



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜ
KODLAYAN GENİN SUSTURULMASINA İLİŞKİN
İN VİTRO ÇALIŞMALAR**

Ecz. FULDEN ERDEM ÇAKMAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Suna ÖZBAŞ-TURAN

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()

Anabilim Dalı : M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Sahibi : Ecz. Fulden ERDEM ÇAKMAK

Tez Başlığı : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünü Kodlayan Genin
Susturulmasına İlişkin İn Vitro Çalışmalar

Sınav Yeri : M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 05 Şubat 2010

**Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora
Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Yrd. Doç. Dr. Suna ÖZBAŞ TURAN	M.Ü. Eczacılık Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Jülide AKBUĞA	M.Ü. Eczacılık Fakültesi	
Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG	M.Ü. Eczacılık Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Suna ÖZBAŞ TURAN	M.Ü. Eczacılık Fakültesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimet GENÇOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

12 Ocak 2010

Ecz. Fulden ERDEM ÇAKMAK

I. TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, her türlü olanağı sağlayan, her zaman örnek aldığım çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Jülide AKBUĞA'ya,

Tez çalışmasına başladığım günden beri desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarımda büyük emeği geçen, her zaman ihtiyaç duyduğumda beni bıkıp usanmadan dinleyen, pratik çalışmalarımda örnek aldığım ve bilgilerinden faydalandığım değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Suna ÖZBAŞ TURAN'a,

Çalışmam sırasında psikolojik desteğiyle ve yönlendirmeleriyle cesaretli ve planlı bir süreç geçirmemi sağlayan tez izleme komitemin çok değerli üyesi Sayın Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG'a,

Deneyisel aşamada tecrübesiyle katkıda bulunan, SEM mikroskobu çalışmalarında destek aldığım ve moraliimi daima yüksek tutan sevgili hocam Sayın Emine ŞALVA'ya,

Çalışmam süresince hep yanımda olan, bana inanan, akademik yaşamın zorluklarına rağmen beni her zaman cesaretlendiren, bu tezi tamamlamamda beni güçlendiren sevgili kardeşim Melike ERDEM'e,

Maddi-manevi her türlü ihtiyacımı karşılayan, yaşamımda en büyük desteğim, canımdan çok sevdiğim, yardımlarını esirgemeyen, elim kolum her şeyim sevgili anneciğim Sabahat ERDEM'e,

Tez çalışması süresince eczanemde bana büyük destek olan sevgili küçük kardeşim Neslihan ERDEM'e,

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan ve uzun çalışma saatlerinde beni gönülden destekleyen sevgili eşim Fatih ÇAKMAK'a ve oğluma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-300409-0096 numaralı proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. RNA İnterferans	6
4.1.1. RNAi mekanizması.....	7
4.1.2. siRNA Yapısı ve Özellikleri.....	10
4.1.3. İn Vitro siRNA taşınması.....	11
4.1.4. siRNA'nın Viral Vektörlerle Taşınması.....	11
4.1.5. siRNA'nın Viral Olmayan Vektörlerle Taşınması.....	15
4.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	19
4.2.1. VEGF Geninin Yapısı.....	20
4.2.2. VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	20
4.2.2.1. Hipoksi.....	20
4.2.2.2. Sitokinler.....	21
4.2.2.3. Farklılaşma ve Transformasyon.....	22
4.2.3. VEGF Üyeleri ve Yapısı.....	22
4.2.3.1. VEGF-A.....	22
4.2.3.2. VEGF-B.....	25
4.2.3.3. VEGF-C.....	25
4.2.3.4. VEGF-D.....	26
4.2.3.5. VEGF-E.....	26
4.2.3.6. PlGF.....	26
4.2.4. VEGF Reseptörleri ve Benzeri Etkili Reseptörler.....	26
4.2.4.1. VEGF Reseptör1.....	26
4.2.4.2. VEGF Reseptör2	28
4.2.4.3. VEGF Reseptör 3.....	29
4.2.4.4. Nörofilinler.....	30
4.2.4.5. Heparan Sülfat.....	31

