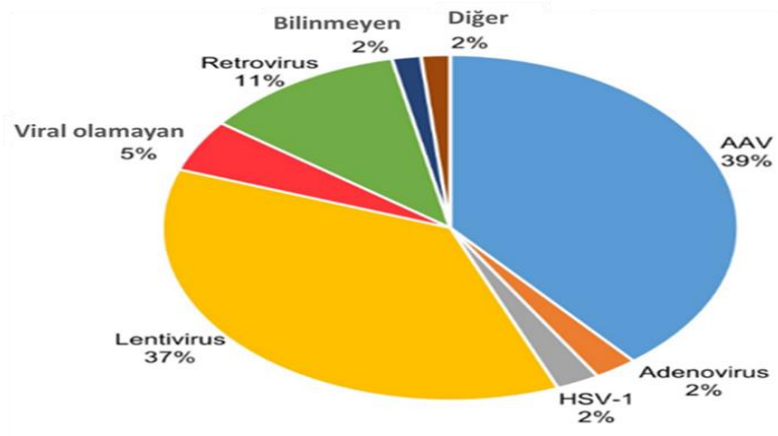


Şekil 1. Onaylanan gen terapisi ilaçları ve onay tarihleri

2.1.1. Viral Taşıyıcı Sistemler

Viral vektörler yüksek düzeyde ekspresyona imkan sağlamaları nedeniyle etkili taşıyıcı sistemlerdir ancak immünojenik olması, viral toksisitesi, onkojeniklik, üretiminin zor ve maliyetli olması ve taşınabilecek DNA boyutunun sınırlı olması kullanımlarını kısıtlamaktadır (Jin et al., 2014).

Klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılan vektörler; retroviral vektörler, adenoviral vektörler, lentiviral vektörler (LV), adeno-ilişkili virüsler (AAV), poxvirüs ve herpes simpleks virüsleri (HSV)'dir. Taşıyıcı sistem olarak viral taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı onaylanmış ilaçlar mevcuttur. AAV'nin kullanıldığı, konjenital körlük tedavisinde Luxturna ve spinal müsküler atrofi tedavisinde Zolgensma (Rghei et al., 2021); retrovirallerin kullanıldığı, ciddi kombine immün yetmezlik tedavisinde Strimvelis (O'Loinsigh & Bose, 2019); LV'nin kullanıldığı, lenfoblastik lösemi ve hodgkin olmayan lenfoma tedavisinde ise Kymriah ve Yescarta (Zheng, Kros, & Li, 2018) pazarlama onayı alan ilaçlar olmuştur. Şekil 2'de gen transfer vektörlerinin 2020'de kullanım dağılımı verilmiştir.



Şekil 2. Gen transfer vektörlerinin 2020'de kullanım dağılımı

(The Cell and Gene Therapy Catapult, 2021'den uyarlanmıştır)

2.1.2. Viral Olmayan Gen Aktarım Yöntemleri

Viral olmayan gen aktarım yöntemleri fiziksel yöntemler ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır.

2.1.2.1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler, nükleik asitlerin hücre zarını geçmesine, sitozole veya çekirdeğe herhangi bir taşıyıcı sisteme gerek duymadan, ekzojen fiziksel uyaranlar ile uygulanmasına dayanır (Wells, 2004). Çıplak DNA'nın enjeksiyonu en basit ve en güvenilir yol olmakla birlikte nükleaz degradasyonu nedeniyle kullanımları kısıtlıdır. Mikroenjeksiyon, gen tabancası, elektroporasyon, sonoporasyon en çok kullanılan fiziksel yöntemlerdendir.

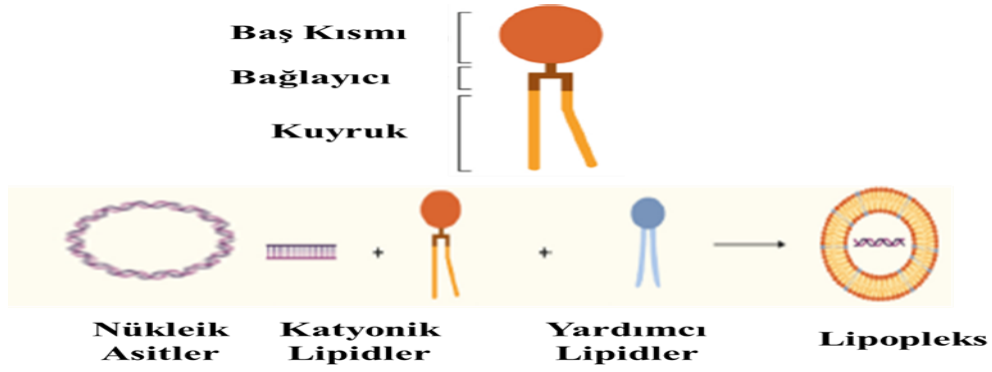
2.1.2.2. Kimyasal Sistemler

Viral vektörlerin güvenlik, immünojeniklik ve yüksek maliyet gibi çalışmalarda kullanımlarını sınırlayan özelliklerine alternatif olarak viral olmayan taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Viral olmayan taşıyıcı sistemler inorganik parçacıklar, sentetik veya doğal biyoparçalanabilir parçacıklar olarak sınıflandırılabilir. Etkili bir gen taşıyıcı sistem için düşük immünojeniteye sahip, genetik materyali taşıyabilme kapasitesi yüksek ve belirli hücrelere hedeflendirilebilen nanoparçacık tabanlı sistemler geliştirilmektedir (Jin et al., 2014). Negatif yüklü nükleik asitler, elektrostatik etkileşim ile katyonik polimerlerle polipleks taşıyıcı sistemleri (Hall, Lächelt, Bartek, Wagner, & Moghimi, 2017a); katyonik lipidlerle lipopleks taşıyıcı sistemleri (Martin et al., 2005); katyonik lipidler ve katyonik polimerlerin kombinasyonu ile lipopolipleks taşıyıcı sistemleri oluşturmaktadır (Bono, Ponti, Mantovani, & Candiani, 2020). Bu sistemlerin viral vektörlere kıyasla uygulama güvenilirliği ve kolay üretim imkanı gibi avantajlarına rağmen, zayıf transfeksiyon verimlilikleri klinik uygulamalarında sorun teşkil etmektedir.

2.1.2.1. Lipid Tabanlı Gen Taşıyıcı Sistemler

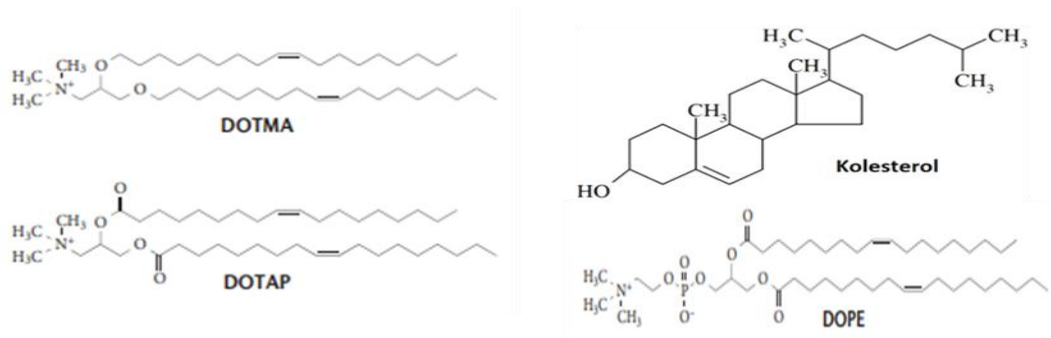
Lipid tabanlı taşıyıcılar, özellikle modifikasyonların kolay uygulanabilirliği açısından gen ekspresyonu ve gen susturma çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. NA taşıyıcısı olarak doğrudan kullanılmalarının yanı sıra lipozom, nanopartikül ve nanoemülsiyonların yapısına katılarak da gen taşıyıcı nanopartiküller sistemlerin hazırlanmasında kullanılabilirler. 1980'de ilk yapılan çalışma, fosfolipid fosfatidilserinden oluşan lipozomların, SV40 DNA'sının maymun böbrek hücrelerine girmesini ve daha etkili bir taşıma sağladığını göstermiştir (Fraley, Straubinger, Louise Springer, Papahadjopoulos, & Rule, 1981). Sentetik katyonik lipid DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchloride) ile memeli hücre hatlarında, daha yüksek transfeksiyon etkinliği gösteren lipozomlar oluşturulmuştur (Felgner et al., 1987).

Genel olarak, katyonik lipidlerin yapısı üç farklı kısımdan oluşur (Şekil 3). Bu kısımlardan ilki, bir bağlayıcı yoluyla, kovalent olarak hidrofobik bir kuyruğa bağlanan katyonik bir baş gruptur (Martin et al., 2005). Katyonik lipidlerin pozitif yüke sahip baş grubu, elektrostatik etkileşimler ile nükleik asit omurgasının anyonik fosfat gruplarını bağlayabilir ve yoğunlaştırabilir. Ayrıca boyut ve yük yoğunluğu gibi, lipopleks stabilitesinden, hücre zarı ile etkileşimlerinden, endozomal kaçış mekanizmalarından, NA yoğunlaştırılmasından sorumludur bu nedenle lipoplekslerin genel performansı üzerinde büyük bir etkiye sahiptirler (Zhi et al., 2013). İkinci kısım hidrofilik polar baş grubu ile polar olmayan kuyruklar arasındaki bağlayıcı kısımdır. Hidrofobik ve katyonik kısımların ilişkisi, lipidin NA'lar ile etkileşimini ve gen transfer verimliliğini etkiler (Pezzoli & Candiani, 2013). Üçüncü kısım olan kuyruk kısmı ise katyonik lipidlerin hidrofobik bölgesini oluşturmakla birlikte, yapı-aktivite ilişkisinde, lipoplekslerin stabilitesinde ve sitotoksitesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Jones, Chen, Ravikrishnan, Rane, & Pfeifer, 2013).



Şekil 3. Katyonik bir lipidin üç temel kısmının gösterimi

DOTMA (N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) ve DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane chloride) gibi en çok kullanılan katyonik lipidler tek başlarına NA'ları başarıyla hücrelere taşıyabilirler ancak genellikle ko-lipidler olarak da adlandırılan DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), kolesterol vb. yardımcı lipidler transfeksiyon aktivitesini ve nanoparçacık stabilitesini arttırmak için lipozom formülasyonlarına dahil edilmektedir. Kolesterol, fosfolipidlerin hidrokarbon zincirleriyle etkileşim sayesinde, membran stabilitesini arttırmaktadır (Koynova, Wang, & MacDonald, 2006). DOPE, bir fosfoetanolamin baş grubuna sahip olması nedeniyle füzyon ara yapılarının oluşumunu kolaylaştırarak membran geçirgenliğini indükleyebilir (Li & Szoka, n.d.). Şekil 4'de katyonik lipidler ve yardımcı lipidlerin kimyasal yapıları verilmiştir.



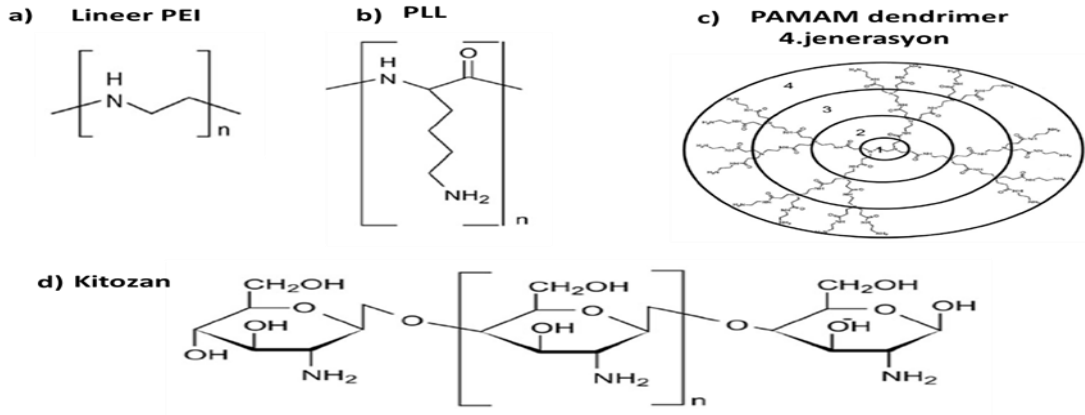
Şekil 4. Katyonik lipidler ve yardımcı lipidlerin kimyasal yapısı

(açık kimyasal isimleri için bk. kısaltmalar)

2.1.2.2. Polimer Tabanlı Gen Taşıyıcı Sistemler

Katyonik polimerlerin genel olarak stabil olması, kimyasal çeşitliliği, fonksiyonelleştirme potansiyellerinin yüksek olması ayrıca üretimlerinin kolaylığı nükleik asit taşınması için kullanımlarını oldukça cazip hale getirmiştir. Katyonik polimerler yapılarında bulunan aminler sayesinde, negatif yüklü nükleik asitler ile kompakt hale gelerek polipleks oluşturabilirler. En çok çalışılan polimerler; Poli-L-lizin (PLL), polietilenimin (PEI), kitozan, siklodekstrin, dendrimerler ve poliamidoaminler (PAA)'dır. Şekil 5'de katyonik polimerlerin kimyasal yapıları verilmiştir.

PLL, DNA transfeksiyonu için araştırılan ilk katyonik polimerdir (Jones et al., 2013). Temel amino asit lizinden oluşturulmuş bir homopolipeptiddir ve DNA ile kompleks oluşturabilme kabiliyetleri 1960'lardan beri bilinmektedir (Olins, Olins, & von Hippel, 1967). PLL, PEG gibi bir kaplama ajanı olmadığı şartlarda, fizyolojik pH'da amin grupları nedeniyle düşük endosomal tamponlama kapasitesine sahiptir, bu nedenle zayıf transfeksiyon etkinliği gösterir ve sitotoksitesi yüksektir (Mintzer & Simanek, 2009). Serum bileşenleri ile etkileşimini azaltarak dolaşım süresini artırmak için genelde PEG ile kaplanırlar (Alexis, Pridgen, Molnar, & Farokhzad, 2008). PEI, Boussif ve ark. tarafından sentezlenmiştir (Boussif et al., 1995), yüksek katyonik yük yoğunluğuna sahip olmakla birlikte çalışmalarda en çok kullanılan polimerler arasındadır (Jones et al., 2013). PEI, yüksek transfeksiyon etkinliği göstermesi nedeniyle altın standart transfektan polimeri olarak tanımlanmaktadır. İki alifatik karbon grubuna bağlı amino azotun tekrarlayan birimleri sayesinde sahip olduğu yüksek katyonik yük, kolaylıkla nükleik asitlerle kompleks oluşumunu sağlamaktadır (Piotrowski-Daspi, Kauffman, Bracaglia, & Saltzman, 2020). Polietileniminin transfeksiyon etkinliği molekül ağırlığına bağlı olarak değişmektedir ancak yüksek molekül ağırlıklı polimerde sitotoksite daha yüksektir (Fischer, Li, Ahlemeyer, Krieglstein, & Kissel, 2003).



Şekil 5. Katyonik polimerler ve kimyasal yapıları

a: PEI poli(etilenimin), b: PLL poli(L-lizin); c: PAMAM 4.poli (amidoamin); d: kitozan

2.1.2.3. Sekans Tanımlı Makromoleküler Taşıyıcı Sistemler

Lipit tabanlı, polimer tabanlı veya diğer nanomateryal tabanlı formülasyonlardahil olmak üzere sentetik nükleik asit taşıyıcı sistemleri için farklı stratejiler geliştirilmektedir (Lächelt & Wagner, 2015b). Peptit benzeri taşıyıcıların sentetik diziler olarak tasarlanması, tekrarlı bir süreç ile çok işlevli ve hedefe yönelik nükleik asit dağıtımını optimize etmek için bir strateji sağlamıştır (Hartmann, Häfele, Peschka-Süss, Antonietti, & Börner, 2007). Nükleik asit taşınması ve biyoaktivitelerini iyileştirmek amacıyla, sekans tanımlı yapay polimerler üretilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında sekans tanımlı makromoleküler yapılar olarak lipo-oligomerler çalışılmıştır.

Oligomerler, yapay amino asitler ve yağ asitleri kullanılarak katı faz destekli sentez (SPS) yöntemiyle sentezlenmektedir. Sentez sürecinde, yapay amino asitler, doğal amino asitler ve yağ asitleri kullanılarak etkili bir taşıyıcı sistem özellikleri taşıması için yapay fonksiyonel birimler tanımlanmaktadır. Sonra bu çoklu yapı bileşenleri, tanımlanmış bir sekansla makromoleküllere adım adım eklenmektedir (Lutz, Ouchi, Liu, & Sawamoto, 2013).

Oluşturulan her yeni kimyasal makromolekülün nükleik asit taşıma yetenekleri değerlendirilmekte ve taşıyıcı sistemlerini yapı-aktivite ilişkilerini optimize etmek için daha fazla iyileştirmeler yapılmaktadır.

Sekans tanımlı oligomer temelli taşıyıcı sistemler son zamanlarda nükleik asitlerin (Schaffert, Troiber, Salcher, Frçhlich, et al., 2011), proteinlerin (P Zhang et al., 2015) ve ilaçların (Truebenbach, Zhang, et al., 2019) taşınması için uygulanmıştır. Çalışmalar aminoetilen temelli polimerlerin ve peptitlerin avantajlarını birleştirerek optimize etmeye yöneliktir (He et al., 2016). Sekans tanımlı makromoleküler taşıyıcı sistemlerin etkinliğinin iyileştirilmesinde üç temel yaklaşım esas alınmaktadır: (a) makromolekül omurgasının kimyasal modifikasyonları (Egli & Manoharan, 2019); (b) spesifik reseptörlerle hedefleme veya taşınmada aracı yapılarla kovalent konjugatlar oluşturma (Foster et al., 2018); (c) lipid, peptid, polimer veya inorganik-organik hibrit ile nanoparçacıklar ile supramoleküler yapılar oluşturmak (Luo et al., 2019).

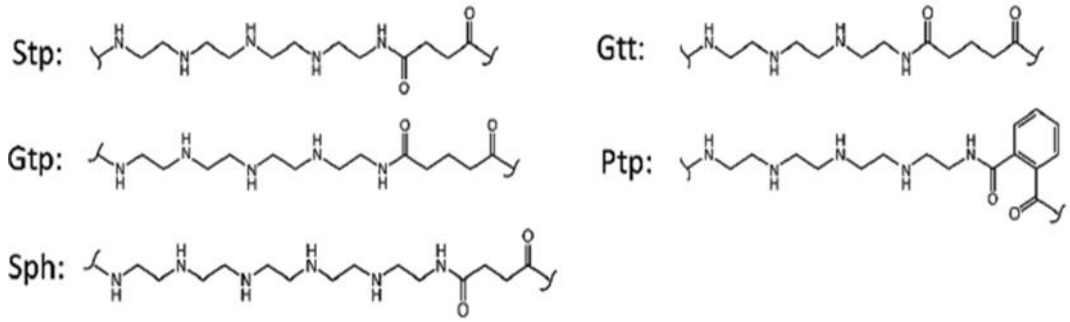
İlk yapılan çalışma, sentetik peptitlerin DNA ile kompleks yapılar oluşturabilme kabiliyeti üzerinedir. Lizin, arjinin ve ornitin katyonik amino asit olarak tanımlanmıştır ve bir dizi dallı peptidler sentezlenerek karakterize edilmiştir (Plank, Tang, Wolfe, & Szoka, 1999). Elde edilen oligomerler ilk olarak pDNA ile polipleks oluşturmak için kullanılmıştır.

Hartmann ve Bornerspermin ve süksinik asit gibi yapı taşlarına dayanan sekans tanımlı oligo (amidoaminler) için SPS yöntemini kullanmıştır (Hartmann, Krause, Antonietti, & Börner, 2006).

siRNA dağıtımı için, trietilen tetramini, doğal amino asit histidin, sistein ve konjuge edilmiş oleik asit ile birleştirerek yapay lipo-peptid taşıyıcıları tasarlanmıştır (X. L. Wang et al., 2009).

2.1.2.3.1. Oligomerlerin Moleküler Yapısı

SPS yöntemi kullanılarak, farklı katyonik yapı omurgaları (tetraetilenepentamin sentetik peptidler STP, GTP ve PTT ve trietilenetetramin sentetik peptid GTT) ve topolojiler (üç kollu; T-şekli, i-şekil ve U şekli) ile nükleik asit teslimi için daha optimize hassas sekans tanımlı yapay oligomerler oluşturulabilmektedir. Katyonik yapı blokları olarak kullanılan sentetik oligo-amino asitlerin moleküler yapısı şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6.Sentetik oligo-amino asitler ve moleküler yapıları

Stp:succinoyl-tetraethylene-pentamine; Gtt: gluaryltriethylenetetramine;
 Sph:succinoylpentaethylenhexamine; Gtt: glutaryltriethylenetetramine; Ptp:
 ftalyltetraethylenepentamine

pDNA ile kompleks oluşturma ve transfeksiyon etkinliğine göre Sph > Stp > Gtt şeklindedir. Endozomal protonasyon kapasitesine hassas ayar yapılabilmesi daha fazla optimizasyon imkanı sağlamaktadır. Çift sayılı protonlanabilir azotlara (Sph ve Gtt) sahip yapıların, tek sayılı protonlanabilir azotlara sahip analoguna (Stp) göre önemli ölçüde daha yüksek endosomal tampon kapasitesi gösterdiği bildirilmiştir (Y. Wang & Wagner, 2020).

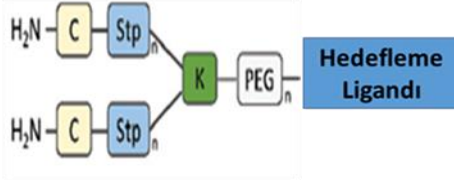
2.1.2.3.2. Oligomerlerin Topolojik Yapısı

Oligomerler merkezde (T şekil), zincirlerin sonunda (İ-şekil, U- şekil), dallanmış yapılar (2-kollu; 3-kollu; 4-kollu) veya doğrusal (lineer) topolojiye sahip olacak şekilde tasarlanabilmektedir Farklı topolojilerin NA'lerle kompleksleşme ve biyolojik özellikleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür (Schaffert, Troiber, Salcher, Fröhlich, et al., 2011). Şekil 7'de oligomerlerin topolojik yapıları verilmiştir.

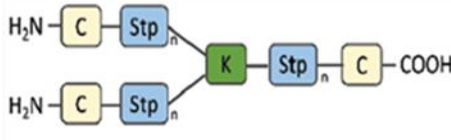
a) Lineer Oligomer



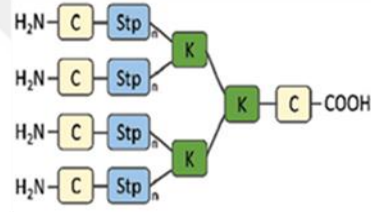
b) 2-Kollu Oligomer



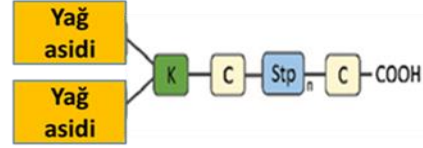
c) 3-Kollu Oligomer



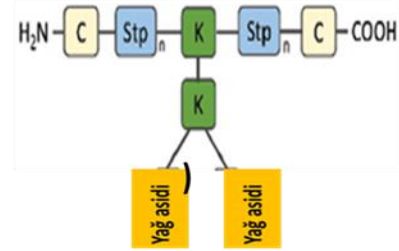
d) 4-Kollu Oligomer



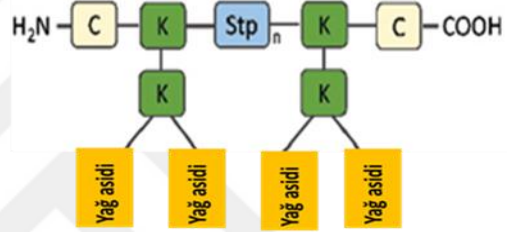
e) İ-şekil Oligomer



f) T şekil Oligomer



g) U şekil Oligomer

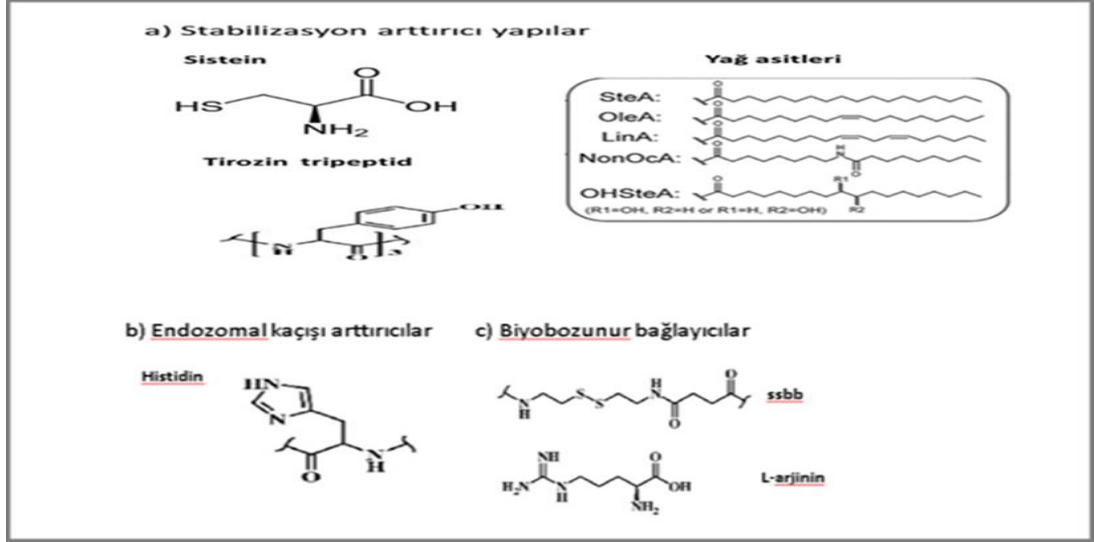


Şekil 7. Farklı topolojilere sahip Stp tabanlı oligomerlerin moleküler yapısı

a: lineer; b: 2 kollu; c: 3 kollu; d: 4 kollu; e: İ-şekil; f: T-şekil; g: U-şekil oligomer yapısı; K: lizin (Luo, Wagner, & Wang, 2020' den uyarlanmıştır)

2.1.2.3.3. Oligomerlerin Fonksiyonelleştirici Yapıları

Sekans tanımlı makromoleküllere, transfeksiyon etkinliklerini artırmak ve biyoaktivitelerini iyileştirmek amacıyla: kaplama ajanları, hedefleme ligandları, hidrofobik yapılar, endosomal tamponlama ajanları gibi yapılar dahil edilebilir. Oligomerlere eklenen fonksiyonelleştirici alanlar; tamponlama özelliklerini, pDNA polileks stabilitesini, endozomal kaçış ve transfeksiyon aktivitesinin *in vitro* ve *in vivo* davranışlarını, moleküler yapı-aktivite ilişkilerinde ayarlanmasını sağlamaktadır (Y. Wang & Wagner, 2020). Şekil 8'de oligomerlere eklenen fonksiyonelleştirici yapılar gösterilmiştir.