4.3. Anjiogenez.....	31
4.3.1. Anjiogenik Dönüşüm.....	33
4.3.2. Anjiogenez Basamakları.....	33
4.3.3. Anjiogenez ve Kanser.....	39
4.3.4. Kanserde siRNA Aracılığı İle VEGF Gen İnhibisyonu.....	41
4.4. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler.....	46
4.4.1. Kitozanın Yapısı ve Elde Edilmesi.....	46
4.4.2. Kitozanın Fizikokimyasal Özellikleri.....	48
4.4.3. Kitozanın Genel Kullanımı.....	49
4.4.4. Gen Taşıyıcı Sistem Olarak Kitozan.....	50
4.4.5. siRNA Taşıyıcı Sistem Olarak Kitozan ve Kullanılan Farmasötik.....	
Şekiller.....	56
4.5. Protamin Hakkında Genel Bilgiler.....	60
4.5.1. Protaminin Yapısı.....	61
4.5.2. Protaminin Gen Tedavisinde Kullanımı.....	63
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	66
5.1. GEREÇ.....	66
5.1.1. Kimyasal Sarf Malzemesi.....	66
5.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	68
5.1.3. Plazmid siRNA (Short Hairpin), shRNA Yapısı.....	70
5.1.4. Kullanılan Hücre Hatları.....	71
5.1.5. Besiyerleri ve Çözeltiler.....	72
5.1.5.1. Besiyerleri.....	72
5.1.5.2. Çözeltiler.....	73
5.2. YÖNTEM.....	79
5.2.1. shRNA İle İlgili Çalışmalar.....	79
5.2.1.1. shRNA.....	79
5.2.1.2. shRNA'nın Transformasyonu.....	79
5.2.1.3. shRNA'nın İzolasyonu.....	79
5.2.1.4. shRNA'nın Kontrolü.....	81
5.2.2. shRNA İçeren Farmasötik Şekillerin Hazırlanması.....	83
5.2.2.1. Kitozan/shRNA Komplekslerinin Hazırlanması.....	83

5.2.2.2. Protamin/shRNA Komplekslerinin Hazırlanması.....	83
5.2.2.3. Kitozan/Protamin/shRNA Komplekslerinin Hazırlanması.....	84
5.2.2.4. shRNA İçeren Kitozan Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	84
5.2.3. shRNA İçeren KomplekslerdeYapılan Kontroller	85
5.2.3.1. Kompleks Oluşumunun Saptanması.....	85
5.2.3.2. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri.....	85
5.2.3.3. Kompleks Boyutunun Tayini.....	86
5.2.3.4. Yüzey Yük Tayini.....	86
5.2.3.5. Komplekslerin Serum Stabilitesi	86
5.2.3.6. Nükleaz Stabilitesi.....	86
5.2.4. shRNA İçeren Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller.....	87
5.2.4.1. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri.....	87
5.2.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İncelemeleri.....	87
5.2.4.3. Verim ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Saptanması.....	87
5.2.4.4. Nanopartikül Boyutunun Tayini.....	87
5.2.4.5. Yüzey Yük Tayini.....	88
5.2.4.6. İn Vitro Stabilite Çalışmaları.....	88
5.2.4.7. İn Vitro Salım Çalışmaları	88
5.2.4.8. Nanopartiküllerin Serum Stabilitesi.....	88
5.2.4.9. Nükleaz Stabilitesi.....	89
5.2.5. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmaları.....	89
5.2.5.1. Hücre Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi.....	
Çalışmaları.....	90
5.2.5.2. Kompleksler İle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları.....	90
5.2.5.3. Nanopartiküller İle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları.....	92
5.2.6. İn Vitro Gen İnhibisyonunun Tayini.....	92
5.2.6.1. Floresan Mikroskobu İncelemeleri.....	92
5.2.6.2. VEGF'in ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi...	
İle Tayini.....	92
5.2.7. Taşıyıcı Sistemlerin İn Vitro Sitotoksitesitesi.....	93
5.2.8. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	93

6. BULGULAR.....	94
6.1. shRNA İle İlgili Çalışmalara İlişkin Bulgular.....	94
6.1.1. shRNA İzolasyonuna İlişkin Bulgular.....	94
6.1.2. shRNA'nın Kontrolüne İlişkin Bulgular.....	94
6.1.2.1.shRNA'nın Spektrofotometrik Kontrolüne İlişkin Bulgular.....	94
6.1.2.2. shRNA'nın Elektroforetik Kontrolüne İlişkin Bulgular.....	95
6.1.2.3. shRNA'nın Standart Eğrisinin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular.....	96
6.2. shRNA İçeren Farmasötik Şekillerin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular.....	98
6.2.1. Kitozan/shRNA Komplekslerinin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular.....	98
6.2.2. Protamin/shRNA Komplekslerinin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular.....	98
6.2.3. Kitozan/Protamin/shRNA Komplekslerinin Hazırlanmasına İlişkin.....	
Bulgular.....	99
6.2.4. shRNA İçeren Kitozan Nanopartiküllerin Hazırlanmasına İlişkin	
Bulgular.....	99
6.3. shRNA İçeren Komplekslerde Yapılan Kontrollere İlişkin Bulgular.....	99
6.3.1. Kompleks Oluşumunun Saptanması.....	99
6.3.1.1. Kitozan/shRNA Kompleks Oluşumuna İlişkin Bulgular.....	99
6.3.1.2. Protamin/shRNA Kompleks Oluşumuna İlişkin Bulgular.....	100
6.3.1.3. Kitozan/Protamin/shRNA Kompleks Oluşumuna İlişkin Bulgular.....	104
6.3.2. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemelerine İlişkin.....	
Bulgular.....	105
6.3.3. Büyüklük Tayinine İlişkin Bulgular	107
6.3.4. Yüzey Yüğü Tayinine İlişkin Bulgular.....	107
6.3.5. Serum Stabilitesine İlişkin Bulgular	109
6.3.6. Nükleaz Stabilitesine İlişkin Bulgular	109
6.4. shRNA İçeren Nanopartiküllerde Yapılan Kontrollere İlişkin Bulgular...	110
6.4.1. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri.....	110
6.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İncelemelerine İlişkin Bulgular.	111
6.4.3. Verim ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Saptanmasına İlişkin Bulgular...	113
6.4.4. Büyüklük Tayinine İlişkin Bulgular.....	115
6.4.5. Yüzey Yüğü Tayinine İlişkin Bulgular.....	115
6.4.6. İn Vitro Stabilité Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	116

6.4.7. İn Vitro Salm Çalışmalarına İlişkin Bulgular	117
6.4.8. Serum Stabilitesi Çalışmalarına İlişkin Bulgular	129
6.4.9. Nükleaz Stabilitesi Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	130
6.5. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	130
6.5.1. Kompleksler İle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	130
6.5.2. Nanopartiküller İle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	131
6.6. İn Vitro Gen İnhibisyonunun Tayinine İlişkin Bulgular.....	131
6.6.1. Floresan Mikroskopu İncelemelerine İlişkin Bulgular.....	131
6.6.2. VEGF'in ELISA Yöntemi İle Tayinine İlişkin Bulgular.....	139
6.7. Taşıyıcı Sistemlerin İn Vitro Sitotoksitesine İlişkin Bulgular.....	151
7. TARTIŞMA.....	158
8. KAYNAKLAR.....	176
9.ÖZGEÇMİŞ.....	196

III. KISALTMALAR

a/h	Ağırlık/hacim
a/a	Ağırlık/ağırlık
AAV	Adeno-ortaklaşan virüs
DA	Deasetilasyon Derecesi
ddsu	Double distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAaz I	Deoksiribonükleaz I
DTT	1,4-Dithio-DL-treitol, DL-threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal Growth Factor, (Epidermal büyüme faktörü)
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
h/h	Hacim/hacim
FTS	Fizyolojik tuzlu su
HCl	Hidroklorik Asit
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid
Mwt	Molekül ağırlığı
NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
ng	Nanogram
NH ₄ Ac	NH ₄ CH ₃ COO, (Amonyum asetat)
N-P40	Nonidet P-40
OD	Optik Densite
OD260	260 nm dalga boyundaki optik densite değeri
OD280	280 nm dalga boyundaki optik densite değeri
ON	Oligonükleotid
PBS	Phosphate Buffer Saline, (Fosfat sodyum klorür tamponu)