Şekil 8. Oligomerlerin fonksiyonelleştirici yapıları

SteA: Stearik asit; OleA: Oleik asit; LinA: Linoleik asit; NonOca: Nonanamidooktanoik asit; OHSteA: Hidroksistearik asit; Katyonik omurga ve hidrofobik yağ asidi arasındaki bağlayıcı ssbb: Suksinoil-sisteamin (Y. Wang & Wagner, 2020'den uyarlanmıştır)

Polilizin veya poliarjinin, pDNA ile kompleksler oluşturur ancak zayıf endozomal tamponlama kapasitesi ve buna bağlı olarak zayıf vesiküler kaçış özelliğinden dolayı nükleik asidi sitozole verimli bir şekilde teslim edememektedir. Bu nedenle formülasyonlara histidin eklenerek endozomal kaçış sağlanabilmektedir (Midoux & Monsigny, 1999). Sisteinlerin formülasyonlara dahil edilmesi, disülfür çapraz bağlama ile polipeks stabilitesini arttırmaktadır (Lächelt et al., 2014a). Tirozin tripeptitlerinin dahil edilmesi ise hidrofobik yağ asidi alanları ile polipeks stabilizasyonunu, endozomal membran etkileşimini sağlamaktadır (Kuhn et al., 2020b).

Luo ve meslektaşları, katyonik bir trietilen tetramin baş kısmı ile sistein, histidin veya lizinden oluşan, iki terminal hidrofobik oleik asit içeren amino asit temelli bağlayıcılardan oluşan nükleik asit taşınması için yapay lipo-peptidler tasarlamıştır (Luo et al., 2020). Böylelikle sisteinler ile disülfid bağları daha fazla optimize edilirken, histidin ile endozomal kaçış artırılmış, yağ asitleri ile daha stabil polipeksler oluşturularak transfeksiyon etkinliği daha yüksek formülasyonlar oluşturulmuştur. Molekül boyutu, genel yük, sıralama ve topoloji (doğrusal, dallanmış, tarak, hiperdallanma veya dendritik yapı ve ek fonksiyonel gruplar için bağlantı alanları) transfeksiyon verimliliğinde önemli derecede etkilidir.

Bu fonksiyonelleştirilmiş kompleks makromoleküllerin tanımlanmış sekanslar olarak kesin sentezi, aynı zamanda kimyasal yapı ile biyolojik aktivite arasındaki net ilişkilerin tanımlanması hassas sekans tanımlı yapay polimerler üretimi için esastır. siRNA ve pDNA taşınması için 300'den fazla sekans tanımlı sentetik oligomer sentezlenmiştir. Sentezlenen bazı oligomerlerin dizileri, topolojileri ve kısaltmaları şekil 9'da verilmiştir.

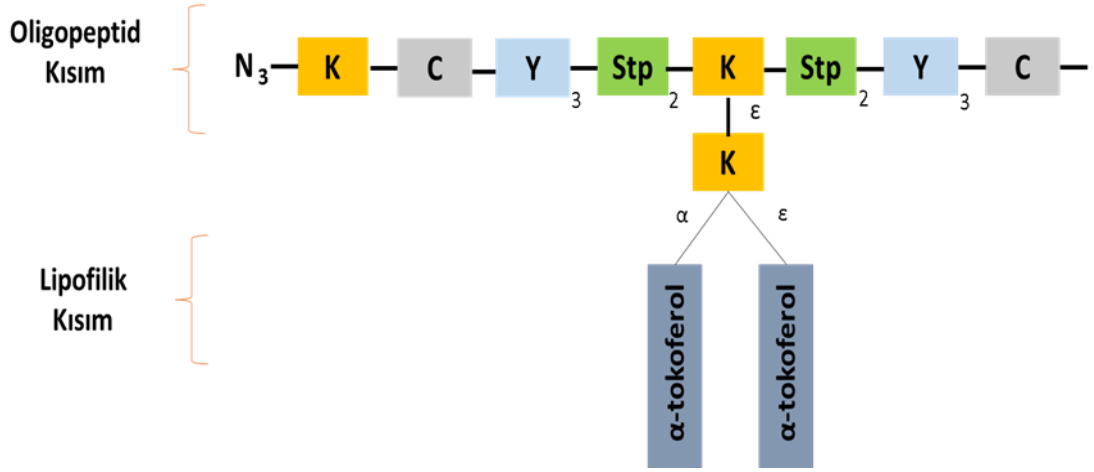
No	Sekans	Topoloji	Kısaltma
610	A-Gtt-A-Gtt-A-Gtt-A	Lineer	A-(Gtt-A) ₃
611	H-Gtt-H-Gtt-H-Gtt-H	Lineer	H-(Gtt-H) ₃
612	A-Stp-A-Stp-A-Stp-A	Lineer	A-(Stp-A) ₃
613	H-Stp-H-Stp-H-Stp-H	Lineer	H-(Stp-H) ₃
614	A-Sph-A-Sph-A-Sph-A	Lineer	A-(Sph-A) ₃
615	H-Sph-H-Sph-H-Sph-H	Lineer	H-(Sph-H) ₃
580	AK[AK(A-Gtt-A-Gtt-A-Gtt-AA) ₂] ₂	4-kollu	Gtt-AA
578	AK[HK(H-Gtt-H-Gtt-H-Gtt-HA) ₂] ₂	4-kollu	Gtt-HA
579	AK[AK(A-Gtt-A-Gtt-A-Gtt-AC) ₂] ₂	4-kollu	Gtt-AC
577	AK[HK(H-Gtt-H-Gtt-H-Gtt-HC) ₂] ₂	4-kollu	Gtt-HC
576	AK[AK(A-Stp-A-Stp-A-Stp-AA) ₂] ₂	4-kollu	Stp-AA
574	AK[HK(H-Stp-H-Stp-H-Stp-HA) ₂] ₂	4-kollu	Stp-HA
575	AK[AK(A-Stp-A-Stp-A-Stp-AC) ₂] ₂	4-kollu	Stp-AC
573	AK[HK(H-Stp-H-Stp-H-Stp-HC) ₂] ₂	4-kollu	Stp-HC
609	AK[AK(A-Sph-A-Sph-A-Sph-AA) ₂] ₂	4-kollu	Sph-AA
607	AK[HK(H-Sph-H-Sph-H-Sph-HA) ₂] ₂	4-kollu	Sph-HA
608	AK[AK(A-Sph-A-Sph-A-Sph-AC) ₂] ₂	4-kollu	Sph-AC
606	AK[HK(H-Sph-H-Sph-H-Sph-HC) ₂] ₂	4-kollu	Sph-HC
582	AK[K(KH-(KHH) ₃ -KHK) ₂] ₂	4-kollu HK Peptid	(KHH) ₃ -KHK
584	AK[K(KH-(KHH) ₅ -KHK) ₂] ₂	4-kollu HK Peptid	(KHH) ₅ -KHK
616	A-(dPEG ₂₄) ₂ -HK[H-(Stp-H) ₄ -C] ₂	2-kollu PEG'lenmiş	Ala-His
617	KRPGKAKHG-(dPEG ₂₄) ₂ -AK[A-(Stp-A) ₄ -C] ₂	2-kollu PEG'lenmiş	B6-Ala
618	KRPGKAKHG-(dPEG ₂₄) ₂ -HK[H-(Stp-H) ₄ -C] ₂	2-kollu PEG'lenmiş	B6-His
619	K[(dPEG ₂₄) ₂ -FolA]-AK[A-(Stp-A) ₄ -C] ₂	2-kollu PEG'lenmiş	FolA-Ala
620	K[(dPEG ₂₄) ₂ -FolA]-HK[H-(Stp-H) ₄ -C] ₂	2-kollu PEG'lenmiş	FolA-His

Şekil 9. Sentezlenmiş bazı oligomerlerin dizileri, topolojileri ve kısaltmaları

(Lächelt ve ark., 2014'ten uyarlanmıştır)

2.1.2.3.4. Lipo-oligomer 1451

Bu tezde kullanılan yeni lipo-oligomerlerin kimyasal sentezi katı faz destekli sentez yöntemiyle (SPS) Almanya'da Ludwig-Maximilians University-Munich, Farmasötik Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Lipo-oligomer kütüphanesi sıra numarası:1451). Tanımlanması MALDI-TOF kütle spektroskopisi ile yapılmış ve sentez çalışmaları gerçekleştirildikten sonra, kullanıma hazır olarak temin edilmiştir. Lipo-oligomer 1451'in kimyasal yapısı Şekil 10'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 10. Lipo-oligomer 1451 kimyasal yapısı

(Stp tabanlı, T şekil); C: Sistein; K: Lizin; Y: Tirozin; Stp: Tetraetilenepentamin

Lipooligomer 1451, Stp taşıyan bir baş grubundan; amino asit olarak sistein, lizin ve tirozin içeren bağlayıcı gruptan ve α-Tokoferol içeren iki adet kuyruk kısmından oluşmuştur. Topolojileri T-şekildir. Doğal L-amino asit lizin ile bağlanmış iki Stp ünitesinden oluşmaktadır. Stp ünitesinden sonra üç adet tirozin ve sonunda ikişer ünite sistein yer almaktadır. Oligomerin molekül omurgasının Stp ile oluşturulduğu yapılar, Stp'nin üç protonlanabilen nitrojen yapıları sayesinde negatif yüklü pDNA ile güçlü elektrostatik etkileşimler oluşturmaktadır. Sentetik yapı taşı Stp'nin tekrarlayan üniteleri, hem nükleik asit bağlama hem de endosomal tamponlama kapasitesine sahip lipooligomerler sağlar ve bu nedenle nükleik asit taşıyıcılar için önemli bir yapıdır. Tirozin ise aromatik halkalarının intermoleküler etkileşimleri ile nanopartiküller terminal sisteinlerinin disülfür çapraz bağlanmasını artırarak daha stabil yapılar oluşturulabilmektedir.

Tez çalışması kapsamında lipooligomer 1451 ile oluşturulan lipopleks formülasyonlarına, transfeksiyon etkinliğinin artırılmasına yönelik belirli oranlarda kolesterol, Tween 80 (T80) ve D-α-Tokoferol polietilen glikol 1000 succinate (TPGS) yardımcı maddeleri eklenmiştir.

Taşıyıcı sistem olarak Lipooligomer 1451 ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının transfeksiyon verimliliği ve formülasyonlara eklenen bu yardımcı maddelerin, transfeksiyon verimliliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

3.Gereç ve Yöntem

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Cihaz ismi - modeli	Üretici firma - ülke
UV transilluminatör & kemilüminesans görüntüleme cihazı (2)- G:BOX	Syngene/ Synoptics Ltd., İngiltere
Agaroz Jel Elektroforez Düzenegi- MyGel mini	Accuris Instruments,ABD
Buzdolabı (+4 °C)- RSA1STSL	Samsung, Güney Kore
CO2 İnkübatörü	NuAire, ABD
Derin Dondurucu (-20 °C)	Sanyo Electronics, Japonya
Derin Dondurucu (-86°C)- U410, Premium	New Brunswick Scientific/ Eppendorf, Almanya
Dijital Su Banyosu- Ecoline StarEdition RE-107 with E100 Controller	Lauda,Almanya
Hassas Terazi- BP121S ve BL600	Sartorius Biotech GmbH, Almanya
İnverted mikroskop	Leica Microsystems, Almanya
İnverted mikroskop (kameralı)- IX71	Olympus, Japonya
Otoklav- Hiclave HV-50L	Hirayama- Japonya
pH metre-SevenGo Duo SG730	Mettler Toledo, İsviçre

Cihaz ismi - modeli (devam)	Üretici firma - ülke (devam)
Mikroplaka okuyucu - Varioskan Flash	Thermo Fisher Scientific, ABD
Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical, İngitere
Yatay çalkalayıcı - IKA vortex genius 3	IKA-Werke GmbH& Co.KG, Almanya
Santrifüj- Beckman Allegra X-15R	Beckman Coulter, ABD
Manyetik karıştırıcı-MTOPS- HSD180	Misung Scientific, Kore
Akış sitometresi- BD Accuri™ C6	BD Biosciences/ Becton, Dickinson and Company, ABD
Laminer hava akış kabini- Class II Type A2	ESCO Micro Pte. Ltd., Singapur
Saf su üretim cihazı- Milli Q	Millipore/ Merck, ABD
Santrifüj- Hettich Rotofix 32A	Hettich Lab., Almanya
Vorteks- MS1 Minishaker	IKA-Werke GmbH& Co.KG, Almanya

3.1.2. Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Materyaller

Materyal adı (devam)	Üretici firma - ülke
NarI- # R0191S	New England Biolabs Inc., ABD
pDNA(GFP kodlayan)	GeneCopoeia
Penisilin ve Streptomisin Solüsyonu (P/S) - # 03-031-1B	Biological Industries, İsrail
Proteinaz-k	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD
PvuI-HF- # R3150S	New England Biolabs Inc., ABD
Resazurin Sodyum Tuzu #R7017	Sigma-Aldrich, Almanya
RPMI 1640-#350-007-CL	Wisent Inc., Kanada
SacI-HF- # R3156S	New England Biolabs Inc., ABD
SacII- # R0157S	New England Biolabs Inc., ABD
Safeview- #G108	Applied Biological Materials (abm) Inc., Kanada
TPGS-1000- #57668	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripan mavisi (<i>tripan blue</i>)- # 03-102-1B	Biological Industries, İsrail
TRIS, Ultra Pure- # TRS001	Bioshop Inc., Kanada
Tween 80- # 9005-65-6	Millipore/Merck, ABD
H1299 İnsan küçük hücreli olmayan Akciğer karsinomu hücre hattı	AATC kodu: CRL-5803

3.1.3. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

✓ Besiyeri: RPMI 1640

RPMI 1640 içerisinde; % 10 fetal bovin serum (FBS), 100 mM L-glutamin ve %1 P/S (Penisilin 100 U/ml, Streptomisin 100 µg/ml) eklenerek hazırlanan besiyeri tüm *in vitro* deneyler boyunca kullanılmıştır.

✓ 5X Tris-Borik asit- EDTA (TBE) Çözeltisi

54 g Tris ve 27.5 g Borik asit 800 mL bidistile su içerisinde çözündürülmüştür. Çözelti üzerine 20 mL 0.5 M EDTA çözeltisi (pH 8.0) eklenerek, bidistile su ile çözelti hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Elektroforez tamponu olarak veya agaroz jellerin hazırlanmasında 1/5 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

✓ HEPES Glukoz Tamponu (HBG) (20 Mm, pH: 7.4)

2.38 g HEPES (MA: 238.30 g/mol) ultra saf su su içerisinde çözündürülerek 300 mL'ye tamamlanmıştır. 27,5 g glucose monohydrate eklenmiştir. Hazırlanan çözeltinin üzerine kadar 1 M NaoH çözeltisi eklenerek pH 7.4'e ayarlanmıştır. Steril filitre kullanılarak steril edilmiştir -20°C'de saklanmıştır.

✓ Elektroforez Yükleme Tamponu (x 6)

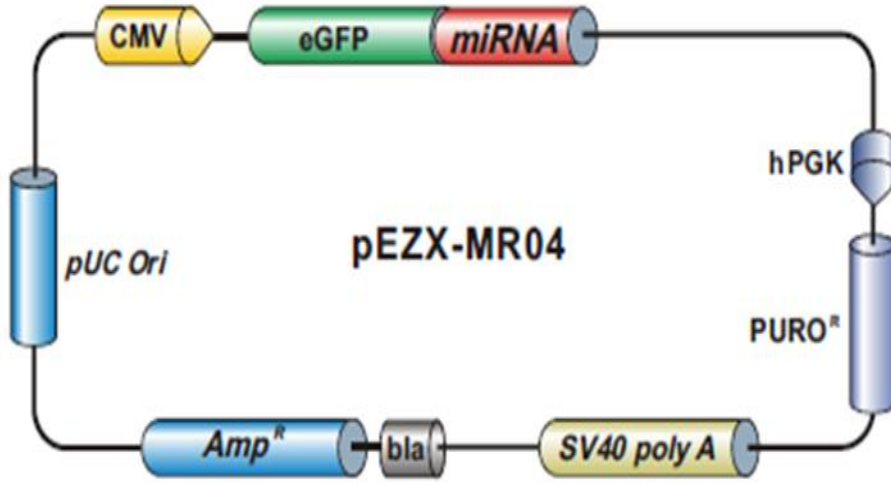
6 mL gliserol, 1.2 mL 0.5 M EDTA, 2.8 mL H₂O, 0.02 g bromofenol mavisi kullanılarak hazırlanmıştır. Elektroforez yükleme tampon:örnek oranı 5:1 (h/h) olacak şekilde kullanılmıştır

3.2. Yöntem

3.2.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Nükleik Asitler

Çalışmamızda çizik deneyinde kullanılmak üzere yeşil floresan protein (GFP) kodlayan, üzerinde ampisilin direnç geni taşıyan, 4942 bp büyüklüğünde pEZX-MR04-EGFP ve diğer tüm deneylerde ise kontrol plazmiti kullanılmıştır.

Kullanılan pEZX-MR04-EGFP, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD bünyesinde önceki çalışmalarda kullanılmak üzere temin edilmiş ve stok alınmıştır. Bu çalışmada sonraki aşamalarda hücre kültürü çalışmalarında *in vitro* transfeksiyon amacıyla kullanılacak olan plazmitin karakterizasyon analizi çalışmaları yapılmıştır. Plazmitin şematik gen haritası Şekil 12’de gösterilmiştir.



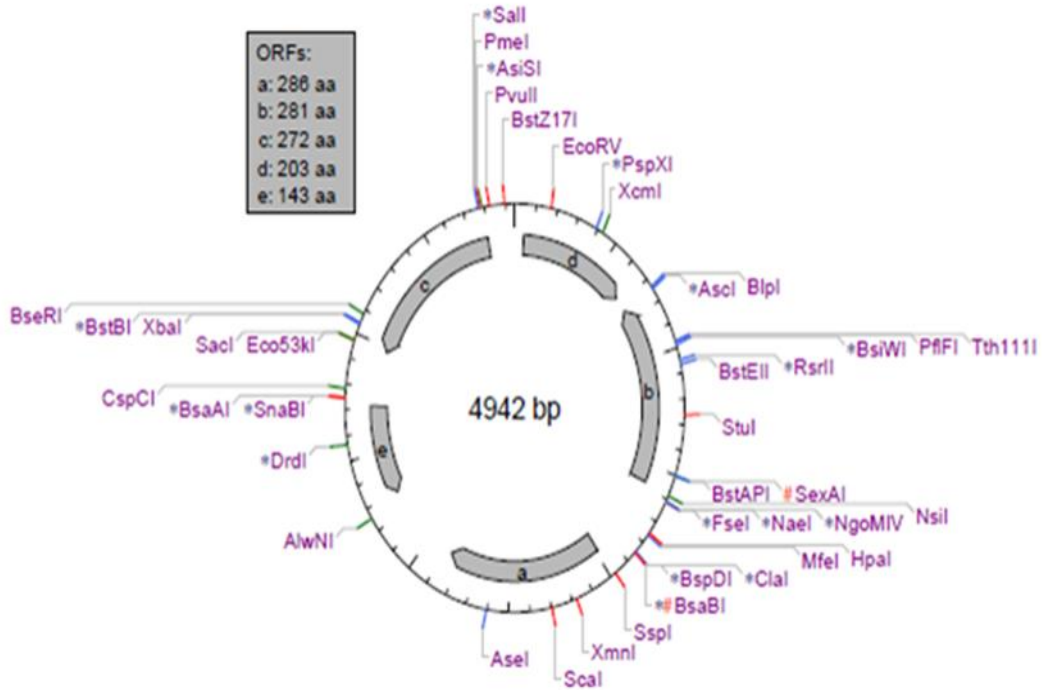
Şekil 11. pEZX-MR04-GFP’in plazmit haritası

3.2.1.1. Plazmit DNA Karakterizasyonu

pDNA’nın karakterizasyonu için restriksiyon enzimleri ile kesim analizi yapılmıştır.

3.2.1.2. Restriksiyon Enzim Kesimi ile Analiz

pEZX-MR04 plazmid DNA'sı SacI-HF, SacII, PvuI-HF ve NarI restriksiyon endonükleazları ile kesilmiştir. Kesim tablo 1'de belirtilen bileşik oranlarında, 15 µl reaksiyon ortamında gerçekleştirilmiştir. Tüm enzimlerden 1 µg pDNA başına 32 U kullanılmıştır. Karışımlar su banyosunda 37° C'de bir saat süreyle inkübe edilmiştir. Plazmid DNA restriksiyon endonükleazlar ile kesildikten sonra, % 1'lik agaroz jel elektroforezinde incelenerek, elde edilen DNA bantları ve boyutları değerlendirilmiş ve doğrulukları kontrol edilmiştir. pEZX-MR04 'ün restriksiyon enzim haritası şekil 13'de gösterilmiştir. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonucunda oluşacak olan DNA fragmanları (tablo 2) , deneyde kullanılmış olan restriksiyon enzim kitinin (cutSmart Buffer, New England Biolabs Inc., ABD) <http://nc2.neb.com/NEBcutter2> web sitesi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 12. pEZX-MR04 -EGFP'in restriksiyon enzim kesim haritası

Tablo 1. Restriksiyon enzimleri ve kesim miktarları

No	pDNA ⁺ μl	SacI- HF [*] μl	Pvu- HF [*] μl	NarI ^{**} μl	SacII [*] μl	10X NE Tamponu μl	Ultra saf su	Total V. mL
1	1 kb DNA işaretleyici (5 μl)							
2	4	—	—	—	—	—	11	15
3	4	0,64	—	—	—	1,5	8,86	15
4	4	—	0,64	—	—	1,5	8,86	15
5	4	—	—	2,56	—	1,5	6,94	15
6	4	—	—	—	0,64	1,5	8,86	15
7	4	0,64	0,64	—	—	1,5	8,22	15
8	4	0,64	—	—	0,64	1,5	8,22	15
Bileşen konsantrasyonları: ⁺ 100 μg/mL; [*] 20 U/μL; ^{**} 5 U/μL								

Tablo 2. Restriksiyon enzimleri ve kesim sonucunda oluşacak DNA fragmanları

No	Enzimler	Kordinatlar	Uzunluk (bp)
1	SacI-SacI	3975-3974	4942
2	SacII-SacII	1148-392	4187
3	SacII-SacII	393-1147	755
4	PvuI-PvuI	4792-2410	2561
5	PvuI-PvuI	2411-4791	2381
6	NarI-NarI	1273-487	4157
7	NarI-NarI	488-1141	654
8	NarI-NarI	1142-1272	131
9	PvuI-SacI	2411-3974	1564
10	SacI-PvuI	3975-4791	817
11	SacII-SacI	1148-3974	2827
12	SacI-SacII	3975-392	1360

3.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi Yöntemi

Agaroz jel elektroforezi ile yapılan çalışmalarda, çalışma protokolü doğrultusunda % 0,8 ya da %1 (a/h) agaroz içeren jeller kullanılmıştır. Elektroforez tamponu ve yükleme jeli hazırlamak için stok 5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon çözeltisinden dilüe edilerek hazırlanan 1X TBE kullanılmıştır. (Bknz: 3.1.3. Kullanılan besiyeri ve çözeltiler)

- Agaroz % 0.8 ya da %1 (a/h) konsantrasyonda TBE, pH 8.0 tamponu içerisinde mikrodalga fırında kaynatılarak çözündürülmüştür.
- Çözelti, sıcaklığı 50C'a kadar soğutulduktan sonra agaroz jel kasetlerine dökülmüştür. Jelin donmasının ardından içerisinde pH 8.0 TBE tamponu bulunan yürütme tankına alınmıştır.
- Jel üzerinde bulunan ilk kuyucuğa, 5 µL 1 kilobazlık (kb) DNA işaretleyici (yükleme boyası ile hazır karıştırılmış) yüklenmiştir..
- Örnekler, 5:1 (örnek:elektroforez yükleme tamponu) oranında 6x jel yükleme boyası ile karıştırılarak jele uygulanmıştır.
- Elektroforez işlemi sabit 100 volt akımda 30- 45 dakikada tamamlanmıştır.
- Jel 0.5 µg/mL Etidyum Bromür çözeltisi ile 15 dk inkübe edilmiş daha sonra distile su ile yıkanmıştır.
- Yıkama bittikten sonra jeller, UV transilluminatör (G:BOX, Syngene/ Synoptics Ltd., İngiltere) ile görüntülenmiştir.

3.2.2. Formülasyon Çalışmaları

3.2.2.1. Lipopleks Formülasyonlarının Hazırlanması

pDNA ve lipooligomer 1451'in optimum kompleksleşme oranını saptayabilmek için farklı N^+/P^- oranlarında kompleks formülasyonları hazırlanmıştır. N/P oranı polimerdeki pozitif yüklü amin (N) gruplarının mol oranlarının, DNA'daki fosfat (P) gruplarının mol oranlarına oranını belirtmektedir.

N/P hesaplamalarında sadece protonlanabilen nitrojenler kabul edilmiştir, bu nedenle Stp birimlerinin protonlanabilir azotları ve sisteinlerin N-terminal aminleri dikkate alınmıştır. Yöntem katyonik lipooligomer ile negatif yüke sahip pDNA'nın elektrostatik etkileşimine dayanarak gerçekleştirilmiştir. Optimum N/P oranını belirleyebilmek için 3, 6, 12, 18 olmak üzere 4 farklı N/P oranı çalışılmıştır. Farklı N/P oranlarında hazırlanan lipopleks formülasyon hesaplamaları tablo 3'te ve formülasyon içerikleri ise tablo 4'te verilmiştir. Stok konsantrasyonu 10 mg/mL olan lipooligomer1451, HBG (Hepes Glukoz Tamponu) ile seyreltilerek son konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde ayrı bir tüpte hazırlanmıştır. Stok konsantrasyonu 718 µg/mL olan pDNA, HBG (%5 glukoz, pH 7.4) tamponu ile seyreltilerek son konsantrasyonu 20 µg/mL pDNA çözeltisi hazırlanmıştır. 1 mg/mL lipooligomer çözeltisinden gerekli miktarda alınarak 10µL 'ye HBG ile tamamlanmıştır. Lipooligomer çözeltisi üzerine, konsantrasyonu 20 µg/mL olan pDNA çözeltisinden eşit hacimdeeklenmiş ve mikropipet ile 10 defa pipetlenerek karıştırılmıştır. Kompleks oluşumu için oda sıcaklığında 45 dakika bekletilmiştir. Kompleks hazırlanması süresince, tüm 20 µLformülasyonlarda pDNA'nın miktarı 200 ng olacak şekilde sabit tutulmuştur ve lipooligomer 1451 çözeltisinin hacmi teorik N/P oranını ayarlamak için değiştirilmiştir.