pDNA	Plazmid DNA
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik ko-glikolik asit
PLL	Poli L-lizin
psiRNA	Plazmid siRNA
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interference
RNAase A	Sığır pankreasından elde edilen pankreatik ribonükleaz A
SDS	Sodyum dodesil sülfat, (Sodyum lauril sülfat)
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Poliakrilamit Jel elektroforezi
SEM	Scanning Electron Microscopy, (Taramalı Elektron Mikroskobu)
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small Interfering RNA
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TBE	Tris-Borik Asit EDTA
TE	Tris/EDTA
TEM	Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
TPP (STTP)	Sodium tripolifosfat pentabazik
Tris	Trizma® base, 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
Tris-HCl	Hidroklorik Asit ile pH Değeri Ayarlanmış Tris Çözeltisi
Tris-PO4	Tris-fosfat Tamponu
Triton® X-100	Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
λDNA/HindIII	Hind III restriksiyon endonükleazı ile kesilmiş λ faj DNA'sı
µg	Mikrogram
µg/ml	Mikrogram/mililitre
µl	Mikrolitre

IV. ŞEKİL, TABLO ve RESİMLERİN LİSTESİ

İ. ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.1. Dicer Enziminin domain yapısı.

Şekil 4.2. RISC protein kompleksinin domain yapısı.

Şekil.4.3. VEGF tirozin kinaz reseptörlerinin yapısı

Şekil 4.4. VEGFR-1,2,3 ve Nörofilin reseptörüne bağlanabilen moleküller

Şekil.4.5. Vasküler endotelyumda VEGF isoformlarının faaliyeti

Şekil.4.6. Anjiogenez prosesi

Şekil 4.7. Kanser hücresine VEGF-hedeflenen siRNA ya da shRNA salımının şematik şekli

Şekil 4.8. Sellüloz ve kitinin moleküler yapısı

Şekil. 4.9. a) Kitozan yapısı [poli (1-4-D-glukozamin)]

b) Çapraz bağlantılı kitozan yapısı

Şekil 4.10. Fare protamin gen sekansı.

Şekil 5.1. psiRNA-mVEGF plazmidinin yapısı (shRNA-mVEGF ticari ismi).

Şekil 6.1.1. psiRNA-mVEGF plazmidine ait UV spektrumu.

Şekil 6.1.2. psiRNA-mVEGF plazmid vektörüne ait standart eğri.

Şekil 6.4.1. Kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarından shRNA'nın in vitro salım profili.

Şekil 6.4.2. +4°C'da gerçekleştirilen stabilite çalışması 1. ay sonu shRNA salım profili

Şekil 6.4.3. 37°C'da gerçekleştirilen stabilite çalışması 1. ay sonu shRNA salım profili

Şekil 6.4.4. +4°C'da gerçekleştirilen stabilite çalışması 2. ay sonu shRNA salım profili.

Şekil 6.4.5. 37°C'da gerçekleştirilen stabilite çalışması 2. ay sonu shRNA salım profili.

Şekil 6.4.6. +4°C'da gerçekleştirilen stabilite çalışması 3. ay sonu shRNA salım profili.

Şekil 6.4.7. 37°C'da gerçekleştirilen stabilite çalışması 3. ay sonu shRNA salım

profil.

Şekil 6.4.8. L₁ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

Şekil 6.4.9. M₁ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

Şekil 6.4.10. H₁ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

Şekil 6.4.11. L₂ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

Şekil 6.4.12. M₂ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

Şekil 6.4.13. H₂ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

Şekil 6.4.14. L₁ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).

Şekil 6.4.15. M₁ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).

Şekil 6.4.16. H₁ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).

Şekil 6.4.17. L₂ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).

Şekil 6.4.18. M₂ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).

Şekil 6.4.19. H₂ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).

Şekil 6.6.1. huVEGF standart eğrisi.

Şekil 6.6.2. shRNA komplekslerinin farklı hücre dizilerinde in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF gen ekspresyonunun susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar-1.

Şekil 6.6.3. shRNA komplekslerinin farklı hücre dizilerinde in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF gen ekspresyonunun susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar-2.

Şekil 6.6.4. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerinin farklı hücre dizilerinde in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF gen ekspresyonunun susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar-1.

Şekil 6.6.5. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerinin farklı hücre dizilerinde in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF gen ekspresyonunun susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar-2.

Şekil 6.7.1. shRNA komplekslerine ait sitotoksosite çalışması sonuçları-1 (MTT).

Şekil 6.7.2. shRNA komplekslerine ait sitotoksosite çalışması sonuçları-2 (MTT).

Şekil 6.7.3. shRNA komplekslerine ait sitotoksosite çalışması sonuçları-3 (MTT).

Şekil 6.7.4. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarına ait sitotoksosite çalışması sonuçları-1 (MTT).