Tablo 3. Farklı N/P oranları için hesaplamalar

Oligomer No	Molekül ağırlığı (serbest baz)	Molekül ağırlığı (HCl tuzu)	Toplam Amin sayısı	Protonlanabilir Amin sayısı	C mg/mL	C mM
1451	3722,26	4415,76	19	13	1,00	0,226

Tablo 4. Farklı N/P oranlarında hazırlanan Lipopleks formülasyonlarının içerikleri

N/P	P ⁻ (nmol)	N ⁺ (nmol)	Oligomer ÇÇ* µL	HBG(µL)	pDNA ÇÇ** µL
3	0,622	1,886	0,63	9,37	10
6	0,622	3,732	1,27	8,73	10
12	0,622	7,464	2,54	7,46	10
18	0,622	11,196	3,80	6,20	10

ÇÇ: HBG ile seyreltilerek hazırlanan çalışma çözeltisi; Oligomer ÇÇ* konsantrasyonu: 1mg/mL; pDNA ÇÇ**konsantrasyonu : 20 µg/mL

Her örnek 200 ng pDNA içeren 20 mL toplam hacim üzerinden hesaplanmıştır.

*Lipooligomer 1451 stok konsantrasyonu: 10 mg/mL

Lipooligomer 1451 çalışma çözeltisi konsantrasyonu: 1 mg/mL

$M1.V1 = M2.V2$ 10 mg/mL x Vstok = 1 mg/mL x 1 mL

Çalışma Çözeltisi = 100 µL Lipooligomer-stok + 900 µL HBG (10 kat seyreltme)

**pDNA stok konsantrasyonu: 718 µg/mL

pDNA çalışma çözeltisi konsantrasyonu: 20 µg/mL

$$M1.V1 = M2.V2 \quad 718 \mu\text{g/mL} \times V_{\text{stok}} = 20 \mu\text{g/mL} \times 1 \text{ mL}$$

Çalışma Çözeltisi = 27,85 µL pDNA-stok+ 972.2 µL HBG (1mL çalışma çözeltisi için)

Lipopleks Formülasyonlarında Yapılan Modifikasyonlar

Ön çalışmalarla N/P oranı 6 olarak belirlenen optimal Lipo-oligomer 1451 ile hazırlanan lipopleks formülasyonunu daha stabil, serum degradasyonlarına karşı daha koruyucu ve transfeksiyon etkinliği daha yüksek hale getirebilmek amacıyla kolesterol (Kol), Tween80 (T80), D-α-Tocopherol polyethylene glycol 1000 suksinat (TPGS) ilave edilmiştir.

Lipooligomer 1451 çalışma çözeltisi üzerine farklı oranlarda Kol, T80 ve TPGS (mol:mol) çalışma çözeltileri eklenerek pDNA ile kompleks formülasyonları oluşturulmuştur. Çözeltinin konsantrasyonu ilgili eşdeğerlere (EQ) göre hesaplanmıştır. Eşdeğerler, eklenen modifikasyon çözeltilerinin lipopleks çözeltisindeki oligomerlere molar oranını temsil etmektedir. pDNA miktarı 200 ng olarak tüm formülasyonlarda aynı tutulmuştur. Lipopleks formülasyonlarında kullanılan çalışma çözeltileri ve miktarları tablo 5'te verilmiştir. İlk olarak lipooligomer çalışma çözeltisi formülasyonlara göre hesaplanan miktarlarda tüplere konulmuştur, üzerine modifikasyon çözeltileri eklenmiş ve mikropipetle karıştırılmıştır. Son olarak tüplere pDNA eklenerek mikropipet ile homojen bir karışım sağlanana kadar karıştırılmıştır. Santrifüjle çözeltinin tüp dibinde toplanması sağlandıktan sonra kompleks oluşumu için 45 dk. inkübasyona bırakılmıştır.

Kolesterol İlavesi

Kolesterol doğal bir steroid olup, formülasyonlarda yardımcı lipid olarak kullanılmıştır. Fosfolipidlerin, yağ-asit zincirleriyle etkileşimi sayesinde membran bütünlüğü sağladığı bilinmektedir (Koynova et al., 2006). Yük taşımamaları nedeniyle NA'ler ile etkileşime girmeyip, katyonik lipidlerin etkileşimini artırmaya yönelik etki göstermektedir. Kolesterolün lipid bazlı DNA formülasyonlarına dahil edilmesi, *in vitro* (Y. Zhang & Anchordoquy, 2004) ve *in vivo* (Hong, Zheng, Baker, & Papahadjopoulos, 1997) olarak stabilite ve transfeksiyon etkinliğini arttırdığı göstermiştir.

Kol'ün %20 etanol içerisinde seyreltilmiş (h/h), son konsantrasyonu 0.2 mg/mL olan çalışma çözeltisi farklı oranlarda formülasyonlara eklenerek etkisi denenmiştir. Lipooligomer:Kol çözelti oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 (mol/mol) olacak şekilde pDNA ile kompleks formülasyonları oluşturulmuştur.

Tween 80 İlavesi

Tween 80, hidrofobik parçacıkları sulu çözeltilerde dağıtmak için kullanılan iyonik olmayan bir yüzey aktif maddedir. Gen terapisi çalışmalarında , yapısında bulunan PEG zincirleri nedeniyle, lipid emülsiyonlar ve lipozomlarla oluşturulan taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon etkinliğini arttırdığına yönelik çalışmalar mevcuttur (del Pozo-Rodríguez et al., 2007).

T80'in HBG (%5 glukoz,pH 7.4) tamponu içerisinde seyreltilmiş (h/h), son konsantrasyonu 1mg/mL olan çalışma çözeltisi farklı oranlarda formülasyonlara eklenerek etkisi denenmiştir. Lipooligomer:T80 çözelti oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 (mol/mol) olacak şekilde pDNA ile kompleks formülasyonları oluşturulmuştur.

Tokoferol İlavesi

Son dönemlerde yapılan çalışmalar, E vitamininin bir türevi olan α -tokoferol'un, katyonik lipidlerle hazırlanan taşıyıcı sistemlerde, iyi biyouyumluluğu nedeniyle hidrofobik kuyruk olarak kullanılmasının transfeksiyon etkinliğini arttırdığını göstermiştir (Kedika & Patri, 2012). D-a-Tokoferol Polietilen Glikol 1000 Süksinat (TPGS), Takrolimus, anti HIV ilacı UC781 ve Penklomedin için çözünürlüğünü ve oral biyoyararlanımı arttırmak için kendiliğinden mikroemülsifiye edici ilaç taşıyıcı sisteminin (SDDS) üretiminde yüzey aktif madde olarak kullanılmıştır (De Smidt, Campanero, & Trocóniz, 2004). Yeni noniyonik yüzey aktif madde olarak, amfipatik özellikler sergilemesi, suda çözünmeyen ilaçlar üzerindeki emülsifiye edici, dispersiyon, jelleştirici ve çözündürücü etkileri nedeniyle yaygın olarak araştırılmaktadır (Guo, Luo, Tan, Otieno, & Zhang, 2013).

TPGS'nin HBG tamponu içerisinde seyreltilmiş (h/h), son konsantrasyonu 1mg/mL olan çalışma çözeltisi farklı oranlarda formülasyonlara eklenerek etkisi denenmiştir. Lipooligomer:TPGS çözelti oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 (mol/mol) olacak şekilde pDNA ile kompleks formülasyonları oluşturulmuştur.

Tablo 5. Lipopleks formülasyonlarına Kol, T80 ve TPGS ilavesi

	Oligomer/Yb. (mol:mol)	Örnek No	Oligo μL	HBG μL	pDNA μL	Kol. μL	T80 μL	TPGS μL
		pDNA	0	10	10	—	—	—
Kol	1:1	K1	1,27	8,17	10	0,56	—	—
	1:2	K2	1,27	7,62	10	1,11	—	—
	1:3	K3	1,27	7,06	10	1,67	—	—
	1:4	K4	1,27	6,51	10	2,22	—	—
	1:5	K5	1,27	5,95	10	2,78	—	—
T80	1:1	T1	1,27	8,35	10	—	0,38	—
	1:2	T2	1,27	7,98	10	—	0,75	—
	1:3	T3	1,27	7,60	10	—	1,13	—
	1:4	T4	1,27	7,22	10	—	1,51	—
	1:5	T5	1,27	6,85	10	—	1,88	—
TPGS	1:1	TP1	1,27	8,29	10	—	—	0,44
	1:2	TP2	1,27	7,86	10	—	—	0,87
	1:3	TP3	1,27	7,42	10	—	—	1,31
	1:4	TP4	1,27	6,99	10	—	—	1,74
	1:5	TP5	1,27	6,55	10	—	—	2,18

Oligomer/Yb: Oligomer 1451/formülasyona eklenen yardımcı bileşen çözelti oranı (mol:mol); K: Kolesterol çözeltisi ile hazırlanan lipopleks formülasyonları; T: Tween80 çözeltisi ile hazırlanan lipopleks formülasyonları; TP: Tokoferol polietilen çözeltisi ile hazırlanan lipopleks formülasyonları

Optimum pDNA/ lipooligomer oranının saptanmasında ve lipooligomer ile yapılan çeşitli formülasyonların pDNA ile kompleksleşme kabiliyetlerinin belirlenmesinde agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Hazırlanan kompleksler bölüm 3.2.1.3’de anlatıldığı üzere % 0.8’lik (a/h) konsantrasyondaki agaroz jel elektroforez yöntemiyle incelenmiştir. Kompleks oluşumu için 45 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra komplekslerden 20 μl alınarak % 0.8’lik agaroz jele uygulanmıştır.

Elektroforez işlemi 100 V akımda 30 dakikada tamamlanmıştır. pDNA, 500 ng/mL Etidyum Bromür ile boyanarak UV ışığı altında gözlemlenmiş ve jel görüntüsü dijital kamera ile kaydedilmiştir (Syngene/ Synoptics Ltd., İngiltere).

3.2.3. Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.3.1. Partikül boyutu, Polidispersite indeksi (PDI), Zeta Potansiyel (ZP) Değerlerinin Ölçülmesi

Lipooligomer 1451 ile bölüm 3.2.2.1’de anlatıldığı şekilde lipopleksler hazırlanmıştır. N/P6 oranı korunarak ölçek büyütme yapılmıştır. Bu orandaki tüm hacimler 2.5 ile çarpılarak 500 ng DNA içeren 50 µL formülasyon örnekleri hazırlanmıştır. Partikül büyüklüğü (hidrodinamik çap), zeta potansiyel ve polidispersite indeksleri (PDI) Dinamik ışık saçılımı (DLS, *Dynamic Light Scattering*) analiz yöntemi kullanılarak Zetasizer NanoZS cihazı (Malvern Panalytical, İngiltere) ile ölçülmüştür. Ölçümler cihaz sıcaklığı 25 °C, ışık saçılım açısı 173° olacak şekilde ayarlanarak yapılmıştır. Parçacık büyüklüğü ölçümü için, 50 µL hacimde hazırlanan örnekler 45 dk. inkübasyonun ardından, 75 µL HBG tamponu (5% glukoz içeren (a/h) , 20 mM HEPES tamponu; pH 7.4) ile seyreltilerek son hacmi 120 µL olacak şekilde, zeta kapiler kuvvet içerisinde ölçülmüştür. Daha sonra kompleks süspansiyonu, zeta potansiyel ölçümü için HBG tamponu ile 800 µl'ye seyreltilmiştir. Ölçüm aynı cihazın elektroforetik mobilite ölçüm modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HBG tamponu ile ölçümler için refraktif indeks (RI) 1.337 ve viskozite (cP) 1.0366 değerleri seçilmiştir (Loy et al., 2019) . Her örneğin ölçümü 3 tekrarlı olarak yapılmış olup, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümlerinden elde edilen bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

3.2.3.2. Kompleks Stabilitesi Çalışmaları

3.2.3.2.1. Lipoplekslerin Anyonik Strese Karşı Dayanıklılığının İncelenmesi

Hazırlanan lipoplekslerin hücrelerde etkinlik gösterebilmesi için serum bileşenlerine maruz kaldıklarında oluşan anyonik strese karşı dayanıklı olabilmeleri gerekmektedir. Heparinin serum bileşiminde bulunması ve doğal polianyonik bir yapıda olması nedeniyle kompleks dayanıklılığı heparin ile yer değiştirme yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (Nugent, Forsten-Williams, Karnovsky, & Edelman, 2005). Yöntem 3.2.2.1.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan 20 µL lipopleks formülasyonları 45 dk. inkübasyonun ardından, lipooligomer içermeyip sadece pDNA içeren kontrol pozitif dışındaki tüm örneklerle, son konsantrasyon 5 IU/ mL olacak şekilde 2 µL heparin çözeltisi eklenerek 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnekler %0,8'lik agaroz jelde 1 saat süre ile 100 V'da elektroforeze tabi tutulmuştur. Kullanılan elektroforez kiti bir önceki jel deneyde kullanılan Mygel Mini Kit'ten farklı olduğu için elektroforez süresi 1 saate uzatılmıştır. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme yöntem 3.2.1.3. 'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Heparinin lipopolipeksler üzerindeki anyonik strese dayanıklılığın incelenmesi için ayrıca spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Oligomerler normal pH'ta pDNA ile kompleks yapılarını oluşturmaktadır. Lipopleks oluşumunda DNA'nın verdiği floresans değerinden interkale halde olan Etidyum Bromür'ün çıkarılması yöntemi, oligomerlerin pDNA'yı bağlama potansiyelini incelemek için kullanılmıştır (Kuhn et al., 2020a). Heparin ise pDNA içeren lipoplekslere eklenerek, anyonik stres varlığında komplekslerin pDNA'yı tutabilme kapasitesini incelemek için kullanılmıştır.. Yöntem 3.2.2.1.'de anlatıldığı şekilde, pDNA/oligomer kompleksleri T80 ve TPGS'in 1:3, 1:4, 1:5 (mol/mol) oranları ile 3 tekrarlı olacak şekilde lipopleks formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerle 45 dk. inkübasyon sonrasında, toksik Etidyum Bromür'ün yerine kullanılması için geliştirilmiş olan, yeni nesil bir nükleik asit boyası SafeView (Applied Biological Materials (abm) Inc., Kanada) HBG tamponu ile 1/100 (h/h) oranında seyreltilerek eklenmiştir.

Örnekler 96 kuyucuklu siyah plakaya aktarılmış, λ_{ex} 490 nm ve λ_{em} 520 nm ayarlanarak multiplaka okuyucu cihaz ile ölçüm yapılmıştır (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, ABD.).

Kör olarak HBG kullanılmıştır. SafeView eklenen ve sadece pDNA içeren örneklerin floresansı % 100 olarak kabul edilmiştir. Siyah plaka kullanılmasının nedeni, plakada çevre kuyucuklardan yansıyan ışığın floresan vermesinin önüne geçilmesidir. Ölçümün ardından örnekler sırayla 5 IU, 10 IU, 15 IU heparin eklenerek her heparin eklendikten sonra tekrar ölçüm yapılmıştır. (Lächelt et al., 2014b)

- Floresans ölçümü (Heparin yok)
- 5 μ L 100 IU Heparin eklenir ve floresans tekrar ölçülür (5 IU/ örn heparin)
- 5 μ L 100 IU Heparin eklenir ve floresans tekrar ölçülür (10 IU/ örn heparin)
- 5 μ L 100 IU Heparin eklenir ve floresans tekrar ölçülür (15 IU/ örn heparin)

3.2.3.2.2. Serum Stabilité Analizleri

Taşıyıcı sistemlerin hücrelerde etkinliğini sağlayan önemli faktörlerden biri serum bileşenlerine karşı dayanıklılık sergilemesidir. Çıplak pDNA ve pDNA/ lipoligomer lipoplekslerine inaktive edilmemiş Fetal Bovin Serum (FBS) ile muamele edilmiştir. Lipopleks formülasyonları N/P 6 oranında yöntem 3.2.2.1.'de anlatıldığı üzere, 2. sa ve 24. sa kontrolleri yapılmak üzere her formülasyondan 2'şer örnek olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. Çıplak pDNA örneklerinden bir tanesi FBS eklenmeden kontrol negatif (C-), diğeri ise FBS ile müamele edilerek kontrol pozitif (C+) olarak hazırlanmıştır. Formülasyonlar 45 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Örnek tüplerine toplam hacimdeki FBS konsantrasyonu %10 (h/h) olacak şekilde 2 μ L FBS eklenmiştir. 37° sıcak su banyosunda 2. sa. ve 24. sa. kontrolleri yapılmak üzere iki ayrı grup olarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürelerinin tamamlanmasından 30 dk. önce nükleaz reaksiyonunu durdurmak için proteinaz k son konsantrasyonu 200 μ g/mL (İnvitrogen, Thermo FisherScientific, ABD) ve pDNA'nın kompleksten ayrılarak serbest hale geçmesini sağlamak için % 10 stok SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) çözeltisinden toplam hacimdeki SDS oranı %1 (h/h) olacak şekilde eklenmiştir.

Serum stabilite için kullanılan çözelti bileşenleri ve miktarları tablo 6’da verilmiştir. Son hacmi 25 eşitlemek için; FBS veya diğer çözeltileri içermeyen örnekler, bunların yerine hacim tamamlaması amacıyla HBG eklenmiştir. Santrifüjlenen örnekler 64 ° C sıcak su banyosunda 40 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde proteinaz k aktivitesini durdurmak için örnekler 2 dk. buz içinde tutulmuştur. %0,8’lik agaroz jelde 1 saat süre ile 100 V’da elektroforez uygulanmıştır. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme yöntem 3.2.1.1.2.’ de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Tablo 6. Serum stabilite için kullanılan çözelti bileşenleri ve miktarları

Çözelti Bileşenleri	Alınan Hacim (µL)
FBS son konsantrasyon %10 (h/h)	2
SDS %10 stok çözeltisi son konsantrasyon %1 (h/h)	2,5
Proteinaz k son konsantrasyon 200 µg/mL	2,5

3.2.3.2.3. DNaz-I Nukleaz Stabilite Analizi

Komplekslerin DNaz-I enziminin varlığında pDNA’yı koruma kapasitesini incelemek için çıplak pDNA ve pDNA/lipo-oligomerler komplekslerine DNaz-I enzimi ile muamele edilmiştir. N/P 6 oranında lipopleks formülasyonları yöntem 3.2.2.1.’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Lipooligomer içermeyen pDNA örneklerinden bir tanesi DNaz-I ile müdahale edilmeyerek kontrol negatif (C-), diğeri ise DNaz-I ile müdahale edilerek kontrol pozitif (C+) olarak hazırlanmıştır.

Bu komplekslere 2,5 µg DNA için 1 IU DNaz-I enzimi olacak şekilde; formülasyon içeriğinde bulunan her 0,2 µg DNA’ya karşılık 10X Reaksiyon tamponu içerisinde 0,08 IU DNaz-I (New England Biolabs Inc., ABD) enzimi kullanılmıştır. Hesaplamalar sonucu örnek tüplerine 2,26 µL DNaz I enzimi eklenip, 37 °C’de 30 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası toplam hacimdeki SDS konsantrasyonu %1 (h/h) olacak şekilde %10’luk stok SDS çözeltisinden 2,5 µL

eklenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DNaz-I aktivitesini inhibe etmek amacıyla formülasyon çözeltisine 0.5M stok EDTA (pH 8,0) çözeltisinden son hacimde 5 mM olacak şekilde 0,25 µL eklenerek 15 dakika 65 °C’de su banyosunda inkübe edilmiştir. Son hacmi 20 µL eşitlemek için; DNaz I veya diğer çözeltileri içermeyen örneklere, bunların yerine geçmesi amacıyla HBG ile hacim tamamlanmıştır. DNaz-I nukleaz stabilite için kullanılan çözeltiler ve miktarları tablo 7’de verilmiştir. %0,8’lik agaroz jelde 1 saat süre ile 100 V’da elektroforez uygulanmıştır. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme yöntem 3.2.1.1.2. ‘de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Tablo 7. DNaz-I nukleaz stabilite için kullanılan çözeltiler ve miktarları

Çözelti Bileşenleri	Alınan Hacim (µL)
DNaz I enzimi	2,26
SDS %10 stok çözeltisi son konsantrasyon %1 (h/h)	2,5
5 M EDTA son konsantrasyon 5 mM	0.25

3.2.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.4.1. Hücre Kültürü Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi Çalışmaları

In vitro transfeksiyon çalışmaları; H1299 insan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hücre hattında (AATC kodu: CRL-5803), hücre devamlılığı çalışmalarında T-75 cm² hücre kültürü şişeleri ile 24 ve/veya 96 kuyucuklu kültür plakaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre pasajları ve hücre kültürünün devamlılığının sağlanması çalışmalarında, ısı ile inaktive edilmiş % 10 fetal bovin serum (FBS), 100 mM L-glutamin ve % 1 streptomisin/penisilin (Penisilin 100 U/ml, Streptomisin 100 µg/ml) antibiyotik çözeltisi eklenerek steril RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır.

Pasajlama işlemi hücrelerin hücre doluluk oranı yaklaşık %90 olduğunda yapılmıştır. Pasajlama için, besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin yüzeyden ve birbirinden ayrılmasını sağlamak için kalan hücre tabakası 10 ml steril PBS (pH 7.4) tamponu ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 500 µl tripsin:EDTA ilave edilmiş, 37° C’de inkübatörde 2-3 dakika kadar bekletilerek, kültür şişesine tutunmuş haldeki hücrelerin tamamen kalkması sağlanmıştır. Hücrelerin tamamen kalktığı invert ışık mikroskobu ile kontrol edilmiştir. Tripsinizasyonu sonlandırmak için, 10 mL serum içeren taze besiyeri hücreler üzerine eklenmiş ve hücreler pipet yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücreler yoğunluğuna göre seyreltilerek yeni kültür kabındaki besiyerinin üzerine yavaşça ilave edilmiş ve büyümeleri için % 5 CO₂ ve % 98 nem içeren 37° C’lik inkübatörde inkübe edilmiştir.

Transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere hücreler tek tabaka halinde büyütülmüştür. Hücre ekimi, pasajlama işleminde anlatılan şekilde yapılmış, tripsinize edilen hücrelerin üzerine 8 ml besiyeri eklenmiş ve 1200 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant atılmış ve çökelti halindeki pellet hücreler, 5 ml besiyeri içerisinde tekrardan süspande edilmiştir. Steril bir tüpe 100 µl hücre süspansiyonu, 200 µl besiyeri ve 100µl % 0.4’ lük tripan mavisi çözeltisi konularak, dilüsyon faktörü: 4 olacak şekilde Thoma lamı ile hücre sayımı yapılmıştır.

Thoma lamında görüntülenen canlı ve ölü hücreler sayılarak ortalama hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücre sayısı için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Ortalama hücre sayısı

Hücre sayısı/ml= ————— x (dilüsyon faktörü)

10⁻⁴

96- kuyucuklu hücre kültürü plaklarına;her bir kuyucuğa 3x10³ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler bir gece 37° C’lik CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

3.2.4.2. Floresan Mikroskop ile GFP Transfeksiyonunun Değerlendirilmesi

GFP transfeksiyonunun değerlendirilmesi H1299 hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Yöntem 3.2.5.1 'de anlatıldığı üzere 3×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilmiştir. 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bittikten sonra eski besiyeri uzaklaştırılmış 80 μL taze besiyeri eklenerek 30 dakika tekrar inkübatöre konulmuştur. Komplekslerin hazırlanması hücrelere uygulamadan hemen önce gerçekleştirilmiştir. Yöntem 3.2.2.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan 20 μL lipopleks örnekleri besiyeri içeren kuyucuklara 3 tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir ve ardından 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bittikten sonra hücreler floresan mikroskobu (Leica Microsystems, Almanya) altında GFP filtresi kullanılarak incelenmiştir.

3.2.4.3. Lipoplekslerin Sitotoksitesite Analizi

Lipooligomer 1451, kullanılan yardımcı bileşenler (T80 ve TPGS) ve farklı yardımcı bileşenlerin farklı oranlarıyla hazırlanan lipoplekslerin sitotoksitesini analiz etmek için canlılık ölçümleri yapılmıştır. Bu deney için Resazurin kullanılmıştır. Resazurin (Alamar Blue) floresan bir boyadır. Metabolik olarak parçalanma sırasında, yüksek floresan ürünü rezorufin oluşur. Resazurin testi, bakteri ve memeli hücrelerinin canlılığını araştırmak için uygulanan bir yöntemdir.

Yardımcı bileşenler olarak T80 ve TPGS; Oligomer:T80 ve Oligomer:TPGS; Lipopleks:T80 ve Lipopleks:TPGS (lipopleks içeriğindeki oligomer:yardımcı bileşen oranı 1:1; 1:2; 1:3 (mol/mol)) ve yardımcı bileşen içermeyen lipopleks (1:0 (mol/mol)) komplekslerinin hücrelerdeki sitotoksitesinin değerlendirilmesi H1299 hücreleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Yöntem 3.2.2.1 'de anlatıldığı üzere kuyucuk başına 3×10^3 hücre olacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilmiştir. 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bittikten sonra eski besiyeri uzaklaştırılmış 80 μL taze besiyeri eklenerek 30 dakika, 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörüne konulmuştur.

Yöntem 3.2.2.1’de belirtildiği üzere, tablo 8’de verilen formülasyon içeriklerine göre hazırlanan kompleks örnekleri, 96 kuyucuklu plakaya 20 µL ve 3 tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. Multiplakada absorbans değeri ölçülecek olan kuyucukların ölçümünde, besiyeri kör olarak kullanılmak üzere son sütundaki kuyucuklara konulmuş ve hiçbir işlem yapılmamıştır. 48 saat inkübasyonun ardından, %2 resazurin (a/h) stoksolüsyonu PBS ile % 0.015’ e seyreltilmiş ve her kuyucuğa 20 µL eklenerek, 37°C’de %5 CO₂ ‘li inkübatörde 4 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Varioskan Flash Multiplaka okuyucu ile absorbans değerleri 570 nm’de (A₅₇₀) ve floresansı λ_{Ex} 560 nm ve λ_{em} 590 nm’de 3 tekrarlı olacak şekilde 48. ve 72. saatte ölçülmüştür. Besiyeri içeren kuyucuklar blank (kör) olarak kullanılmıştır. Net absorbans değeri HBG’ye göre yüzde olarak hücre canlılığı ile ifade edilmiştir (HBG hücre canlılığı %100 kabul edilmiştir).

Tablo 8. Hücre canlılığı analizi için hazırlanan formülasyon içerikleri

No	1451* (µL)	HBG (µL)	T80 (µL)	TPGS (µL)	pDNA** (µL)
1	-	63,775	1,225	-	-
2	-	62,55	2,45	-	-
3	-	61,325	3,675	-	-
4	4,1275	59,65	1,225	-	-
5	4,1275	58,4225	2,45	-	-
6	4,1275	57,2	3,675	-	-
7	4,1275	27,15	1,225	-	32,5
8	4,1275	25,925	2,45	-	32,5
9	4,1275	24,6	3,675	-	32,5
10		127,17		1,415	
11		124,14		2,830	
12		121,5		4,245	
13	4,1275	59,4575		1,415	
14	4,1275	58,04		2,830	
15	4,1275	56,6275		4,245	
16	4,1275	26,96	-	1,415	32,5
17	4,1275	25,545	-	2,830	32,5
18	4,1275	24,13	-	4,245	32,5
19 (1:0)	4,1275	28,37	-	-	32,5

HBG ile seyreltilmiş çözelti konsantrasyonları: * 1 mg/mL; ** 20µg/mL

3.2.4.4. Akış Sitometri ile GFP Ekspresyonunun Kantitatif Olarak Ölçülmesi

Lipoplekslerin *in vitro* GFP ekspresyon etkinliğinin incelenmesi H1299 hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrisi, hücrelerin belirli kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak akan bir süspansiyonda hücreleri saymak, incelemek ve analiz etmek gibi eşzamanlı ölçümleri gerçekleştirebilen bir tekniktir. Yöntem 3.2.2.1’de anlatıldığı üzere kuyucuk başına 3×10^3 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekim yapılmıştır. 37°C ‘de %5 CO_2 ’li inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon bittikten sonra eski besiyeri uzaklaştırılmış 400 μL taze besiyeri eklenerek 30 dk., 37°C ‘de %5 CO_2 ‘li inkübatörüne konulmuştur. Yöntem 3.2.2.1.’de anlatıldığı üzere, N/P 6 oranı korunarak ölçek büyütme yapılmıştır. Bu orandaki tüm hacimler 5 ile çarpılarak 1 μg DNA içeren 100 mL formülasyon örnekleri hazırlanmıştır, hazırlanan lipopleksler 45 dk. oda sıcaklığında inkübasyonun ardından kuyucuklara süspande edilerek, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ticari transfeksiyon ajanı Lipofektamin pozitif kontrol olarak, HBG negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Inkübasyon süreleri tamamlandıktan sonra eski ortam uzaklaştırılıp 100 μL PBS ile yıkama yapılmıştır. PBS uzaklaştırıldıktan sonra 50 μL tripsin eklenip 5 dakika 37°C ‘de %5 CO_2 ’li ortamda inkübe edilerek hücrelerin kalkması sağlanmıştır. Hücrelerin kalkmış olduğu mikroskop ile kontrol edildikten sonra 100 μL besiyeri eklenerek karışım tüplere aktarılmıştır. 5 dakika boyunca 5000 rpm’de santrifüj edilerek süpernatantı atılmış, 100 μL PBS eklenerek hafifçe vorteks edilmiştir. Accuri C6 Flow Cytometer (Becton, Dickinson and Company, ABD) cihazında, 488 nm’de uyarılma ve emisyonun 510 nm’desaptanmasıyla ölçüm yapılmıştır. Yeşil floresan özellik gösteren hücrelerin yüzdesi hesaplanmış, uygulama yapılmayan hücrelerin yeşil floresan şiddeti FITC (-) kabul edilmiştir. FITC (+/-) göre akış sitometri grafikleri çizilmiştir. Veriler cihaz protokolüne uygun olarak BD Accuri C6 sitometrik analiz yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.2.4.5. Migrasyon Testi

Migrasyon testi bir hücre tek tabakasında bir “çizik” oluşturmayı, bu çiziyi kapatmak için hücre göçü sırasında görüntülerin, başlangıçta (t_0) ve düzenli aralıklarla yakalanmasını ve görüntülerin hücrelerin göç oranını ölçecek şekilde karşılaştırmayı amaçlar.

10^5 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 24-kuyucuklu plakaya ekilen H1299 hücreleri .%90 doluluk oranına ulaşana kadar inkübe edilmiştir .Tek tabaka hücreler üzerinde, 24-kuyucuklu plakanın kapağı cetvel olarak kullanılmış, 200 μ L’lik pipet ucu yüzeye dik tutularak hücre tabakasında dikey bir çizik oluşturulmuştur. 2 defa PBS ile yıkanarak hücre kalıntıları kuyucuktan uzaklaştırılmıştır. Yöntem 3.2.2.1’de anlatıldığı üzere hazırlanan 100 μ L örnekler, içerisinde 400 μ L besiyeri bulunan kuyucuklara süspande edildikten hemen sonra, 0. dk (t_0) görüntüsü kaydedilmiştir. Çiziyin kapanma oranını belirlemek için 24 ve 48 saatin sonunda plakanın aynı bölgesinden tekrar görüntü alınmıştır. Deneyde kanser hücreleri üzerinde bilinen tümör baskılayıcı özelliği nedeniyle pDNA-mir34 negatif kontrol olarak, tüm deneyler boyunca kontrol pDNA (pKontrol) ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Oluşturulan bu iki grup kompleksler üzerinden çalışılmıştır.

3.2.4.6. İstatistiksel Değerlendirme

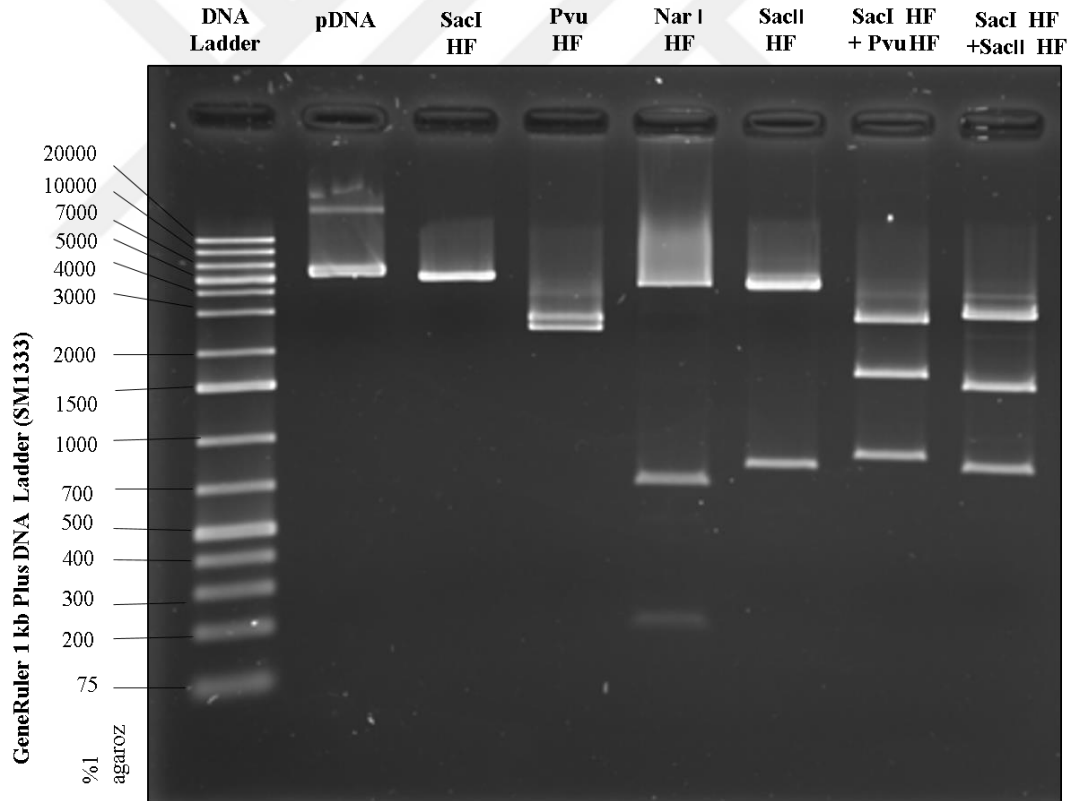
Tez kapsamında veriler 3’er tekrarlı olacak şekilde ortalama $\pm$ standart sapma (SS) şeklinde ifade edilmiş ve grafikler Graphpad Prism 9.0 programı kullanılarak çizilmiştir. İstatistiksel anlamlılık t-test ve ANOVA kullanılarak belirlenmiştir, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. Bulgular

4.1. Genetik Materyalin Karakterizasyonu

4.1.1. pDNA'nın Restriksiyon Enzim Kesimi ile Analizine Yönelik Bulgular

pDNA'nın restriksiyon endonükleaz kesimi 3.2.1.1.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Restriksiyon endonükleazlar ile kesilen örneklerin agaroz jel görüntüsü Şekil 14'de verilmiştir.



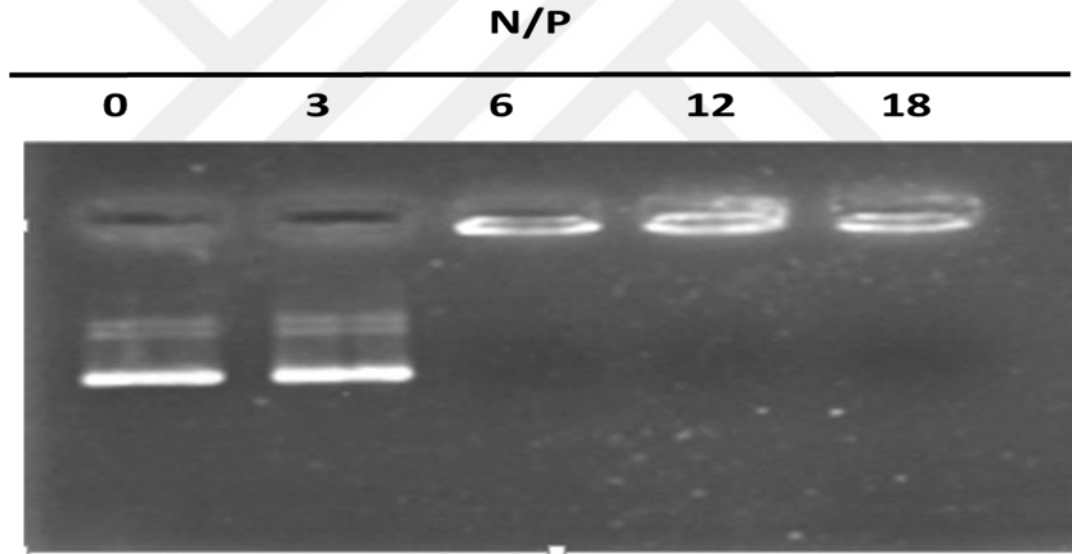
Şekil 13. Restriksiyon enzim kesimi sonrası agaroz jel görüntüsü

%1 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat

Agaroz jel elektroforezi ile pDNA-GFP plazmidinin restriksiyon enzim haritasında yer alan NarI HF, PvuI HF, SacI HF, SacII HF restriksiyon enzimi ile kesilerek oluşacak olan DNA kesim bölgelerini (tablo 3) ve 4942 baz çifti uzunluğunda bir DNA molekülü olduğu doğrulandı.

4.2. Lipopleks Formülasyonlarının Geliştirilmesine İlişkin Bulgular

Lipooligomer 1451/pDNA kompleksleri, yöntem 3.2.2.1’de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Optimum N/P oranını saptayabilmek için; 3, 6, 12, 18 olmak üzere farklı N/P oranı çalışılmıştır. Farklı N/P oranlarında lipooligomer/pDNA kompleksinin agaroz jel görüntüsü şekil 15’ de verilmiştir.



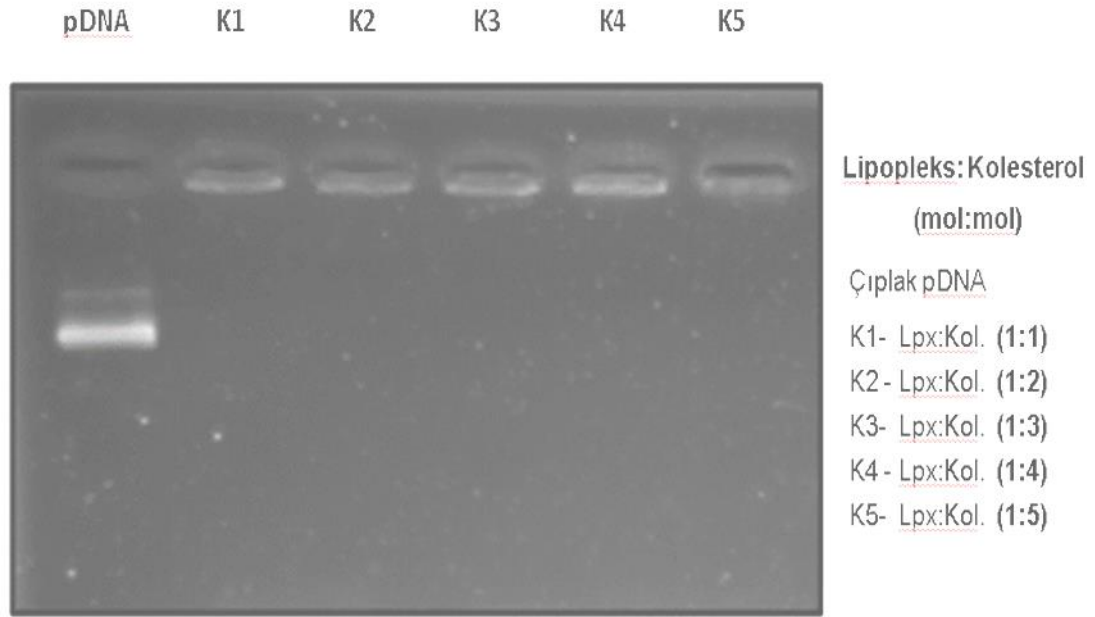
Şekil 14. Farklı N/P oranlarında hazırlanmış lipoplekslerin agaroz jel görüntüsü

%0.8 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat

Lipooligomer/pDNA kompleks oluşumuna dair jel görüntüsü incelendiğinde, N/P 6’dan itibaren 6-18 aralığında, HBG tamponu içerisinde tam bir kompleksleşmenin meydana geldiği gözlemlenmiştir. N/P 6’dan küçük değerlerde, kısmi kompleks oluşumuna bağlı olarak jelde serbest pDNA görülmektedir. N/P 6 optimal oran kabul edilmiş ve tüm çalışmalar boyunca bu oran kullanılmıştır.

4.2.1. Yardımcı Bileşenler Eklenecek Oluşturulan Lipopleks Formülasyonlarının Geliştirilmesine İlişkin Bulgular

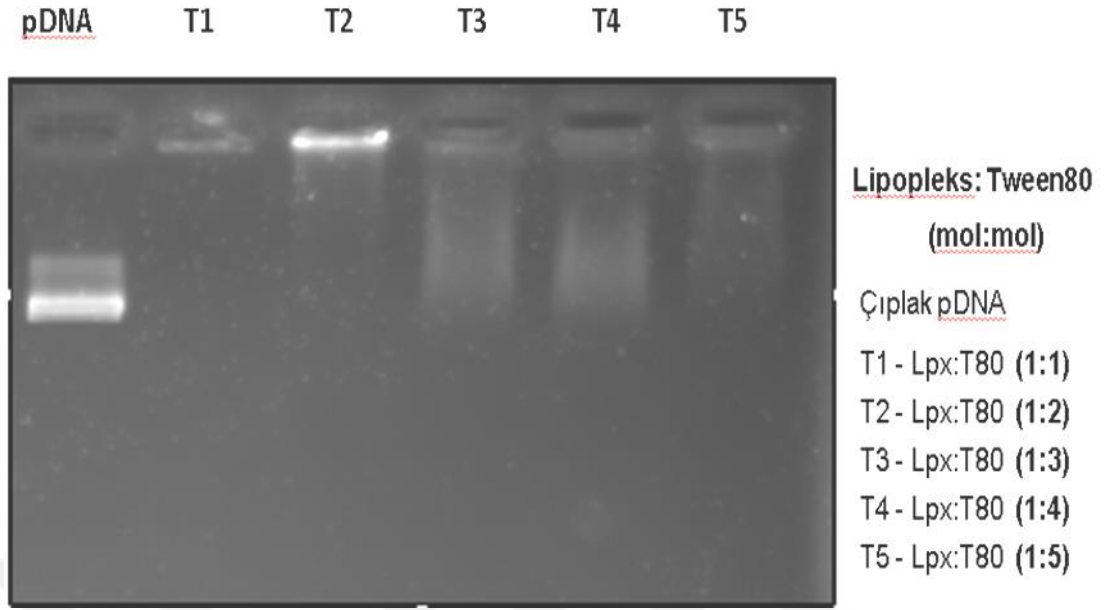
Lipooligomer 1451/ pDNA ile hazırlanan komplekslere, transfeksiyon etkinliğini arttırmak amacıyla T80, Kol. ve TPGS farklı oranlarda eklenerek (mol/mol) yöntem 3.2.2.1’de anlatıldığı üzere hazırlanmıştır. Kompleks oluşumunun agaroz jel görüntüleri şekil 16, 17 ve 18’ de verilmiştir.



Şekil 15. Kolesterol ile farklı mol oranlarında hazırlanan lipooligomer taşıyıcı sistemlerin pDNA ile kompleksleşme agaroz jel görüntüsü

Lpx: Lipopleks; K: Kolesterol ile hazırlanan lipopleks formülasyonları; Lpx:Kol: Lipopleks/ Kolesterol oranı (mol/mol). N/P=6, %0.8 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat

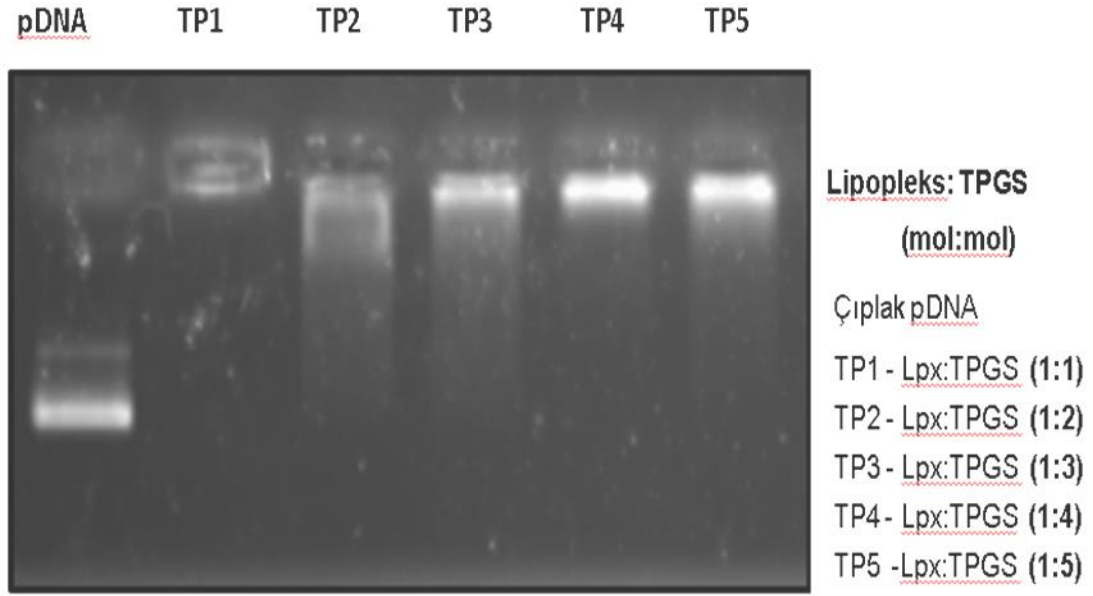
Kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi ile incelenmesinin sonucunda kolesterol ile 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 (mol:mol) oranlarında hazırlanan formülasyonlarda tam kompleks oluşumu gözlemlenmiştir.



Şekil 16. Tween80 ile farklı mol oranlarında hazırlanan lipooligomer taşıyıcı sistemlerin pDNA ile kompleksleşme agaroz jel görüntüsü

T: Tween80 ile hazırlanan lipopleks formülasyonları; Lpx: T80: Lipopleks/Tween80 oranı (mol/mol). N/P=6, %0.8 Agaroz jel, 1X TBE

Kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi ile incelenmesinin sonucunda Tween 80 ile 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 (mol:mol) oranlarında hazırlanan hazırlanan formülasyonlarda, pDNA ile kompleksleşme oranı farklılık göstermiştir. Lpx: T80, 1:1 ve 1:2 (mol:mol) oranlarında tam kompleksleşme göstermiş olup; 1:3, 1:4, 1:5 (mol:mol) oranlarında kısmi kompleksleşme göstermiştir.



Şekil 17. TPGS ile farklı mol oranlarında hazırlanan lipooligomer taşıyıcı sistemlerin pDNA ile kompleksleşme agaroz jel görüntüsü.

TP: TPGS ile hazırlanan lipopleks formülsayonları; Lpx: TPGS: Lipopleks: TPGS oranı (mol/mol). N/P=6, %0.8 Agaroz jel, 1X TBE

Kompleks oluşumunun agaroz jel elektroforezi ile incelenmesinin sonucunda lipopleks:TPGS ile 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 (mol:mol) oranlarında hazırlanan formülasyonlarda, tam kompleksleşme sadece Lpx:TPGS 1:1 (mol:mol) oranında gözlemlenmiş olup; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 (mol:mol) oranlarında kısmi kompleksleşme gözlemlenmiştir.

4.3. Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

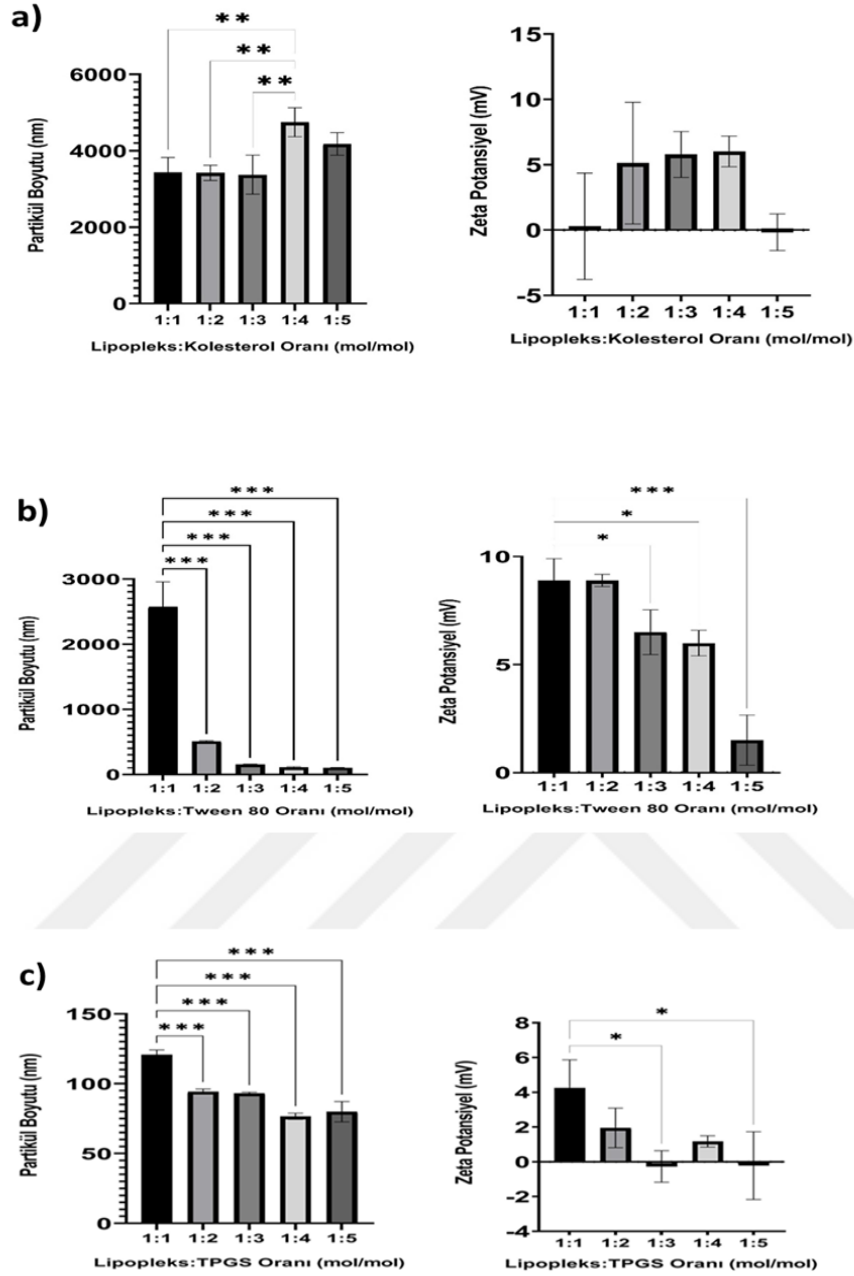
4.3.1. Lipo-oligomer Komplekslerin Partikül Boyutu, Polidispersite İndeks ve Zeta Potansiyel Analizlerine İlişkin Bulgular

Yöntem 3.2.3.1.'de anlatıldığı üzere gerçekleştirilen T80, Kol. ve TPGS yardımcı maddeleri farklı oranlarda eklenerek (mol/mol) hazırlanan lipopleks formülasyonlarının partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçüm değerleri tablo 9' da, grafikleştirilmiş sonuçları ise şekil 19' da verilmiştir.

Tablo 9. Lipopleks formülasyonalarına ait partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçüm değerleri

Örnek	PB (nm) $\pm$ S.S.	PDI $\pm$ S.S.	ZP (mV) $\pm$ S.S.
Lpx(1:0)	3080 $\pm$ 225,7	0,351 $\pm$ 0,066	-0,259 $\pm$ 0,318
Lpx: Kol. (1:1)	3437 $\pm$ 385,9	0,336 $\pm$ 0,046	0,28 $\pm$ 4,07
Lpx: Kol. (1:2)	3422 $\pm$ 199,7	0,435 $\pm$ 0,074	5,12 $\pm$ 4,65
Lpx: Kol. (1:3)	3375 $\pm$ 509,6	0,332 $\pm$ 0,047	5,79 $\pm$ 1,76
Lpx: Kol. (1:4)	4748 $\pm$ 380,3	0,595 $\pm$ 0,135	6,02 $\pm$ 1,18
Lpx: Kol. (1:5)	4180 $\pm$ 298,6	0,417 $\pm$ 0,101	-0,171 $\pm$ 1,4
Lpx: T80 (1:1)	2574 $\pm$ 383,2	0,656 $\pm$ 0,15	8,9 $\pm$ 0,995
Lpx: T80 (1:2)	508,4 $\pm$ 10,11	0,355 $\pm$ 0,046	8,89 $\pm$ 0,28
Lpx: T80 (1:3)	149,3 $\pm$ 6,478	0,189 $\pm$ 0,019	6,5 $\pm$ 1,03
Lpx: T80 (1:4)	112,8 $\pm$ 6,008	0,205 $\pm$ 0,045	5,99 $\pm$ 0,592
Lpx: T80 (1:5)	104,1 $\pm$ 2,479	0,237 $\pm$ 0,006	1,5 $\pm$ 1,17
Lpx: TPGS (1:1)	120,7 $\pm$ 3,443	0,194 $\pm$ 0,048	4,25 $\pm$ 1,62
Lpx: TPGS (1:2)	94,29 $\pm$ 1,85	0,274 $\pm$ 0,042	1,95 $\pm$ 1,14
Lpx: TPGS (1:3)	93,08 $\pm$ 0,806	0,287 $\pm$ 0,018	-0,27 $\pm$ 0,909
Lpx: TPGS (1:4)	76,62 $\pm$ 2,221	0,227 $\pm$ 0,045	1,17 $\pm$ 0,324
Lpx: TPGS (1:5)	79,91 $\pm$ 7,296	0,204 $\pm$ 0,048	-0,219 $\pm$ 1,95

PB: Partikül boyutu, PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyeli. Sonuçlar ortalama $\pm$ SS olarak verilmiştir.