Şekil 6.7.5. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarına ait

sitotoksisite çalışması sonuçları-2 (MTT).

Şekil 6.7.6. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarına ait sitotoksisite çalışması sonuçları-3 (MTT).

İİ. TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo 4.5. Anjiogenik faktörler ve angjogenezi önleyen faktörler.

Tablo 4.6. Klinik tedaviler için geliştirilen siRNA terapötikleri.

Tablo 5.2.1. Kitozan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin formülasyon parametreleri.

Tablo 6.1.1. shRNA standart eğri çizimine ilişkin değerler.

Tablo 6.3.1. Komplekslere ait partikül ve yüzey yükü ölçüm sonuçları.

Tablo 6.4.1. Kitozan nanopartikül formülasyonlarına ait verim ve enkapsülasyon etkinliği değerleri.

Tablo 6.4.2. Nanopartikül formülasyonlarına ait boyut ve yüzey yükü ölçüm sonuçları.

Tablo 6.4.3. 3. ay in vitro stabilite çalışması sonuçları.

Tablo 6.6.1. huVEGF ELİSA kit standart eğri çizimine ilişkin değerler.

Tablo 6.6.2. shRNA kompleks formülasyonlarının HeLa hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

Tablo 6.6.3. shRNA kompleks formülasyonlarının HEK293 hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

Tablo 6.6.4. shRNA kompleks formülasyonlarının MCF-7 hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

Tablo 6.6.5. shRNA nanopartikül formülasyonlarının HeLa hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

Tablo 6.6.6. shRNA nanopartikül formülasyonlarının HEK293 hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

Tablo 6.6.7. shRNA nanopartikül formülasyonlarının MCF-7 hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

iii. RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 6.1.1. psiRNA-mVEGF plazmidinin agaroz jel fotoğrafı.

Resim 6.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki psiRNA-mVEGF plazmidine ait agaroz jel fotoğrafı.

Resim 6.2.1. Protamin'in SDS-PAGE görüntüsü.

Resim 6.3.1. Kitozan/shRNA komplekslerine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

Resim 6.3.2. Farklı yük oranlarında protamin/shRNA kompleks oluşumu.

Resim 6.3.3. 1/1(a/a) protamin/shRNA oranında su ve PBS kullanılarak hazırlanmış kompleksler.

Resim 6.3.4. Protamin/shRNA komplekslerinin oluşumuna farklı çözücülerin etkisi.

Resim 6.3.5. Protamin/shRNA kompleks oluşumunun zamana bağlı değişimi.

Resim 6.3.6. Farklı çözücülerde 1/1 ve 0.5/1 (a/a) hazırlanmış protamin/shRNA komplekslerinin liyofilizasyon öncesi ve sonrası elektroforetik analizine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

Resim 6.3.7. Kitozan/protamin/shRNA komplekslerinin elektroforetik analizine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

Resim 6.3.8. Protamin/shRNA komplekslerine ait TEM görüntüsü.

Resim 6.3.9. Kitozan/protamin/shRNA komplekslerine ait TEM görüntüsü.

Resim 6.3.10. 1/1 ağırlık oranındaki protamin/shRNA komplekslerinin serum stabilitesine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

Resim 6.3.11. 1/1 (a/a) oranındaki protamin/shRNA komplekslerinin DNAaz I stabilitesine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

Resim 6.4.1. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerine ait TEM görüntüsü.

Resim 6.4.2. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerine ait SEM görüntüsü (4kX)

Resim 6.4.3. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerine ait SEM görüntüsü (5kX)

Resim 6.4.4. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerine ait SEM görüntüsü (10kX)

Resim 6.4.5. Nanopartikül formülasyonlarından serbestleşen shRNA'ya ait agaroz jel resmi.

Resim 6.4.6. Serum ve Nükleaz muamelesi sonrasında kitozan nanopartikül formülasyonlarından serbestleşen shRNA'ya ait agaroz jel fotoğrafı.