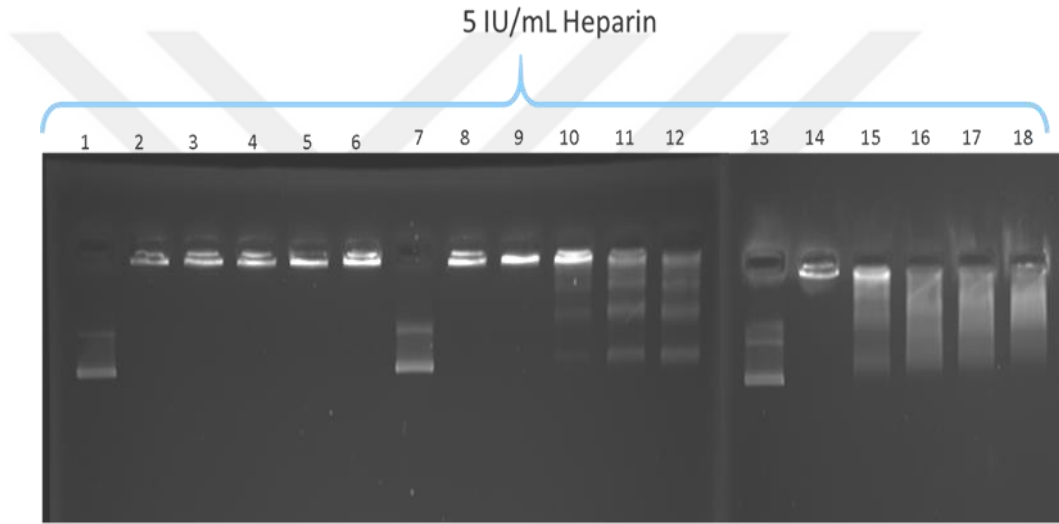
Şekil 18. Kolesterol (a), Tween 80 (b), TPGS (c) ilave edilen kompleks formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm) ve zeta potansiyel (mV) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi

Grafikler DLS analiz verilerini içermektedir. Boyut, PDI, zeta potansiyel ölçümleri için kompleksler HBG tampon (%5 glukoz, pH 7.4) içerisinde hazırlanmıştır. X eksen, lipopleks/yardımcı bileşen (mol:mol) oranını gösterir. Sonuçlar üç ölçümün ortalaması $\pm$ SS olarak verilmiştir. (*: $0.01 < p$ değeri < 0.05 ; **: $0.001 < p$ değeri < 0.01 ; ***: $p < 0.001$)

4.3.2. Lipoplekslerin Stabilit e çalışmalarına ait Bulgular

4.3.2.1. Komplekslerin Anyonik Strese Karşı Dayanıklılığının İncelenmesine Ait Bulgular

Lipopleks formülasyonlarında anyonik strese dayanıklılık çalışmaları, yöntem 3.2.3.2.1’de anlatıldığı üzere gerçekleştirilmiş, jel elektroforezi ve spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Çalışmaya ilişkin agaroz jel görüntüsü şekil 20’de, spektrofotometrik ölçüm sonuçları şekil 21 ve 22 ‘de verilmiştir.



No 1 – pDNA

No 2 – Lpx: Kol. (1:1)

No 3 – Lpx: Kol. (1:2)

No 4 – Lpx: Kol. (1:3)

No 5 – Lpx: Kol. (1:4)

No 6 – Lpx: Kol. (1:5)

No 7 – pDNA

No 8 – Lpx: T80 (1:1)

No 9 – Lpx: T80 (1:2)

No 10 – Lpx: T80 (1:3)

No 11 – Lpx: T80 (1:4)

No 12 – Lpx: T80 (1:5)

No 13 – pDNA

No 14 – Lpx: TPGS (1:1)

No 15 – Lpx: TPGS (1:2)

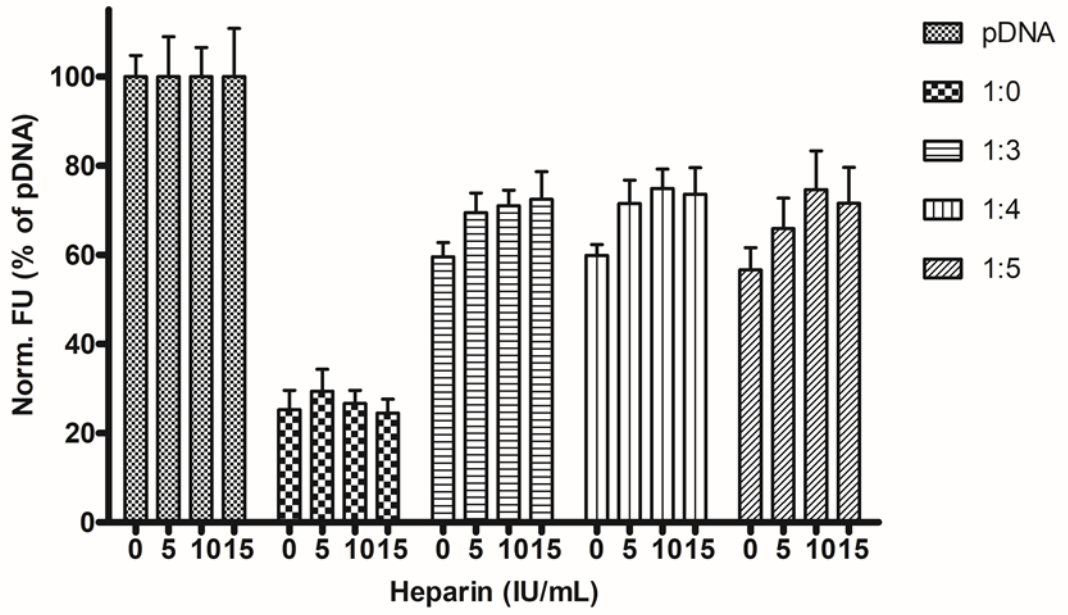
No 16 – Lpx: TPGS (1:3)

No 17 – Lpx: TPGS (1:4)

No 18 – Lpx: TPGS (1:5)

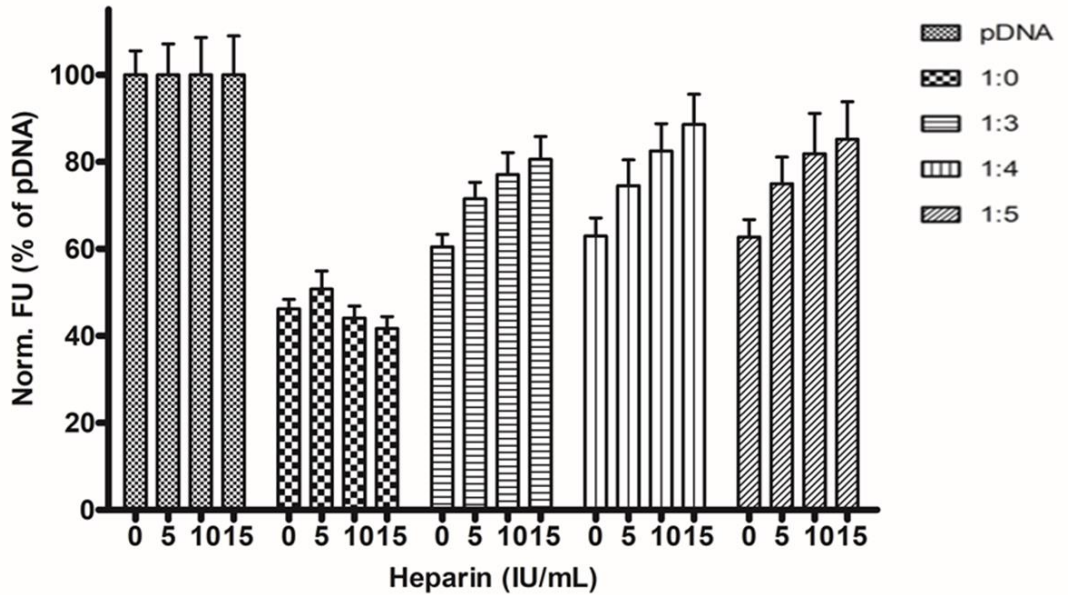
şekil 19. Lipoplekslerin heparin testine ilişkin agaroz jel görüntüsü

N/P=6, %0.8 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat



Şekil 20. T80 ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının 0, 5, 10, 15 IU/mL heparin varlığında normalize edilmiş spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Hücreler, HBG tamponu ile muamele edilmiş hücreler ile kontrol ölçümlerine normalleştirildi.



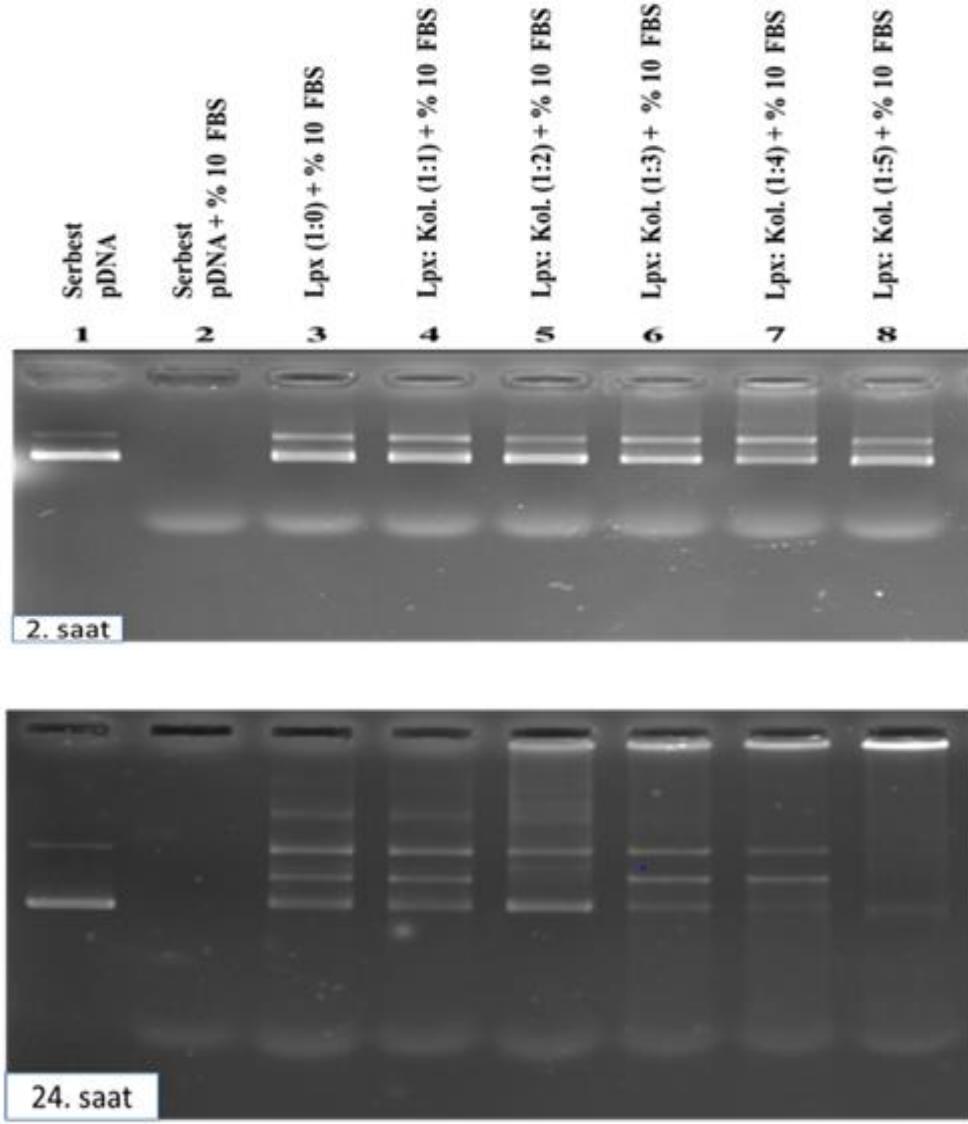
Şekil 21. TPGS ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının 0, 5, 10, 15 IU/mL heparin varlığında normalize edilmiş spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Yüksek miktarda negatif yüke sahip heparin varlığında kolesterol ile oluşturulan lipopleks örnekleri tüm farklı oranlarda kompleks yapısını korurken; T80 ile oluşturulan lipopleksler 1:1 ve 1:2 oranlarında; TPGS ile oluşturulan lipopleksler sadece 1:1 oranında DNA salınmasını önleyerek kompleks yapısını korumuştur. DNA bant profilinin gözlemlendiği örneklerin, heparinin komplekslerin destabilizasyonunu indüklemesi nedeniyle komplekslerden DNA salınmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Heparin ile yer değiştirme çalışmasında, T80 ve TPGS eklenen örneklerde anyonik strese karşı dayanıklı olmadığı tespit edilen 1:3; 1:4; 1:5 oranları spektrometrik ölçümlerle tekrardan test edilmiştir. T80 ve TPGS'in 1:3; 1:4; 1:5 oranlarında DNA'yı anyonik stres ortamında koruyabilme kapasitelerinin düşük olduğu saptanmıştır, agaroz jel elektroforezi ile elde edilen sonuçları doğrulamıştır.

4.3.2.2. Serum Stabilite Analizine İlişkin Bulgular

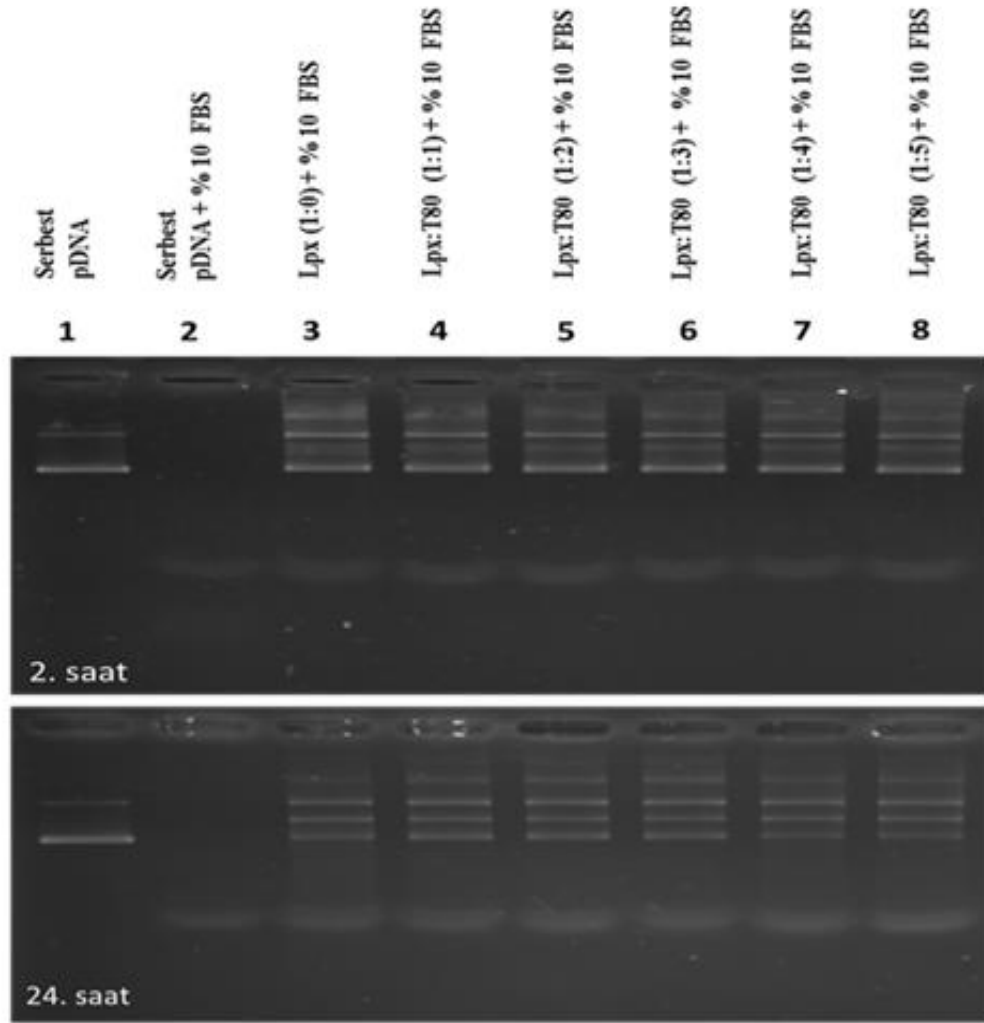
Lipopolipolekslerin serum degradasyonuna karşı stabilitesini belirlemek üzere; yöntem 3.2.3.2.2'de anlatıldığı üzere, serbest pDNA ve kompleks formülasyonları, %10 FBS ile 2 ve 24 sa inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

Serum stabilite analizine ilişkin agaroz jel görüntüleri şekil 23-25'de verilmiştir.



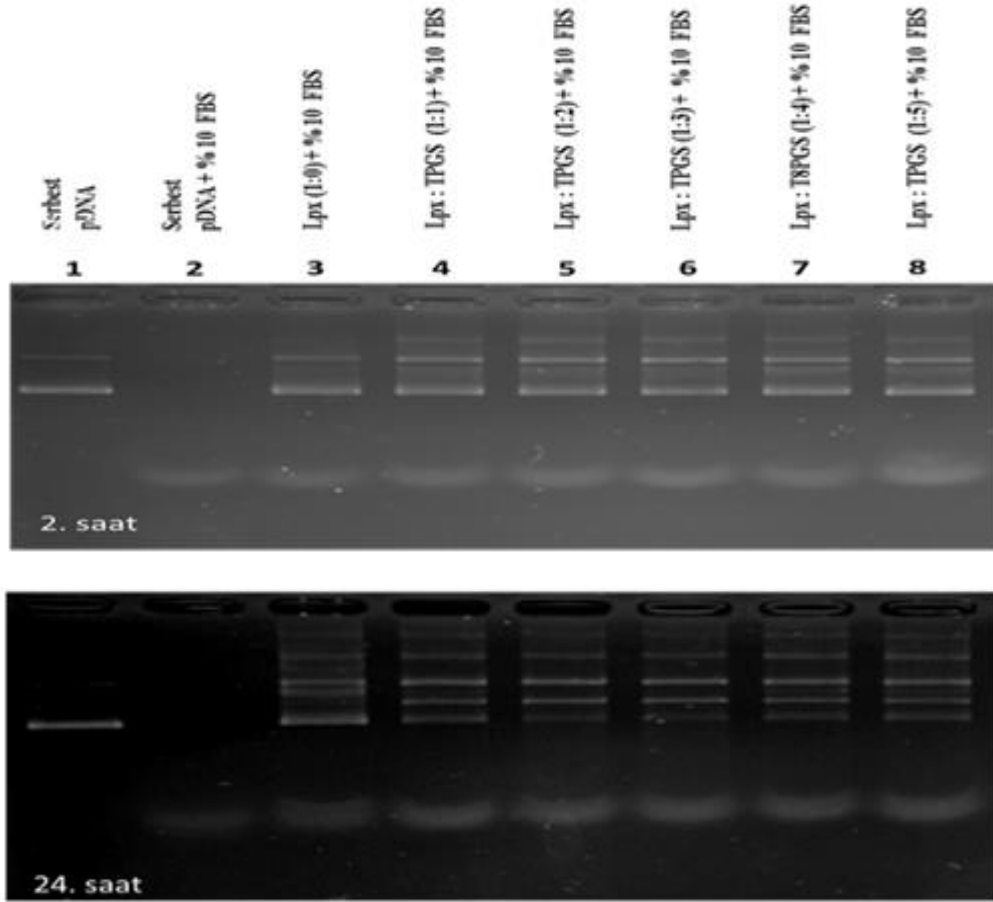
Şekil 22. Kolesterol içeren lipoplekslerin %10 serum içerisinde 2 .ve 24.saat inkübe edilmesinden sonra elde edilen agaroz jel görüntüleri

N/P=6, %0.8 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat



Şekil 23. T80 içeren lipoplekslerin %10 serum içerisinde 2 .ve 24.saat inkübe edilmesinden sonra elde edilen agaroz jel görüntüleri

N/P=6, %0.8 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat



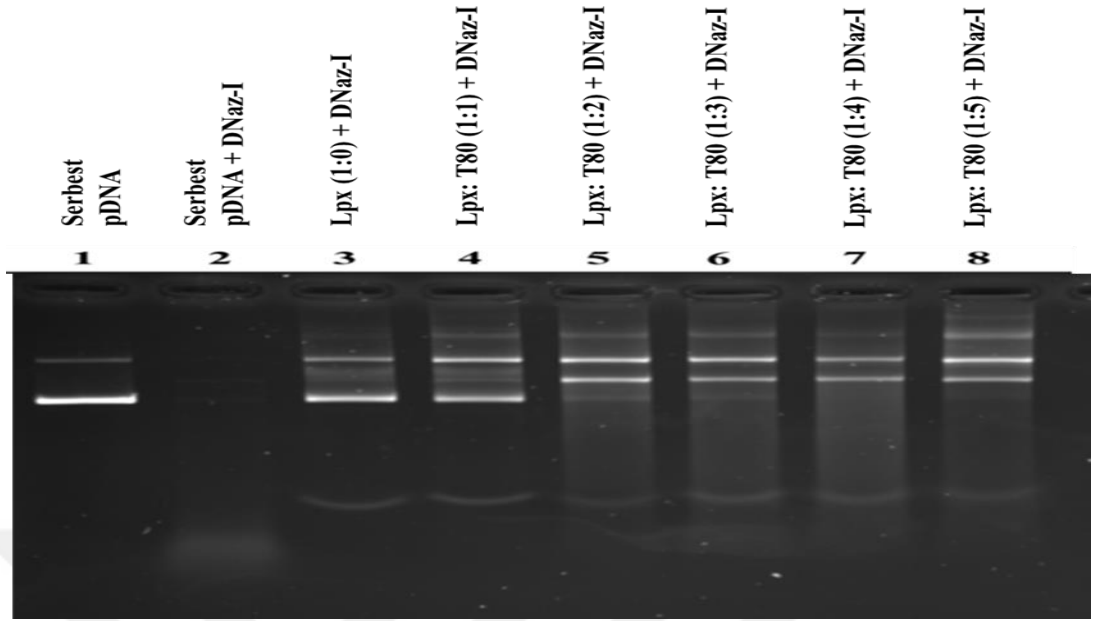
Şekil 24. TPGS içeren lipoplekslerin %10 serum içerisinde 2 .ve 24.saat inkübe edilmesinden sonra elde edilen agaroz jel görüntüleri

N/P=6, %0.8 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat

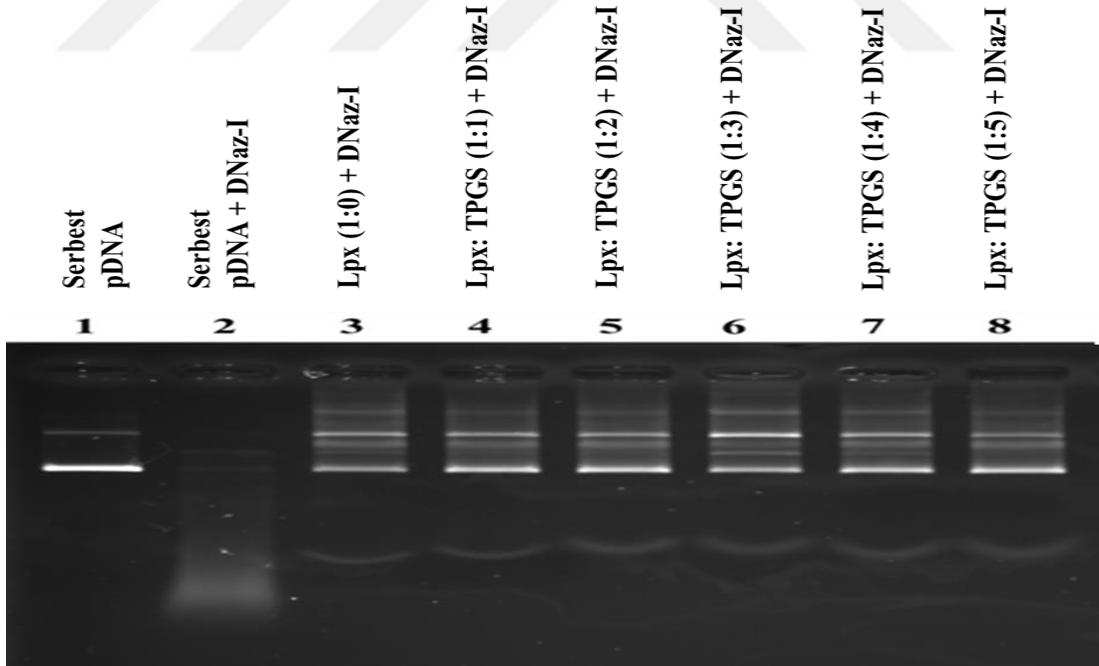
Lipooligomer taşıyıcı sistemlerinin, kolesterol, T80 ve TPGS'in farklı oranları ile (mol:mol) oluşturulan tüm lipopleks örneklerinin,%10 FBS içerisinde 2. ve 24. saat inkübasyondan sonra, serum içerisinde bulunan nükleazların aktivitesine karşı DNA'yı stabil bir şekilde koruyabildiği gözlemlenmiştir.

4.3.2.3. DNaz-I Nükleaz Stabilite Analizine İlişkin Bulgular

Lipopolipolekslerin DNaz-I degradasyonuna karşı stabilitesini belirlemek üzere; yöntem 3.2.3.2.3'de anlatıldığı üzere, T80 ve TPGS ile farklı oranlarda (mol/mol) hazırlanan lipopleks formülasyonları için DNaz-I reaksiyonuna ait agaroz jel görüntüleri şekil 26 ve 27' de verilmiştir



Şekil 25. T80 içeren lipoplekslerin DNaz-I stabilitesine ait agaroz jel görüntüsü
N/P=6. %0.8 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat



Şekil 26. TPGS içeren lipoplekslerin DNaz-I stabilitesine ait agaroz jel görüntüsü
N/P=6. %0.8 Agaroz jel, 1X TBE, 100V/saat

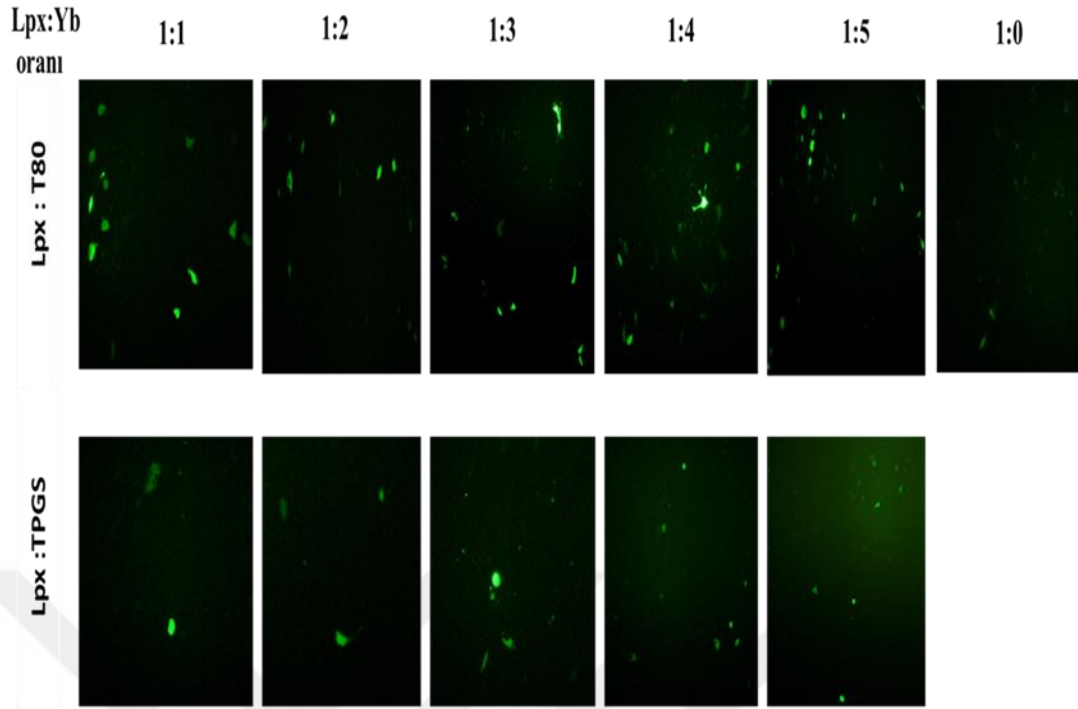
DNaz-I enzimi ile muamele edilmiş aynı konsantrasyondaki çıplak pDNA negatif kontrol olarak, DNaz-I enzimi ile muamele edilmemiş çıplak pDNA pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. pDNA'nın salınmasını sağlamak amacıyla %1'lik SDS kullanılmıştır. EDTA ve SDS'in beraber kullanılması DNaz-I'in denatürasyonuna yol açarak, enzimatik reaksiyonu durdurup DNA'yı kompleksten ayırmaya yöneliktir. DNaz-I enzimi ile muamele edilen çıplak pDNA'nın nükleaz ile tamamen degrade olduğu görülmüştür. T80 ve TPGS ile oluşturulan tüm lipopleks örneklerinin DNaz-I muamelesinden sonra belirgin bant profilleri göstererek stabilitesini korumuş olduğu gözlemlenmiştir.

4.4. Lipoplekslerin *in vitro* Biyolojik Değerlendirmesine İlişkin Bulgular

Lipooligomerin stabil kompleksler oluşturma ve pDNA'yı etkili bir şekilde yoğunlaştırabilme yeteneği, etkili bir hücre alım ve transfeksiyon verimliliği için önemlidir. Karakterizasyon çalışmalarının ardından, optimum N/P oranı 6 olarak belirlenmiş, kolesterol içeren komplekslerin partikül boyutu ölçümleri hücre içersine alım ve transfeksiyon etkinliği için oldukça büyük sonuçlar vermesi nedeniyle *in vitro* çalışmalardan çıkarılmıştır. T80 ve TPGS'in farklı oranlarıyla (mol:mol) hazırlanan ve uygun sonuçlar veren lipoplekslerin *in vitro* biyolojik değerlendirmeleri; transfeksiyon etkinliği, migrasyon ve hücre canlılığı açısından incelenmiştir.

4.4.1. Floresan Mikroskop Yöntemi ile GFP Transfeksiyonun Değerlendirilmesine Yönelik Bulgular

H1299 hücre hattında, pDNA taşıyan komplekslerinin *in vitro* transfeksiyon çalışmaları, yöntem 3.2.4.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. T80 ve TPGS ile hazırlanan farklı oranlarda (mol:mol) lipopleks formülasyonlarının, yeşil floresans proteini ile 48 saat sonra eksprese olmuş hücreler floresans mikroskopta incelenmiştir, çekilen görüntüler şekil 28'de verilmiştir.

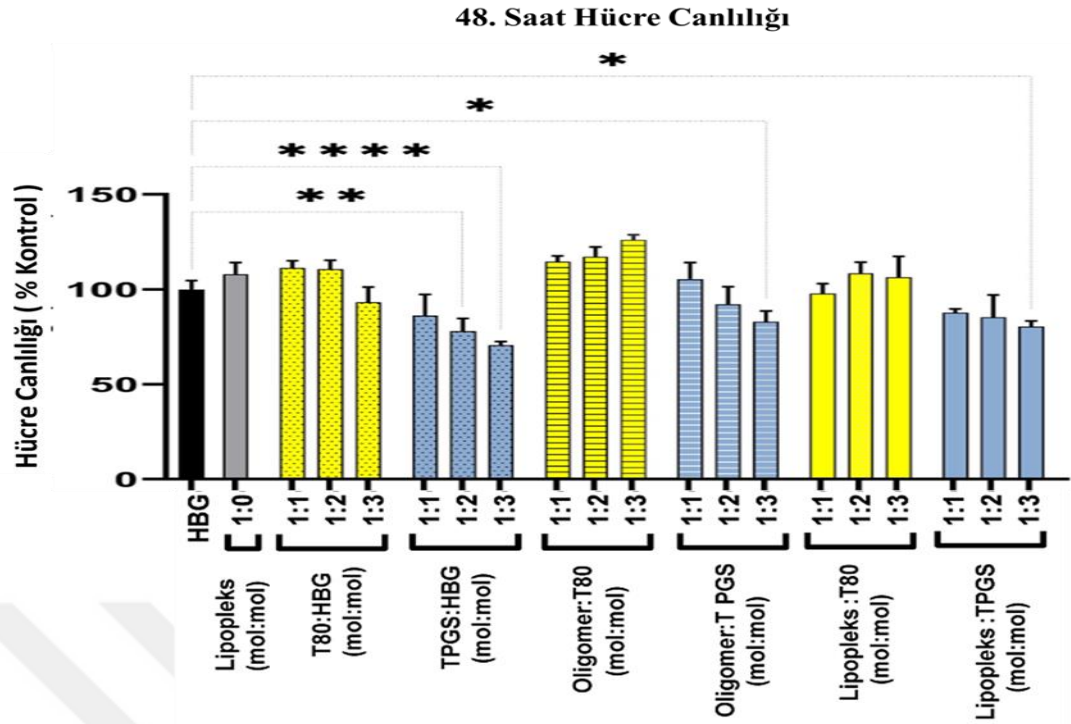


Şekil 27. Lipopleks formülasyonlarının H1299 hücrelerini transfeke etme kabiliyetinin 48. saat floresans mikroskop ile incelenmesi (x10 büyütme)

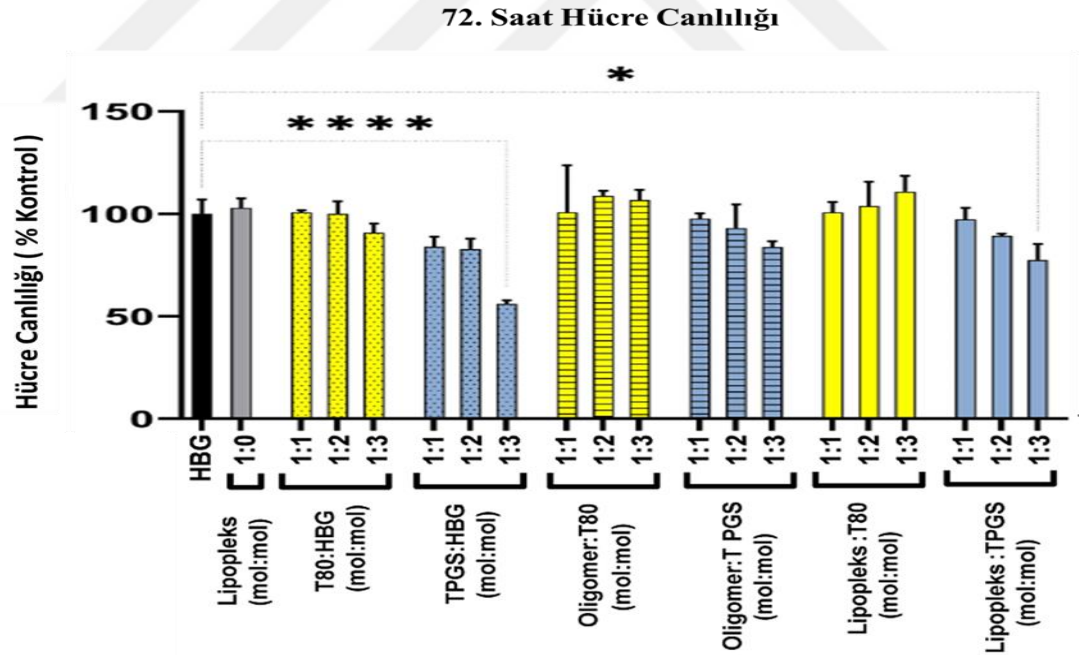
T80 ve TPGS içeren lipoplekslerin in vitro transfeksiyon sonrası hücreye girdiği ve nükleusta lokalize oldukları gözlemlenmiştir. T80 ile hazırlanan lipopleks örneklerinin TPGS ile hazırlanan lipoplekslere göre transfeksiyon etkinliğinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

4.4.2. Hücre Canlılığı Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Lipooligomer 1451'in, optimum N/P 6 oranında hazırlanan lipoplekslerinin ve komplekslere ilave edilen yardımcı maddelerin H1299 hücre hattındaki sitotoksiteleri yöntem 3.2.4.3'de belirtildiği üzere araştırılmıştır. 48. ve 72. saat uygulamara ait canlılık analizi sonuçları şekil 29 ve 30'da verilmiştir.



Şekil 28. H1299 hücre hattında 48. saat formülasyonların uygulamalarına ait hücre canlılığı bulguları



Şekil 29. H1299 hücre hattında 72. saat formülasyonların uygulamalarına ait hücre canlılığı bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

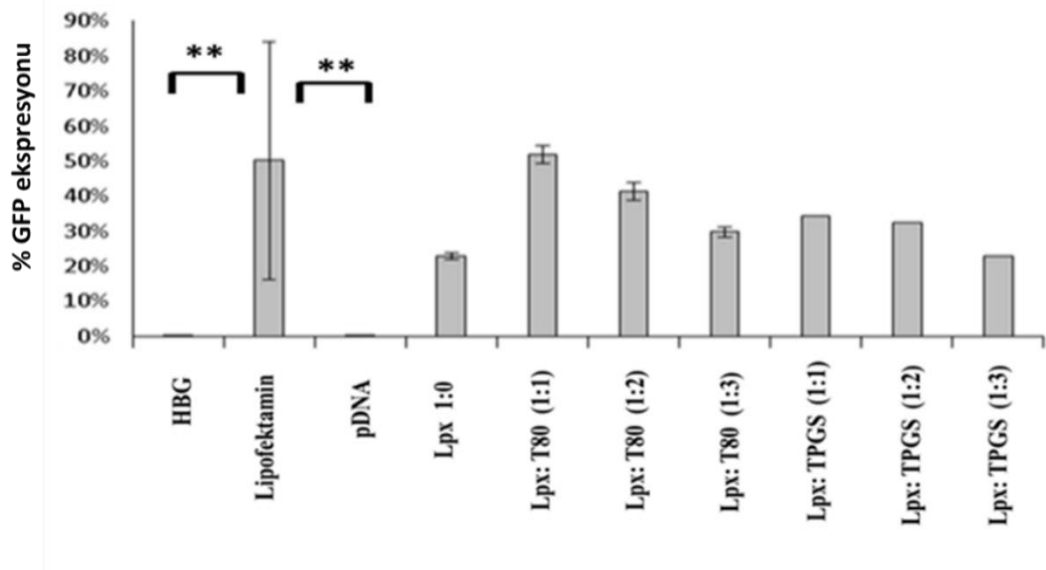
% Hücre canlılığı, bağımsız 3 deney tekrarının HBG kontrole göre ortalaması $\pm SS$ şeklinde ifade edilmiştir (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Hücre canlılığının 24. saat sonuçları incelendiğinde (şekil 29) saf T80 ve T80 içeren tüm formülasyonlar hücreler için sitotoksitite göstermezken; TPGS1:3 oranında tüm formülasyonlarda istatistiksel olarak canlılık yüzdesinde anlamlı bir azalma meydana getirmiştir. En düşük hücre canlılığı TPGS 1:3 oranı için %71'dir.

Yardımcı madde içermeyen lipooligomer:pDNA kompleksi (1:0) hücreler için sitotoksik özellik göstermemektedir. Saf TPGS 1:3 oranı için hücre canlılığı 24. saatte %71 iken, taşıyıcı sistem yapısına dahil edilen TPGS 1:3 için hücre canlılığı canlılığı %80'e çıkmıştır. 72. saat sonuçları incelendiğinde (şekil 30) saf TPGS1:3'ün hücre canlılığı %56; taşıyıcı sistem içeren TPGS 1:3'ün hücre canlılığı %78 'dir. Oligomer içeren tüm kompleks formülasyonlarıyla 24 saatlik inkübasyondan sonra hücre canlılığı %80'nin üzerindeyken, 72 saatlik inkübasyondan sonra % 78'in üzerinde gözlenmiştir. Oligomer içeren kompleks formülasyonları hücre canlılığında sitotoksik etki göstermemiş olup, TPGS'in hücreler için sitotoksik özelliklerini azaltmıştır.

4.4.3. Akış Sitometrisi ile *in vitro* GFP Ekspresyonunun Kantitatif Olarak İncelenmesine İlişkin Bulgular

Hücrelerin GFP ekspresyonunun kantitatif değerlendirilmesi, H1299 hücre hattının lipoplekslerle inkübasyonu sonunda BD Accuri™ C6 (Becton, Dickinson and Company, ABD) flow sitometri cihazı ile yöntem 3.2.4.4'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. FITC kanalında yeşil floresan protein eksprese eden hücrelerin floresans sinyali okunarak transfeksiyon etkinliği hesaplanmış, sonuçlar şekil 31 ve tablo 10'da verilmiştir.



Şekil 30. Lipopleks formülasyonlarının H1299 hücrelerinde GFP ekspresyonunun kantitatif bulguları

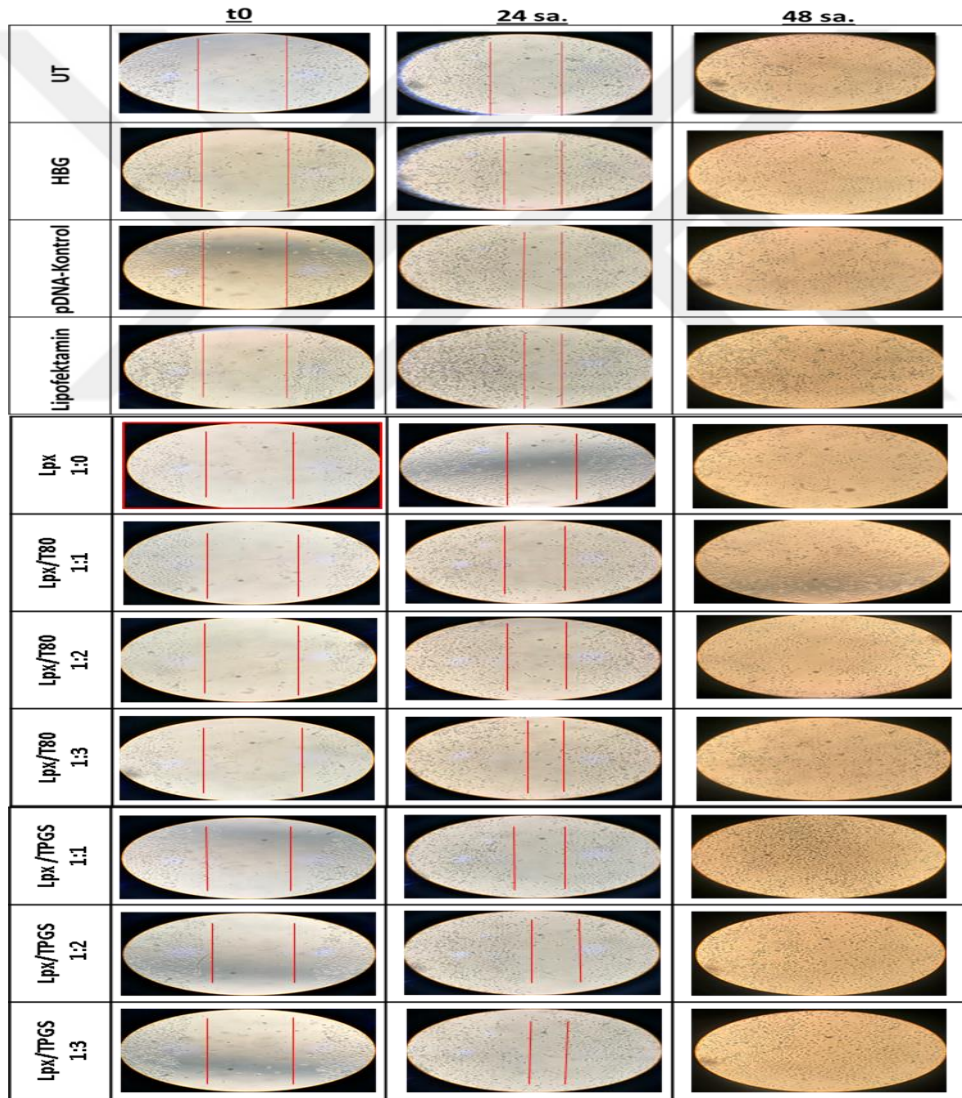
Tablo 10. H1299 hücrelerinde GFP ekspresyonunun istatistiksel analiz sonuçları

Dunnett testi	P değeri	Özet
LPF ve HBG	0.002	**
LPF ve pDNA	0.002	**
LPF ve Lpx 1:0	0.090	ns
LPF ve Lpx:T80 (1:1)	>0.999	ns
LPF ve Lpx:T80 (1:2)	0.902	ns
LPF ve Lpx:T80 (1:3)	0.268	ns
**: 0.001 < p değeri < 0.01 (yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı) ns: p değeri > 0.1 (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır)		

T80 içeren lipopleksler daha yüksek GFP ekspresyonu göstermiştir. T80'in artan oranlarında ekspresyon etkinliğinin düştüğü saptanmıştır ancak kontrol LF' göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

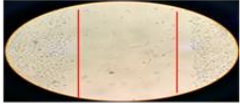
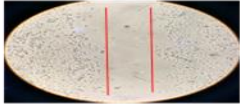
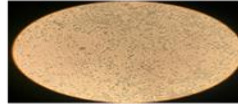
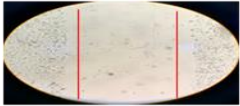
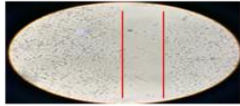
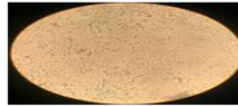
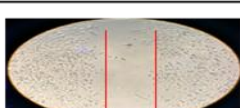
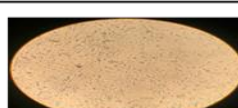
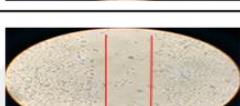
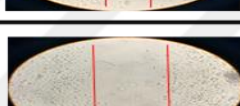
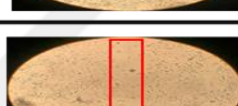
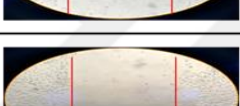
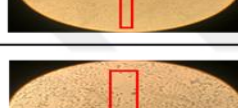
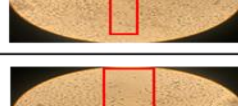
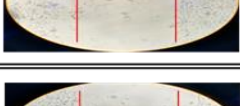
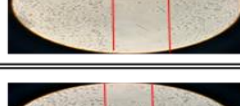
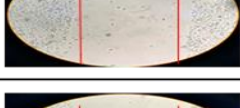
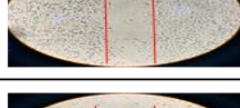
4.4.4. Çizik Testi ile Migrasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

H1299 hücre hattında migrasyon üzerindeki etkinin değerlendirilmesi yöntem 3.2.4.5.'de belirtildiği üzere çizik tayini ile gerçekleştirilmiştir. Çizikler oluşturduktan sonra lipopleks formülasyonları uygulanmış ve görüntüleri kaydedilmiştir (t0); daha sonra bu görüntüler 24. ve 48. saatte kaydedilen görüntüler ile karşılaştırılarak migrasyon değerlendirilmiştir. Migrasyon değerlendirilmesine ait mikroskop görüntüleri şekil 32 ve 33'de verilmiştir.



Şekil 31. Kontrol pDNA ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının H1299 hücrelerinin migrasyonun görüntüleri (x10)

Çizik deneyi kullanılarak hücre göç yeteneklerinin tespiti. Hücreler 10 uL pipet ucu kullanılarak çizildi ve yara genişlikleri çizikten 0, 24 ve 48 saatte kaydedildi. Kırmızı çizgiler t0 anından itibaren migrasyon alanını tayin edebilmek için çizilmiştir.

	<u>t0</u>	<u>24 sa.</u>	<u>48 sa.</u>
UT			
HBG			
pDNA-miR34a			
Lipofektamin			
Lpx 1:0			
Lpx/T80 1:1			
Lpx/T80 1:2			
Lpx/T80 1:3			
Lpx/TPGS 1:1			
Lpx/TPGS 1:2			
Lpx/TPGS 1:3			

Şekil 32. pDNA-miR34a ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının H1299 hücrelerinin migrasyonuna etkisi (x10)

Şekillerde görüldüğü gibi kontrol pDNA içeren komplekslerle yapılan uygulamalarda 24 saat inkübasyondan sonra çizik kapanma oranı, uygulama yapılmamış (UT) ve tampon uygulanmış (HBG) örneklerle benzer orandadır.

48 saat sonra çiziklerin tamamen kapandığı görülmüştür (Şekil 32). miR-34a kodlayan pDNA içeren komplekslerle yapılan uygulamalarda ise 24 saat inkübasyondan sonra çizik kapanma oranı UT ve HBG gruplarından daha düşük olduğu ve 48 saat inkübasyondan sonra, yardımcı lipid içermeyen ve T80 içeren komplekslerde çiziklerin hala tamamen kapanmadığı görülmüştür (Şekil 33). Bu bulgu, literatürde (Huang, Wang, Chen, Han, & Li, 2021) belirtilen miR-34a'nın kanser hücrelerinin migrasyonu üzerine etkisi ile uyuşmakta olup, hazırlanan komplekslerin etkili bir şekilde pDNA'yı hücrelere taşıdığını ve miR-34a ekspresyonu sonucunda H1299 hücrelerinin migrasyon oranında azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

5. Tartışma

Gen terapisinde nükleik asit temelli tedaviler, genetik bozukluklar ve kanser de dahil olmak üzere ciddi hastalıkların tedavisi için büyük fırsatlar sunmaktadır. Ancak nükleik asitler hidrofilik yapıları, büyük molekül ağırlıkları, negatif yükleri ve biyolojik sıvılardaki nükleazlara karşı düşük stabiliteyi nedeniyle vücuda verildiğinde sınırlı biyolojik aktivite göstermektedir. Bu sorunun aşılabilmesi için biyodağılılabilir, toksisite göstermeyen, fizyolojik bariyerleri geçecek büyüklükte (Alexis et al., 2008), spesifik hücrelere bağlanabilen (Y. Wang & Wagner, 2020), hem vücut sıvıları ile hem de retikuloendotel sistem (RES) gibi dokular ve hücreler ile spesifik olmayan etkileşimler (Hill, Chen, Chen, Pfeifer, & Jones, 2016) oluşturmayan taşıyıcı sistemler etkili bir gen terapisi için gereklidir.

Son dönemlerde ticari olarak mevcut transfeksiyon sistemlerine alternatif olarak geliştirilen yapay oligoamino asitler ile katı faz sentezine dayanan, sekans tanımlı oligo (etylenamino) amidler (OAAs), nükleik asitlerin (Schaffert, Troiber, Salcher, Fröhlich, et al., 2011), proteinlerin (Kuhn et al., 2020a) ve ilaçların (Truebenbach, Kern, et al., 2019) etkili bir şekilde taşınması için araştırılmaktadır.

Berger ve ark. süksinoil tetraetilen pentamin (STP)-temelli lipo-oligoaminoamidler (OAAS) ile plazmid DNA'nın teslimi için *in vivo* etkinlik gösteren, *in vitro* testlerinde %90 tam serumda litik ve gen-transfer aktivitesinin önemli ölçüde engellendiği, *in vivo* intravenöz uygulamalar için yeni bir tarama modeli geliştirmiştir (Berger et al., 2021).

Zhang ve ark.'ları lipooligomer 728 ve farklı yardımcı lipidlerle oluşturulan hedeflendirilmiş hücre içi protein taşıyıcı sistemler geliştirmiştir (Peng Zhang et al., 2017).

Wang ve ark. lipo-oligomerler ile EGFR-pozitif tümör hücrelerine hedeflendirilen, RNA-interferans (RNAi) temelli gen susturma amacıyla siRNA lipo-polileks taşıyıcı sistemleri geliştirmiştir (Y. Wang et al., 2020).

Lipooligomer temelli taşıyıcı sistemler ile yapılan çalışmalar devam etmekte olup, potansiyel olarak etkili taşıyıcı sistemler için umut vericidir.

Bu tez çalışmasında, ilk defa sentezlenen sekans tanımlı yeni katyonik lipooligomer 1451 (LMU Farmasötik Biyoteknoloji Laboratuvarı yeni bileşik kütüphanesinde yer alan sıra numarası) ile geliştirilen pDNA/lipooligomer lipoplekslerinin *in vitro* transfeksiyon etkinliği ve lipoplekslere dahil edilen yardımcı bileşenlerin (kolesterol, T80, TPGS) transfeksiyon etkinliği üzerindeki etkileri incelenerek, lipooligomer 1451'in taşıyıcı sistem olabilme potansiyeli araştırılmıştır.

Etkili bir transfeksiyon için ilk adım, pDNA'nın taşıyıcı sistem ile elektrostatik etkileşimlerle stabil kompleks bir yapı oluşturmasıdır. N/P oranı, nanopartiküllerin fiziksel ve elektrokimyasal özelliklerini (boyut, zeta potansiyeli, DNA yoğunlaşması), hücresel içselleştirme, endolizozomal kaçış, sitotoksite, biyodağılım ve transfeksiyon verimliliğini önemli bir şekilde etkilemektedir (Buck et al., 2019). Bu çalışmada, lipopleks oluşumu için lipooligomer 1451'in pDNA'yı yoğunlaştırma kabiliyetinin ve optimal lipo-oligomer/pDNA oranının belirlenmesinde bir araç olarak agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Çalışmamızda optimum N/P oranını saptayabilmek için 3, 6, 12, 18 olmak üzere farklı N/P oranları denenmiştir. Lipooligomer 1451/pDNA kompleks oluşumuna dair verilen jel görüntüsü (şekil 15) incelendiğinde, N/P 6'dan itibaren 6-18 aralığında, HBG tamponu içerisinde tam bir kompleksleşmenin meydana geldiği gözlemlenmiştir.

N/P 6'nın altındaki değerlerde, kısmi kompleks oluşumuna bağlı jelde bir miktar serbest pDNA gözlemlenmiştir. Komplekslerin artan N/P oranlarında pDNA'yı bağladığını ve buna bağlı olarak jel üzerindeki hareketinin taşıyıcı sistem tarafından engellenerek kuyucuk içerisinde kaldığı gözlemlenmiştir. Lipooligomer oranı azaldıkça kısmi kompleks oluşumuna bağlı serbest pDNA bandı görülmüştür. Chen ve ark.'nın siRNA'yı enkapsüle eden lipid nanopartiküllerinin N/P oranına bağlı olarak transfeksiyon etkinliği üzerinde yaptığı çalışmada, N/P oranı 1'den 12'ye arttırıldığında, transfeksiyon verimliliğinin ancak N/P 6 oranına kadar arttığı, N/P oranının daha da artmasının transfeksiyon verimliliğinde sadece küçük bir iyileşme sağladığı ve bu nedenle endolizozomal kaçışı en üst düzeye çıkarmak için minimum miktarda katyonik (iyonize edilebilir) lipitin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (Chen et al., 2016), benzer bulgular pDNA taşıyıcı sistemler için de saptanmıştır (Witzigmann et al., 2015). Ayrıca N/P oranının artışına bağlı olarak, hücrelere zarar verebilecek kompleks olmayan katyonik lipitler nedeniyle toksitenin artışına yönelik çalışmalar (Kunath et al., 2003; Ming Hsu & Uludağ, 2012) dikkate alınarak çalışmamızda kompleks oluşumu için optimum N/P oranı 6 seçilerek sonraki çalışmalarda hazırlanan tüm formülasyonlar N/P 6 oranıyla yapılmıştır.

Transfeksiyon etkinliğini arttırmak amacıyla Tween 80 (T80), kolesterol (Chol) ve D- α -Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) yardımcı maddeleri kullanılmıştır. Formülasyon içeriğindeki pDNA miktarı sabit tutularak, lipooligomer 1451/yardımcı bileşenler ile farklı oranlarda (1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 mol/mol) kompleks formülasyonları hazırlanarak agaroz jel elektroferzi ile DNA'yı kompleksleştirme yeteneği incelenmiştir.

Kolesterol ile hazırlanan komplekslerin agaroz jel görüntüsü incelenmesinin sonucunda Lpx:Kol ile farklı oranlarında hazırlanan formülasyonlarda, elektroforez sırasında jelde pDNA bantlarına rastlanmamış ve pDNA yükleme kuyucuklarında kalmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan tüm örneklerde tam kompleks oluşumu gözlemlenmiştir (şekil 16).

Tween80 ile farklı oranlarda hazırlanan formülasyonlarda, pDNA ile kompleksleşme oranı farklılık göstermiştir. Lpx: T80, 1:1 ve 1:2 oranlarında tam kompleksleşme göstermiş olup, 1:3; 1:4; 1:5 oranlarında kısmi kompleksleşme göstermiştir (şekil 17).

Bu, örneklere gittikçe artan oranda T80 eklenmesinin kompleks oluşturma kapasitesini azalttığını göstermektedir.

TPGS ile farklı oranlarda hazırlanan formülasyonlarda, tam kompleksleşme sadece Lpx:TPGS 1:1 oranında gözlemlenmiş olup; 1:2;1:3;1:4;1:5 oranlarında kısmi olarak gözlemlenmiştir (şekil 18).Böylece TPGS miktarının artmasıyla da kompleks oluşturma kapasitesinin azaldığı gözlenmiştir.

Lipooligomer 1451 ile oluşturulan lipoplekslerin partikül boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli, dinamik ışık saçılması (DLS) ile belirlenmiştir. Ayrıca, yardımcı bileşenler ile fonksiyonelleştirmenin partikül özellikleri üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. pDNA ve lipooligomerden oluşan ve yardımcı madde içermeyen kompleksin partikül büyüklüğü $3080 \pm 225,7$ nm olarak ölçülmüştür (tablo 10). Yardımcı bileşen olarak kolesterol içeren lipopleks formülasyonlarının partikül büyüklüğü $3437 \pm 385,9$ nm ile $4180 \pm 298,6$ nm aralığında ölçülmüştür, kolesterolün artan oranlarında partikül büyüklüğünde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. T80 ve TPGS'in artan oranlarda eklenmesiyle, ters orantılı olarak azalan partikül boyutu gözlemlenmiştir.

T80 içeren komplekslerde partikül boyutu 2574-104,1 nm ve TPGS içerenlerde 76,62-120,7 nm aralığında ölçülmüştür. T80 ve TPGS'in lipopleks partikül boyutunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Bu, TPGS ve T80'in yüzey etkin özelliklerinden öne gelmektedir.

Katyonik polimerler, negatif yüklü nükleik asitleri yoğunlaştırma ve paketlenme eğilimindedir, NP'nin şekli ve boyutu biyolojik aktivite ile ilişkilidir ve partikül boyutlarının küçük olması, hücrelere endositozis yoluyla taşınmasında avantaj sağlamaktadır (Hühn et al., 2013). DNA'nın büyük boyutlarda olması, lipopleksler ile gen transferi için bir sınırlama oluşturmaktadır çünkü klinik uygulamalar için konsantre, homojen ve kolloidal olarak stabil bir DNA taşıyıcı sistem çok önemlidir (Kreiss et al., 1999).

Çalışmamızda endositoz yoluyla hücresel alım için, boyut sınırı <200 nm'lik lipopleksler amaçlanmıştır (Rejman, Oberle, Zuhorn, & Hoekstra, 2004). Kolesterol eklenen lipopleks formülasyonlarının, partikül boyutlarının büyük olması, kolesterolün yüksek hidrofobik özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir, büyük partikül boyutları literatür taramalarıyla uyumludur (Radchatawedchakoon et al., 2020; Y. Zhang & Anchordoquy, 2004).

Kolesterol içeren formülasyonların büyük partikül boyutları nedeniyle *in vivo* uygulamalar için uygun olmayacağına karar verilmiş ve bu formülasyonlar elenerek *in vitro* biyolojik değerlendirme çalışmalarımızdan çıkarılmıştır.

Tween 80'in, uygun bir yüzey aktif madde olarak formülasyonlara eklenmesinin parçacık agregasyonundan kaçınmada ve formülasyonların stabilize edilmesinde önemli bir rol oynadığını daha önce yapılmış çalışmalarla kanıtlamıştır (Quintanar-Guerrero, Tamayo-Esquivel, Ganem-Quintanar, Allémann, & Doelker, 2005). Çalışmamızda T80 artan mol oranlarında lipopleks formülasyonlarına eklenmiştir. T80'in hidrofilik karakteri göz önüne alındığında (HLB = 15), Lpx formülasyonlarına T80'in eklenmesinin taşıyıcı sistemi daha hidrofilik hale getirdiği ve dar bir boyut dağılımı göstermesine katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. Lpx:T80 partikül boyutu 1:3 oranı için 149,3 nm; 1:4 oranı için 112,8 nm; 1:5 oranı için 104,1 nm ölçülmüştür. Böylelikle T80'in artan oranlarında daha küçük partikül boyut dağılımı göstermesi literatür taramalarıyla uyumlu olarak sonuçlanmıştır (Lo, 2003; Ren, Park, Sah, & Lee, 2008). Çalışmamızda T80 ile partikül boyutu uygun lipopleksler elde edilmiştir.

TPGS'in; emülsifiye edici ajan, yüzey aktif madde ve stabilizatör olarak farmasötik formülasyonlarda kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Liu, Huang, & Liu, 2010). Çalışmamızda TPGS artan mol oranlarında lipopleks formülasyonlarına eklenmiştir. Lpx:TPGS partikül boyutu; artan mol oranlarına göre $79,91 \pm 7,296$ ve $120,7 \pm 3,443$ nm aralığında ölçülmüştür. TPGS'in formülasyonda mol oranındaki artışa bağlı olarak, daha küçük partikül boyutunda lipopleksler elde edilmiştir. Küçük partikül boyutunun TPGS'lere bağlı doğrusal PEG-1000 zincirinden kaynaklandığı, hidrofobik bölgede ilave tokoferol parçasının varlığının lipopleks boyutunu büyük ölçüde etkilediğini ve dolayısıyla transfeksiyon verimini büyük ölçüde etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Kedika & Patri, 2012). TPGS içeren lipoplekslerin daha küçük partikül boyutu göstermesi literatür ile uyumludur (Thant et al., 2021). T80 ve TPGS içeren lipopleks formülasyonlarının, yardımcı bileşen içermeyen lipoplekslere (Lpx 1:0) kıyasla anlamlı ölçüde ($p < 0.01$) daha küçük partikül boyutuna sahip olduğu olduğu gözlemlenmiştir.

Belirli bir boyutta homojen (monodispers) bir dispersiyonun tanımlanması, optimize edilmiş güvenli, stabil ve verimli nanotaşıyıcılar için önemlidir. NP'lerin homojenliği, 0.05'ten düşük değerler yüksek derecede monodispers olarak tanımlanırken; 0.7'nin üzerindeki değerler formülasyonun çok geniş bir partikül boyutu dağılımına sahip olduğunu ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ile analiz edilmeye uygun olmadığını göstermektedir (Danaei et al., 2018). Çalışmamızda partikül büyüklüğünün homojenitesini ve aglomerasyona karşı direncinin anlamlı olması için PDI değerinin 0,3 ve daha düşük olması istenmektedir.

PDI en düşük ve en yüksek değerleri, Lpx 1:0 için 0,351; Lpx:Kol formülasyonları için 0,33 -0,417; Lpx:T80 formülasyonları için 0,189-0,6; Lpx:TPGS formülasyonları için 0,194-0,287 aralığında ölçülmüştür. Yardımcı bileşenlerin artan oranlarıyla PDI değerinde belirgin bir artış ya da azalış gözlemlenmemiştir. Kolesterol içeren lipopleksler büyük partikül boyutlarıyla beraber yüksek PDI göstermiştir. Lpx: T80 1:1 dışında tüm Lpx:T80 ve Lpx:TPGS lipopleksleri için 0,3'ün altında veya eşit PDI değerleri ölçülmüştür, böylelikle boyut dağılım aralığı dar olan başarılı lipopleksler elde edilmiştir.

Zeta potansiyeli, partikül yüzey yükünü temsil eder ve katyonik yüzey yüküne sahip partiküller anyonik DNA molekülleri ile etkileşime girer. Yardımcı bileşen içermeyen Lpx 1:0'ın Zeta Potansiyel değeri $-0,259 \pm 0,318$ mV ölçülmüştür. Formülasyonlara kolesterol eklenmesiyle Zeta Potansiyel değeri 6,02 mV'ye; T80 eklenmesiyle 8,9 mV'ye; TPGS eklenmesiyle 4,25 mV değerine kadar pozitif değerlere yükselmiştir.

Sonuç olarak Kolesterol içeren formülasyonlar büyük partikül boyutu ve yüksek PDI nedeniyle *in vivo* çalışmalar için uygun bulunmayarak, *in vitro* çalışmalardan elenmiştir. T80 ve TPGS içeren formülasyonların *in vitro* çalışmalarda denenmesine karar verilmiştir.

Bölüm 3.2.3.2.1'de belirtildiği şekilde, heparinin yüksek anyonik yapıda olması ve katyonik yapılara bağlanma eğilimi gösteren bir ajan olması nedeniyle kompleks dayanıklılığı, heparin ile yer değiştirme (polianyonik stres) yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Jel görüntüleri incelendiğinde (şekil 20) kolesterol ile hazırlanan tüm lipopleks formülasyonlarının heparinin anyonik özelliğine rağmen, güçlü bir şekilde pDNA'yı tuttuğu ve polianyonik stress koşullarında pDNA'nın salımına engel olduğu gözlemlenmiştir.

T80 ile hazırlanan lipopleks formülasyonları ancak Lpx: T80 oranı (mol:mol): 1:1; 1:2; 1:3 oranlarında heparinin oluşturduğu anyonik strese dayanıklılık göstererek pDNA'yı koruyabilmiştir; 1:4 ve 1:5 oranlarında anyonik heparin, katyonik lipooligomer ile etkileşime girerek, pDNA'nın kompleksten salınmasına neden olmuştur. TPGS ile hazırlanan lipopleks formülasyonları ancak Lpx:TPGS oranı (mol:mol) 1:1 oranında anyonik strese karşı dayanıklıdır. Jel üzerinde görülen serbest pDNA bantları kompleksin stabil yapısının korunmadığını, heparinin etkisi ile bozularak pDNA salımı ile sonuçlandığını göstermektedir.

T80 ve TPGS'in agaroz jel elektroforezinde yapılan heparin ile yer değiştirme yönteminde, anyonik strese karşı dayanıklı olmadığı tespit edilen 1:3; 1:4; 1:5 oranları spektrometrik ölçümlerle de test edilmiştir. EtBr dışlama testi olarak bilinen ancak daha güvenli bir seçenek olduğu için EtBr yerine SafeView kullanarak yapmış olduğumuz deney, taşıyıcı sistemin DNA'ya bağlanma yeteneğinin değerlendirilmesi için bir alternatif sağlamaktadır. Fizyolojik anyonik stresi taklit etmek için 5 IU heparin sülfat ilavesinden sonra DNA kısmi olarak kompleksten salınır ve böylece SafeView serbest hale gelen DNA moleküllerine interkale olarak UV ışığı altında floresans verir. Artan anyonik strese göre DNA salımını saptayabilmek için 5, 10, 15 IU/mL heparin ortamında, her heparin uygulamasından sonra tekrarlı ölçümler yapılmıştır. T80 ve TPGS ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının 0, 5, 10, 15 IU/mL heparin varlığında normalize edilmiş spektrofotometrik ölçüm sonuçları (şekil 21 ve 22), T80 ve TPGS'in 1:3; 1:4; 1:5 oranlarında DNA'yı anyonik stres ortamında koruyabilme kapasitelerinin düşük olduğu saptanmıştır, agaroz jel elektroforezi ile yapılan anyonik stres sonuçlarını doğrulamıştır.

Bölüm 3.2.3.2.2.'de belirtildiği şekilde, komplekslerin DNA'yı serum nükleazlarıyla parçalanmaktan koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Bu deneye ait agaroz jel görüntülerine göre (şekil 23-35.), %10 FBS ile 2 ve 24 saatlik muamelenin ardından, taşıyıcı sistem olmadan çıplak pDNA'nın serum varlığında tamamen degrade olduğu gözlemlenirken; Lpx:kol, Lpx:T80 ve Lpx:TPGS'in 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5 (mo:mol) oranları ile hazırlanan lipopleks formülasyonlarının hepsi seruma karşı DNA'yı koruma özelliği göstererek stabil kalmıştır.

Bölüm 3.2.3.3.3’de belirtildiği şekilde, komplekslerdeki DNA’nın nükleaz enzimleri etkisiyle parçalanma profilini incelemek amacıyla çıplak pDNA ve kompleksler DNaz I enzimi ile muamele edilmiştir. Jel görüntüleri incelendiğinde (şekil 26 ve 27); DNaz-I enzimi varlığında çıplak pDNA’nın tamamen degrade olduğu gözlemlenirken, Lpx:T80 ve Lpx:TPGS’in 1:1;1:2;1:3;1:4;1:5 (mol:mol) oranları ile hazırlanan tüm lipopleks formülasyonlarının DNA’yı tamamen parçalanmaktan koruduğu görülmüştür.

Bölüm 4.4.1’de belirtildiği şekilde, GFP ekspresyonunun değerlendirilmesi H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı) hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon etkinliği, lipoplekslerin hücreye transferi sonrası plazmidin taşıdığı GFP geninin eksprese ettiği proteinin floresan mikroskopta görüntülenmesiyle incelenmiştir. Şekil 28’de görüldüğü üzere uygulamadan 48 saat sonra hücre içinde eksprese olan GFP yeşil ışıma göstermektedir. En yüksek ışıma Lpx:T80 komplekslerinde gözlemlenirken, yardımcı bileşen içermeye Lpx 1:0 en düşük ışımayı vermiştir.

Bölüm 4.4.2.’de belirtildiği şekilde, hücre canlılığı analizi; Lpx 1:0, yardımcı maddeler (HBG tamponu içerisinde seyreltilmiş saf T80 ve TPGS); pDNA içermeyen Oligomer:T80 ve Oligomer:TPGS; Lpx:T80 ve Lpx:TPGS farklı oranlarda (mol:mol) hazırlanan formülasyonların H1299 hücre hattındaki sitotoksiteleri araştırılmıştır. Sitotoksitite Resazurin indirgeme deneyi kullanılarak değerlendirilmiştir (Olim, Neves, Vieira, Tomás, & Sheng, 2021). Hücre canlılığının 48.saat sonuçları incelendiğinde (şekil 29) T80 içeren formülasyonların hiç biri sitotoksitite göstermezken; 1:2 ve 1:3 oranında TPGS içeren formülasyonların uygulanmasıyla canlılık yüzdesinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Genel olarak TPGS miktarı arttıkça hücre canlılığı azalmıştır. En düşük hücre canlılığı TPGS 1:3 oranı için %71’dir. Yardımcı madde içermeyen Lpx 1:0 lipopleksi hücreler için sistotoksik özellik göstermemiştir. Lipooligomer, TPGS’in sitotoksitite oranını düşürmüştür. Saf TPGS 1:3 oranı için hücre canlılığı %71 iken, oligomer kompleks yapısına dahil TPGS 1:3 için hücre canlılığı canlılığı %80’e yükselmiştir.

Hücre canlılığının 72. saat sonuçları incelendiğinde (şekil 30); T80 içeren formülasyonların hiç birisi sitotoksitite göstermezken; 1:3 oranında TPGS içeren formülasyonların canlılık yüzdesini anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır ($p < 0.05$).

Saf TPGS1:3'ün hücre canlılığı 72. saatte % 56'ya düşmüştür ancak 1:3 oranında kompleks haldeki TPGS uygulanan hücrelerin canlılığı %78 olarak saptanmıştır. TPGS'in H1299 hücreleri üzerindeki sitotoksitesi, konsantrasyondaki artışla önemli ölçüde artmıştır, bu artış TPGS'in kullanıldığı çalışmalarda sitotoksite verileriyle tutarlıdır (Dong et al., 2016).

Sonuç olarak Oligomer 1451 hücre canlılığında azalmaya neden olmamıştır. Bu veriler Lipooligomer 1451 ile hazırlanan komplekslerin *in vitro* pDNA taşımasında, güvenli olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Bölüm 4.4.3'de belirtildiği şekilde *in vitro* GFP ekspresyonu akış sitometrisi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Geliştirilen lipooligomer:pDNA ve yardımcı maddeler ile oluşturulan komplekslerin H1299 hücrelerini transfekte edebilme etkinliği, yeşil floresan dalga boyunu dedekte eden filtreye sahip akış sitometre cihazı kullanılarak değerlendirilmiştir. GFP eksprese eden hücreler (GFP+) yüzde olarak ifade edilmiştir. Çıplak pEGFP uygulanan hücreler ve sadece HBG uygulanan kompleks içermeyen hücreler negatif kontrol grubu olarak, ticari transfeksiyon ajanı Lipofektamin ise pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. TPGS içeren komplekslerin toksisitesi yüksek çıktığından dolayı Lpx:TPGS formülasyonları tek tekrar olarak deneme amacıyla çalışılmış, sadece bu gruba istatistiksel analiz yapılmamıştır.

Şekil 31, lipopleks örneklerinin GFP ekspresyonlarını kantitatif olarak göstermektedir. TPGS içeren lipopleksler düşük GFP ekspresyonu gösterirken, T80 içeren lipopleksler daha yüksek GFP ekspresyonu göstermiştir. Lpx:T80 1:1 için % 51,87; Lpx 1:2 için %41,34; Lpx:T80 1:3 için %29,70'tir. T80'in artan oranlarında ekspresyon etkinliğinin düştüğü saptanmıştır ancak kontrol Lipofektamine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir. Ticari olarak temin edilebilen ve iyi transfeksiyona sahip olduğu bilinen LF ile transfeksiyon etkinliği %50.16 bulunmuştur. Akış sitometrisi sonuçları, floresan mikroskopi yöntemiyle GFP ekspresyon verilerini doğrulamıştır.

Bölüm 4.4.4'de belirtildiği şekilde, H1299 hücre hattında migrasyon üzerindeki etkinin değerlendirilmesi için çizik testi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde kanser hücrelerine miR-34a kodlayan plazmidin taşınması ve miR-34a ekspresyonu sağlanmasının ardından hücre migrasyonunun incelenmesi amaçlanmıştır.

Literatür verilerine göre miR-34a uygulanan NSCLC kanser hücrelerinde migrasyon azalmaktadır (Huang et al., 2021) .Bu şekilde pDNA transferiyle antikanser etkili bir miRNA'nın kanser hücre migrasyonuna etkisi incelenmiştir.

Çizikler oluşturduktan sonra pDNA-kontrol ve pDNA-MİR34 ile oluşturulan formülasyonlar uygulandıktan hemen sonra görüntüleri kaydedilmiştir (t0); daha sonra bu görüntüler, 24. ve 48. saatte kaydedilen görüntüler ile karşılaştırılarak hücre migrasyonu değerlendirilmiştir.

Sadece GFP kodlayankontrol pDNA ile hazırlanan lipoplekslerin t0., 24., ve 48.sa alınan görüntüleri incelendiğinde t0 anında aynı genişlikte çizilen alanların 24. sa kısmi olarak farklı oranlarda kapandığı ancak 48. sa görüntülerinden tamamen kapandığı görülmüştür (şekil 32). Antikanser etkili pDNA-Mir34 içeren komplekslerin uygulandığı görüntüler incelendiğinde 24. sa çizik aralıklarının daha az kapandığı ve 48. saatte Lpx 1:0 ve Lpx:T80 formülasyonlarının az oranda olsa da kısmi olarak tam kapanmadığı ancak Lpx:TPGS formülasyonlarının 48. saat sonunda tam olarak kapandığı görülmüştür. Sonuç olarak çizik alan görüntülerinden Lpx 1:0 ve Lpx:T80 lipoplekslerinin içerdiği pDNA-Mir34 hücrelere transfekte olarak hücre göçünü kısmi olarak inhibe etmiştir.

6. Sonuç ve Öneriler

Bu tez çalışmasında Lipooligomer1451:pDNA lipopleks formülasyonları oluşturulmuş ve karakterizasyonu yapılarak optimal formülasyon belirlenmiştir. Geliştirilen formülasyonun modifikasyonu yapılarak transfeksiyon etkinliğini arttırmak için formülasyonlara kolesterol, T80 ve TPGS ilave edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında optimal formülasyonlarda partikül boyutu, zeta potansiyeli, polidispersite indeks tayinleri, kompleks dayanıklılığı ve kompleks stabilitesi analizleri yapılmıştır. Partikül boyutu uygun aralıkta olan ve stabil bulunan formülasyonlar seçilerek sitotoksitite *ve in vitro* transfeksiyon çalışmaları H1299 hücrelerinde incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında yeni katyonik taşıyıcı sistem olarak sekans tanımlı Lipooligomer 1451'in potansiyel olarak gen taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi ve etkili bir transfeksiyon sağlaması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda belirlenen tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ve öneriler şu şekilde özetlenebilir;

- ✓ Tezin ilk kısmı Lipooligomer 1451'in DNA ile kompleksleşme kabiliyetine odaklanmaktadır. Bu amaçla pozitif yüklü lipooligomer ile negatif yüklü DNA' nın elektrostatik etkileşimi ile farklı N/P oranlarında kompleksler oluşturularak, optimal N/P oranı 6 olarak seçilmiştir.
- ✓ Transfeksiyon etkinliğini arttırması için formülasyonlara eklenen Kolesterol, T80 ve TPGS 'in DNA'yı kompleksleştirme üzerine etkisi incelenmek için N/P 6 oranında kompleksler oluşturulmuştur. Kolesterol ile oluşturulan kompleksler tüm oranlarda başarılı bir tam kompleksleşme gösterirken; T80 1:1 ve 1:2; TPGS sadece 1:1 oranında DNA ile tam kompleksleşme göstermiştir. Daha yüksek oranlarda bir miktar serbest pDNA gözlenmiştir.
- ✓ Formülasyona eklenen Kolesterol, T80 ve TPGS ile hazırlanan lipoplekslerin partikül büyüklükleri, zeta potansiyel değerleri ve polidispersite indeks analizleri yapılmıştır. Çalışmamızda endositoz yoluyla hücresel alım için, boyut sınırı <200 nm'lik lipopleksler amaçlanmıştır.

- ✓ Kolesterol ile oluşturulan formülasyonlar büyük partikül boyutu nedeniyle elenmiştir. T80 ve TPGS ile hazırlanan partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli uygun aralıkta olan formülasyonlar çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir.
- ✓ Lipoplekslerin stabilite çalışmaları kapsamında anyonik strese karşı dayanıklılığı, serum stabilitesi ve DNaz-I nükleaz stabilite analizleri yapılmıştır. T80 ve TPGS ile hazırlanan tüm formülasyonlar serum ve DNaz-I'e karşı stabil iken, anyonik strese karşı sadece T80'in 1:1 ve 1:2; TPGS'in 1:1 oranlarında hazırlanmış lipopleksleri stabil bulunmuştur.
- ✓ Hücre canlılığı analizi sonuçlarında Lipooligomer 1451'in hücreler için sitotoksik olmadığı bulunmuştur. Lipopleks formülasyonlarına eklenen T80 sitotoksitite göstermezken, TPGS artan oranlarda anlamlı derecede sitotoksitite göstermiştir.
- ✓ Karakterizasyon çalışmalarının ardından *in vitro* transfeksiyon çalışmalarından kullanılmak üzere Lpx:T80 ve Lpx:TPGS lipoplekslerinden uygunluk gösteren 1:1, 1:2 ve 1:3 formülasyonları seçilmiştir.
- ✓ GFP ekspresyonunun değerlendirilmesi H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı) hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Floresan Mikroskop Yöntemi ile Lpx:T80 ve Lpx:TPGS formülasyonlarının hepsinde transfeksiyon gözlemlenmiştir. T80 ile hazırlanan formülasyonların transfeksiyon etkinliği TPGS ile hazırlananlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen bu veriler, Akış Sitometrisi ile doğrulanmıştır.
- ✓ Çizik testi ile migrasyon değerlendirilmiş, çizik alan görüntülerinden Lpx 1:0 ve Lpx:T80 lipoplekslerinin içerdiği antikanser mikro RNA kodlayan pDNA-Mir34 hücrelere transfekte olarak hücre göçü üzerinde kısmi olarak inhibitör etki göstermiştir.

Tez çalışmamızda Lipooligomer 1451'in plazmid DNA için taşıyıcı sistem olarak kullanılması ilk kez denenmiştir. Geliştirilen lipooligomer temelli lipoplekslerin stabil olmaları, uygun partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve PDI değerine sahip olmaları, hücre canlılığı üzerinde toksik etki göstermemeleri ve hücreleri transfekte edebilme kabiliyetleri göz önüne alındığında gen taşıyıcı sistemlere alternatif olabilme potansiyeli olduğu düşünülmektedir.



Kaynaklar

- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 505–515. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Barile, C. J., Tse, E. C. M., Li, Y., Gewargis, J. P., Kirchschrager, N. A., Zimmerman, S. C., & Gewirth, A. A. (2016). The Flip-Flop Diffusion Mechanism across Lipids in a Hybrid Bilayer Membrane. *Biophysical Journal*, 110(11), 2451–2462. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2016.04.041>
- Benjaminsen, R. V., Matthebjerg, M. A., Henriksen, J. R., Moghimi, S. M., & Andresen, T. L. (2013). The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Molecular Therapy*, 21(1), 149–157. <https://doi.org/10.1038/MT.2012.185>
- Berger, S., Krhac̃ Levac̃lic̃, A., Hörterer, E., Wilk, U., Benli-Hoppe, T., ... Wagner, E. (2021). Optimizing pDNA Lipo-polyplexes: A Balancing Act between Stability and Cargo Release. *Biomacromolecules*, 22(3), 1282–1296. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.0C01779/SUPPL_FILE/BM0C01779_SI_001.PDF
- Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., & Rowe, W. P. (1968). Serologic evidence for human infection with adenovirus-associated viruses. *Journal of the National Cancer Institute*, 40(2), 319–327. <https://doi.org/10.1093/jnci/40.2.319>
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941. <https://doi.org/10.1038/NBT.3330>
- Bono, N., Ponti, F., Mantovani, D., & Candiani, G. (2020, February 1). Non-viral in vitro gene delivery: It is now time to set the bar! *Pharmaceutics*, Vol. 12, p. 183. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020183>

- Boussif, O., LezoualC'H, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.16.7297>
- Buck, J., Grossen, P., Cullis, P. R., Huwyler, J., & Witzigmann, D. (2019). Lipid-based DNA therapeutics: Hallmarks of non-viral gene delivery. *ACS Nano*, 13(4), 3754–3782. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07858>
- Chen, S., Tam, Y. Y. C., Lin, P. J. C., Sung, M. M. H., Tam, Y. K., & Cullis, P. R. (2016). Influence of particle size on the in vivo potency of lipid nanoparticle formulations of siRNA. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 235, 236–244. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.05.059>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10020057>
- De Smidt, P. C., Campanero, M. A., & Trocóniz, I. F. (2004). Intestinal absorption of penclomedine from lipid vehicles in the conscious rat: contribution of emulsification versus digestibility. *International Journal of Pharmaceutics*, 270(1–2), 109–118. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2003.10.036>
- Dong, K., Yan, Y., Wang, P., Shi, X., Zhang, L., Wang, K., ... Dong, Y. (2016). Biodegradable mixed MPEG-SS-2SA/TPGS micelles for triggered intracellular release of paclitaxel and reversing multidrug resistance. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 5109–5123. <https://doi.org/10.2147/IJN.S111930>
- Durymanov, M., & Reineke, J. (2018). Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers. *Frontiers in Pharmacology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00971>

- Egli, M., & Manoharan, M. (2019). Re-Engineering RNA Molecules into Therapeutic Agents. *Accounts of Chemical Research*, 52(4), 1036–1047. <https://doi.org/10.1021/ACS.ACCOUNTS.8B00650>
- Felgner, P. L., Barenholz, Y., Behr, J. P., Cheng, S. H., Cullis, P., Huang, L., ... Wu, G. (1997, March 20). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Human Gene Therapy*, Vol. 8, pp. 511–512. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.5-511>
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., ... Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7413. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.21.7413>
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24(7), 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00445-3)
- Foster, D. J., Brown, C. R., Shaikh, S., Trapp, C., Schlegel, M. K., Qian, K., ... Milstein, S. (2018). Advanced siRNA Designs Further Improve In Vivo Performance of GalNAc-siRNA Conjugates. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(3), 708–717. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2017.12.021>
- Fraley, R., Straubinger, R. M., Louise Springer, E., Papahadjopoulos, D., & Rule, G. (1981). Liposome-Mediated Delivery of Deoxyribonucleic Acid to Cells: Enhanced Efficiency of Delivery Related to Lipid Composition and Incubation Conditions. *Biochemistry*, 20(24), 6978–6987. <https://doi.org/10.1021/bi00527a031>
- Guo, Y., Luo, J., Tan, S., Otieno, B. O., & Zhang, Z. (2013). The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2013.02.006>

- Hager, S., & Wagner, E. (2018, November 2). Bioresponsive polyplexes—chemically programmed for nucleic acid delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, Vol. 15, pp. 1067–1083. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425247.2018.1526922>
- Hall, A., Lächelt, U., Bartek, J., Wagner, E., & Moghimi, S. M. (2017a). Polyplex Evolution: Understanding Biology, Optimizing Performance. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(7), 1476–1490. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2017.01.024>
- Hall, A., Lächelt, U., Bartek, J., Wagner, E., & Moghimi, S. M. (2017b, July 5). Polyplex Evolution: Understanding Biology, Optimizing Performance. *Molecular Therapy*, Vol. 25, pp. 1476–1490. American Society of Gene and Cell Therapy. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.024>
- Hartmann, L., Häfele, S., Peschka-Süss, R., Antonietti, M., & Börner, H. G. (2007). Sequence positioning of disulfide linkages to program the degradation of monodisperse poly(amidoamines). *Macromolecules*, 40(22), 7771–7776. https://doi.org/10.1021/MA071427U/SUPPL_FILE/MA071427USI20070810_121021.PDF
- Hartmann, L., Krause, E., Antonietti, M., & Börner, H. G. (2006). Solid-phase supported polymer synthesis of sequence-defined, multifunctional poly(amidoamines). *Biomacromolecules*, 7(4), 1239–1244. <https://doi.org/10.1021/BM050884K>
- He, D., Müller, K., Krhac Levacic, A., Kos, P., Lächelt, U., & Wagner, E. (2016). Combinatorial Optimization of Sequence-Defined Oligo(ethanamino)amides for Folate Receptor-Targeted pDNA and siRNA Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 27(3), 647–659. <https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.5B00649>
- Hill, A. B., Chen, M., Chen, C. K., Pfeifer, B. A., & Jones, C. H. (2016). Overcoming gene-delivery hurdles: Physiological considerations for nonviral vectors. *Trends in Biotechnology*, 34(2), 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.11.004>

- Hong, K., Zheng, W., Baker, A., & Papahadjopoulos, D. (1997). Stabilization of cationic liposome-plasmid DNA complexes by polyamines and poly(ethylene glycol)-phospholipid conjugates for efficient in vivo gene delivery. *FEBS Letters*, 400(2), 233–237. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01397-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01397-X)
- Hosseini, E. S., Nikkhah, M., & Hosseinkhani, S. (2019). Cholesterol-rich lipid-mediated nanoparticles boost of transfection efficiency, utilized for gene editing by crispr-cas9. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4353–4366. <https://doi.org/10.2147/IJN.S199104>
- Huang, Y., Wang, L., Chen, Y., Han, H., & Li, Q. (2021). Lipoic Acid-Modified Oligoethyleneimine-Mediated miR-34a Delivery to Achieve the Anti-Tumor Efficacy. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26164827>
- Hühn, D., Kantner, K., Geidel, C., Brandholt, S., De Cock, I., Soenen, S. J. H., ... Parak, W. J. (2013). Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: Focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano*, 7(4), 3253–3263. https://doi.org/10.1021/NN3059295/SUPPL_FILE/NN3059295_SI_001.PDF
- Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y., & He, N. (2014). Current Progress in Gene Delivery Technology Based on Chemical Methods and Nano-carriers. *Theranostics*, 4(3), 240. <https://doi.org/10.7150/THNO.6914>
- Jones, C. H., Chen, C. K., Ravikrishnan, A., Rane, S., & Pfeifer, B. A. (2013). Overcoming nonviral gene delivery barriers: perspective and future. *Molecular Pharmaceutics*, 10(11), 4082–4098. <https://doi.org/10.1021/MP400467X>
- Kedika, B., & Patri, S. V. (2012). Synthesis and gene transfer activities of novel serum compatible reducible tocopherol-based cationic lipids. *Molecular Pharmaceutics*, 9(5), 1146–1162. https://doi.org/10.1021/MP200435Y/SUPPL_FILE/MP200435Y_SI_001.PDF
- Koynova, R., Wang, L., & MacDonald, R. C. (2006). An intracellular lamellar-nonlamellar phase transition rationalizes the superior performance of some cationic lipid transfection agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14373–14378. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0603085103>

- Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., ... Pitard, B. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Research*, 27(19), 3792–3798. <https://doi.org/10.1093/NAR/27.19.3792>
- Kuhn, J., Lin, Y., Krhac Levacic, A., Al Danaf, N., Peng, L., Höhn, M., ... Lächelt, U. (2020a). Delivery of Cas9/sgRNA Ribonucleoprotein Complexes via Hydroxystearyl Oligoamino Amides. *Bioconjugate Chemistry*, 31(3), 729–742. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00853>
- Kuhn, J., Lin, Y., Krhac Levacic, A., Al Danaf, N., Peng, L., Höhn, M., ... Lächelt, U. (2020b). Delivery of Cas9/sgRNA Ribonucleoprotein Complexes via Hydroxystearyl Oligoamino Amides. *Bioconjugate Chemistry*, 31(3), 729–742. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.9B00853/SUPPL_FILE/BC9B00853_SI_001.PDF
- Kunath, K., Von Harpe, A., Fischer, D., Petersen, H., Bickel, U., Voigt, K., & Kissel, T. (2003). Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 89(1), 113–125. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00076-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00076-2)
- Lächelt, U., Kos, P., Mickler, F. M., Herrmann, A., Salcher, E. E., Rödl, W., ... Wagner, E. (2014a). Fine-tuning of proton sponges by precise diaminoethanes and histidines in pDNA polyplexes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(1), 35–44. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2013.07.008>
- Lächelt, U., Kos, P., Mickler, F. M., Herrmann, A., Salcher, E. E., Rödl, W., ... Wagner, E. (2014b). Fine-tuning of proton sponges by precise diaminoethanes and histidines in pDNA polyplexes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(1), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.07.008>
- Lächelt, U., & Wagner, E. (2015a). Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chemical Reviews*, Vol. 115, pp. 11043–11078. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr5006793>

- Lächelt, U., & Wagner, E. (2015b). Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chemical Reviews*, 115(19), 11043–11078. <https://doi.org/10.1021/CR5006793>
- Li, W., & Szoka, F. C. (n.d.). *Expert Review Lipid-based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery*. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9180-5>
- Liu, Y., Huang, L., & Liu, F. (2010). Paclitaxel Nanocrystals for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 7(3), 863. <https://doi.org/10.1021/MP100012S>
- Lo, Y. L. (2003). Relationships between the hydrophilic-lipophilic balance values of pharmaceutical excipients and their multidrug resistance modulating effect in Caco-2 cells and rat intestines. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 90(1), 37–48. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00163-9)
- Loy, D. M., Klein, P. M., Krzysztoń, R., Lächelt, U., Rädler, J. O., & Wagner, E. (2019). A microfluidic approach for sequential assembly of siRNA polyplexes with a defined structure-activity relationship. *PeerJ Materials Science*, 1, e1. <https://doi.org/10.7717/PEERJ-MATSCI.1>
- Luby-Phelps, K. (2000). Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *International Review of Cytology*, 192, 189–221. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60527-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60527-6)
- Luo, J., Höhn, M., Reinhard, S., Loy, D. M., Klein, P. M., & Wagner, E. (2019). IL4-Receptor-Targeted Dual Antitumoral Apoptotic Peptide—siRNA Conjugate Lipoplexes. *Advanced Functional Materials*, 29(25). <https://doi.org/10.1002/adfm.201900697>
- Luo, J., Wagner, E., & Wang, Y. (2020). Artificial peptides for antitumoral siRNA delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(10), 2020–2031. <https://doi.org/10.1039/c9tb02756d>
- Lutz, J. F., Ouchi, M., Liu, D. R., & Sawamoto, M. (2013). Sequence-Controlled Polymers. *Science*, 341(6146). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1238149>

- Ma, B., Zhang, S., Jiang, H., Zhao, B., & Lv, H. (2007). Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 123(3), 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.08.022>
- Martin, B., Sainlos, M., Aissaoui, A., Oudrhiri, N., Hauchecorne, M., Vigneron, J.-, ... Lehn, P. (2005). The design of cationic lipids for gene delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 11(3), 375–394. <https://doi.org/10.2174/1381612053382133>
- Midoux, P., & Monsigny, M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjugate Chemistry*, 10(3), 406–411. <https://doi.org/10.1021/BC9801070>
- Ming Hsu, C. Y., & Uludağ, H. (2012). A simple and rapid nonviral approach to efficiently transfect primary tissue-derived cells using polyethylenimine. *Nature Protocols*, 7(5), 935–945. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2012.038>
- Mintzer, M. A., & Simanek, E. E. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical Reviews*, 109(2), 259–302. <https://doi.org/10.1021/CR800409E>
- Niidome, T., & Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Therapy*, 9(24), 1647–1652. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3301923>
- Nugent, M. A., Forsten-Williams, K., Karnovsky, M. J., & Edelman, E. R. (2005). Mechanisms of cell growth regulation by heparin and heparan sulfate. *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*, 533–570. <https://doi.org/10.1016/B978-008044859-6/50020-4>
- O’Loinsigh, E., & Bose, A. (2019). Regulatory Considerations for the Use of Biomarkers and Personalized Medicine in CNS Drug Development: A European Perspective. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 29, 259–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803161-2.00019-9>

- Olim, F., Neves, A. R., Vieira, M., Tomás, H., & Sheng, R. (2021). Self-Assembly of Cholesterol-Doxorubicin and TPGS into Prodrug-Based Nanoparticles with Enhanced Cellular Uptake and Lysosome-Dependent Pathway in Breast Cancer Cells. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 123(5), 2000337. <https://doi.org/10.1002/EJLT.202000337>
- Olins, D. E., Olins, A. L., & von Hippel, P. H. (1967). Model nucleoprotein complexes: Studies on the interaction of cationic homopolypeptides with DNA. *Journal of Molecular Biology*, 24(2), 157–176. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(67\)90324-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(67)90324-5)
- Pezzoli, D., & Candiani, G. (2013). Non-viral gene delivery strategies for gene therapy: A “ménage à trois” among nucleic acids, materials, and the biological environment: Stimuli-responsive gene delivery vectors. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(3). <https://doi.org/10.1007/S11051-013-1523-7>
- Piotrowski-Daspi, A. S., Kauffman, A. C., Bracaglia, L. G., & Saltzman, W. M. (2020). Polymeric Vehicles for Nucleic Acid Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156, 119. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.06.014>
- Plank, C., Tang, M. X., Wolfe, A. R., & Szoka, F. C. (1999). Branched cationic peptides for gene delivery: Role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes. *Human Gene Therapy*, 10(2), 319–332. <https://doi.org/10.1089/10430349950019101>
- Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquível, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences : Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 26(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2005.06.001>
- Radchatawedchakoon, W., Thongbamrer, C., Konbamrung, W., Khattawee, P., Sakee, U., Roobsoong, W., ... Yingyongnarongkul, B. E. (2020). The effect of polar headgroups and spacer length on the DNA transfection of cholesterol-based cationic lipids. *RSC Medicinal Chemistry*, 11(2), 212. <https://doi.org/10.1039/C9MD00459A>

- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., & Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, 377(Pt 1), 159. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>
- Ren, S., Park, M. J., Sah, H., & Lee, B. J. (2008). Effect of pharmaceutical excipients on aqueous stability of rabeprazole sodium. *International Journal of Pharmaceutics*, 350(1–2), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.035>
- Rghei, A. D., Stevens, B. A. Y., Thomas, S. P., Yates, J. G. E., McLeod, B. M., Karimi, K., ... Wootton, S. K. (2021). Production of Adeno-Associated Virus Vectors in Cell Stacks for Preclinical Studies in Large Animal Models. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (172). <https://doi.org/10.3791/62727>
- Salcher, E. E., Kos, P., Fröhlich, T., Badgujar, N., Scheible, M., & Wagner, E. (2012). Sequence-defined four-arm oligo(ethanamino)amides for pDNA and siRNA delivery: Impact of building blocks on efficacy. *Journal of Controlled Release*, 164(3), 380–386. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.023>
- Schaffert, D., Troiber, C., Salcher, E. E., Fröhlich, T., Martin, I., Badgujar, N., ... Wagner, E. (2011). Solid-phase synthesis of sequence-defined T-, i-, and U-shape polymers for pDNA and siRNA delivery. *Wiley Online Library*, 50(38), 8986–8989. <https://doi.org/10.1002/anie.201102165>
- Schaffert, D., Troiber, C., Salcher, E. E., Fröhlich, T., Martin, I., Badgujar, N., ... Wagner, E. (2011). Solid-phase synthesis of sequence-defined T-, i-, and U-shape polymers for pDNA and siRNA delivery. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(38), 8986–8989. <https://doi.org/10.1002/anie.201102165>
- Schatzlein, A. G. (2001). Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress. *Anti-Cancer Drugs*, 12(4), 275–304. <https://doi.org/10.1097/00001813-200104000-00001>

- Thant, Y., Wang, Q., Wei, C., Liu, J., Zhang, K., Bao, R., ... Yu, J. (2021). TPGS conjugated pro-liposomal nano-drug delivery system potentiate the antioxidant and hepatoprotective activity of Myricetin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 66, 102808. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2021.102808>
- The Cell and Gene Therapy Catapult. (2021). Cell and gene therapy clinical trials. Retrieved January 11, 2022, from <https://ct.catapult.org.uk/clinical-trials-database>
- Truebenbach, I., Kern, S., Loy, D. M., Höhn, M., Gorges, J., Kazmaier, U., & Wagner, E. (2019). Combination Chemotherapy of L1210 Tumors in Mice with Pretubulysin and Methotrexate Lipo-Oligomer Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 16(6), 2405–2417. https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.9B00038/SUPPL_FILE/M9B00038_SI_001.PDF
- Truebenbach, I., Zhang, W., Wang, Y., Kern, S., Höhn, M., Reinhard, S., ... Wagner, E. (2019). Co-delivery of pretubulysin and siEG5 to EGFR overexpressing carcinoma cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118570>
- Wang, X. L., Xu, R., Wu, X., Gillespie, D., Jensen, R., & Lu, Z. R. (2009). Targeted systemic delivery of a therapeutic siRNA with a multifunctional carrier controls tumor proliferation in mice. *Molecular Pharmaceutics*, 6(3), 738–746. <https://doi.org/10.1021/MP800192D>
- Wang, Y., Luo, J., Truebenbach, I., Reinhard, S., Klein, P. M., Höhn, M., ... Zhang, W. (2020). Double Click-Functionalized siRNA Polyplexes for Gene Silencing in Epidermal Growth Factor Receptor-Positive Tumor Cells. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(2), 1074–1089. https://doi.org/10.1021/ACSBBIOMATERIALS.9B01904/SUPPL_FILE/AB9B01904_SI_001.PDF
- Wang, Y., & Wagner, E. (2020). Non-viral targeted nucleic acid delivery: Apply sequences for optimization. *Pharmaceutics*, 12(9), 1–31. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090888>

- Wells. (2004). Gene Therapy Progress and Prospects: Electroporation and other physical methods DJ Wells. *Gene Therapy*, 11, 1363–1369. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302337>
- Witzigmann, D., Wu, D., Schenk, S. H., Balasubramanian, V., Meier, W., & Huwyler, J. (2015). Biocompatible polymer-peptide hybrid-based DNA nanoparticles for gene delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(19), 10446–10456. https://doi.org/10.1021/ACSAMI.5B01684/SUPPL_FILE/AM5B01684_SI_001.PDF
- Zhang, P, He, D., Klein, P., Liu, X., ... R. R.-A. F., & 2015, undefined. (2015). Enhanced Intracellular Protein Transduction by Sequence Defined Tetra-Oleoyl Oligoaminoamides Targeted for Cancer Therapy. *Wiley Online Library*, 25(42), 6627–6636. <https://doi.org/10.1002/adfm.201503152>
- Zhang, Peng, Steinborn, B., Lächelt, U., Zahler, S., & Wagner, E. (2017). Lipo-Oligomer Nanoformulations for Targeted Intracellular Protein Delivery. *Biomacromolecules*, 18(8), 2509–2520. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00666>
- Zhang, Y., & Anchordoquy, T. J. (2004). The role of lipid charge density in the serum stability of cationic lipid/DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1663(1–2), 143–157. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2004.03.004>
- Zhang, Z. Y., & Smith, B. D. (2000). High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model. *Bioconjugate Chemistry*, 11(6), 805–814. <https://doi.org/10.1021/BC000018Z>
- Zheng, P. P., Kros, J. M., & Li, J. (2018). Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discovery Today*, 23(6), 1175–1182. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2018.02.012>
- Zhi, D., Zhang, S., Cui, S., Zhao, Y., Wang, Y., & Zhao, D. (2013). The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 24(4), 487–519. <https://doi.org/10.1021/BC300381S>

Teşekkür

Her daim güler yüzü ve motive edici konuşmalarıyla beni cesaretlendiren, bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda destek olan değerli hocam Prof. Dr. Ayşe Gülten KANTARCI'ya,

Tez sürecim boyunca her zaman yanımda olan, sonsuz desteğini gördüğüm, sabrını, anlayışını ve malzemelerini benden esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KOTMAKÇI'ya,

Eğitimim boyunca her zorlandığım zamanda motive edici konuşmalarıyla devam etmek için bana cesaret veren ve yol gösteren, Laboratuvarı'nın tüm imkanlarını benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Zeki TOPÇU'ya,

Bana Farmasötik Biyoteknoloji'nin kapılarını açan, lisans eğitimimde kendisini tanıdığım ilk günden bugüne kadar hep beni destekleyen ve bana cesaret veren değerli hocam İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı Doç. Dr. Emine ŞALVA'ya

Lisans eğitimimde beni stajyer öğrenci olarak Biyoteknoloji Laboratuvarına kabul eden,engin bilgi birikimiyle bana örnek olan, değerli hocam Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Eski Başkanı Prof. Dr. Julide AKBUĞA'ya ve muhteşem enerjisi ve bilgisiyle Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ'a

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalımıza mensup değerli hocam Doç. Dr. Yücel BAŞPINAR'a,

Malvern NanoZS cihazını kullanmam için olanak sağlayan Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özgen ÖZER'e,

Floresanan mikroskop cihazını kullanmam için olanak sağlayan Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Yasemin ERAÇ'a,

Flow sitometri cihazını kullanmam için olanak sağlayan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e ve Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a,

Yüksek lisans eğitimine birlikte başladığım ve ders günlerini benim hastaneden izin alabildiğim zamanlara göre ayarlayan, kibar ve beyefendi kişiliğiyle Ecz. SERCAN Karadağ'a,

Çalışma salonunda karşılıklı oturduğumuz, sabahları güne muhteşem espirileriyle başladığım ve bazı laboratuvar çalışmalarında muhteşem anlatımıyla bana yardımcı olan Elif İŞEL'e, her zaman yardım ve desteğini gördüğüm değerli arkadaşım Ecz. Melike ÖZDER'e, sorularıma sabırla cevap veren ihtiyacım olduğunda güler yüzüyle ve güzel enerjisiyle bana destek olan Dr. Ezgi ÖNER'e ve her daim güzel gülümsemesiyle hatırlayacağım Ecz. Selen İSAR'a,

Eğitimim boyunca tüm nöbetlerimi laboratuvar çalışma planıma göre ayarlayan, hem meslektaş hem abla olarak beni sonsuz destekleyen İzmir Ödemiş Devlet Hastanesi sorumlu eczacısı Ecz.Fatma BASMA'ya ve tüm eczane çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca sonsuz sevgi ve desteklerini gördüğüm, her kararında yanımda olan canım annem Feryal KAYMAZ'a, canım kardeşim ve en yakın arkadaşım Ass. Dr. Halil KAYMAZ'a,

Çok teşekkür ederim.

İzmir, 14.09.2022

Ayşenur KAYMAZ

Özgeçmiş

Ayşenur KAYMAZ

Eczacı

Eğitim:

2019 –Şu an	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Yüksek Lisans Öğrenimi
2010-2015	İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Lisans Öğrenimi
2004-2008	Şanlıurfa Anadolu Lisesi (İngilizce Eğitim) Lise

İş Deneyimi:

2022-Şu an	İzmir Urla Devlet Hastanesi- Eczacı
2019- 2022	İzmir Ödemiş Devlet Hastanesi- Eczacı
2016-2019	Manisa Soma Devlet Hastahanesi-Eczacı

Stajlar

2015	Onur Eczanesi (Malatya)- Stj . Eczacı
2014	Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji A.D.
2013	Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hastanesi-,Stj. Eczacı
2012	Işıl Eczanesi (Şanlıurfa) - Stj. Eczacı

Projeler

TÜBİTAK 2209 / A: shVEGF içeren kitozan nanoplekslerinin meme kanser hücre hatlarında hücre invazyonu, proliferasyonu ve koloni oluşturma üzerine etkilerinin araştırılması.

İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji A.D.

Malatya, 2014

Bitirme Tezi

GM-CSF plazmidini içeren kitozan hidrojellerinin geliştirilmesi; *In Vitro* Çalışmalar.

İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji A.D.

Malatya, 2015

Sertifikalar

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (B), 2014

Certificate Of Animal Use In Experimental Research (B), 2014

Ödüller

2014-2015 Akademik yılı araştırma projeleri arasında ‘GM-CSF Plazmidi İçeren Kitozan Hidrojellerinin Geliştirilmesi; In Vitro Çalışmalar’ en iyi poster ödülü. (İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2015)

Yabancı Diller

İngilizce: İyi Seviye

Almanca: Başlangıç Seviyesi

Hobiler

Scuba diving (CMAS 1Yıldız Sertifikası), Rüzgar sörfü, Yoga

Referanslar

Ayşe Gülten Kantarcı (*Prof.Dr. – Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye*)

Mustafa Kotmakçı (*Dr. Öğr. Üyesi – Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye*)