Resim 6.6.1. 0.5/1 (a/a) oranında protamin/shRNA kompleksleri ile farklı hücre tiplerinde in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

Resim 6.6.2. 1/1 (a/a) oranında protamin/shRNA kompleksleri ile farklı hücre tiplerinde in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

Resim 6.6.3. 2/1 (a/a) oranında protamin/shRNA kompleksleri ile farklı hücre tiplerinde in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

Resim 6.6.4. 0.5/1/1 (a/a) oranında kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

Resim 6.6.5. 1/1/1 (a/a) oranında kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

Resim 6.6.6. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

1.ÖZET

Gen tedavisi, genetik defektlerin düzeltilmesi amacıyla genetik materyalin aktarımı ve hatalı veya fazla çalışan genlerin susturulması olarak da tanımlanan multidisipliner bir çalışma alanıdır. Anjiogenez tümör gelişiminde önemli bir basamaktır. Dolayısıyla anjiogenezi susturmak, gen tedavisinde etkili bir yaklaşımdır. Son yıllarda, gen ekspresyonunun inhibisyonu, kısaca RNAi (RNA interferans), başta kanser olmak üzere birçok önemli hastalıkların tedavisinde geleneksel tedavilere alternatif olarak araştırılmaktadır. Ancak shRNA ile tedavide, en önemli sorun bu moleküllere karşı hücre membranı permeabilitesinin zayıf olmasıdır. Bu amaçla çalışmamızda, anjiogenik bir protein olan VEGF'in inhibisyonu için pozitif yüklü, doğal ve biyouyumlu bir polimer olan kitozan ve peptid yapıda protamin ile hazırlanan kompleks ve nanopartikül formülasyonlarının shRNA taşıyıcı potansiyeli araştırılmıştır. VEGF-A shRNA içeren kitozan, protamin ve kitozan/protamin kompleksleri ile kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve in vitro karakterizasyonları yapılmıştır. Komplekslerin ve nanopartiküllerin HEK293, HeLa ve MCF-7 hücre hatlarında in vitro transfeksiyon etkinliği ve gen inhibisyonu özellikleri incelenmiştir. Kullanılan polimerler ile ortalama 299nm, 253nm, 338nm boyutlarında ve +8-28mV, -12-9mV, +8-21mV yük değerinde kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA kompleksleri elde edilmiştir. Ayrıca 280nm boyutunda ve 8-21mV yük değerinde shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikülleri hazırlanmıştır. Taşıyıcı sistemler, VEGF-A shRNA'yı serum ve nükleaz degradasyonuna karşı korumuştur. Nanopartikül formülasyonları ile uzun süreli kontrollü bir salım profili elde edilmiştir. Taşıyıcı sistemler ile in vitro transfeksiyon çalışmalarında maximum VEGF-A gen inhibisyonu 1/2/1 kitozan/protamin/shRNA kompleksleriyle HEK293 hücrelerinde sağlanmıştır (%98; HEK293>HeLa>MCF-7). Kompleksler (kitozan/protamin/shRNA> protamin/shRNA > kitozan/shRNA) ile nanopartiküllere ($\approx$ %50) kıyasla daha yüksek düzeyde VEGF gen inhibisyonu elde edilmiştir. Sonuç olarak kitozan ve protamin esaslı taşıyıcı sistemler ile VEGF-A shRNA'nın formülasyonu ve etkin bir gen transferi mümkündür. Elde edilen veriler, RNAi teknolojisinde, VEGF-A shRNA stabilitesi ve transferi çalışmalarına önemli ölçüde katkıda bulunacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler; RNAi, kitozan, protamin, nanopleks, nanopartikül

2.SUMMARY

IN VITRO STUDIES ON THE SILENCING OF THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENE

Gene therapy is a multidisciplinary area with the purpose of transferring genetic material, inhibiting defective or amplified genes for the correction of genetic defects. Angiogenesis is an important step in the development of tumor. Therefore, inhibiting angiogenesis is an effective approach in gene therapy. In recent years, the inhibition of the gene expression, in other words RNAi (RNA interference) is heavily researched as an alternative to the traditional treatments of many important diseases including cancer. However, the most important problem in shRNA therapy is that these molecules against the cell membrane permeability weak. For this purpose in our thesis study, for the inhibition of VEGF which is an angiogenic protein; the complex which is prepared with positive charged, natural and biocompatible polymer chitosan and protamine which is a peptide and the potential of nanoparticle formulations with shRNA carrier were investigated. The chitosan/TPP nanoparticles formulations are prepared with chitosan containing VEGF-A shRNA, protamine and chitosan/protamine complexes, and in vitro characterization is done. In vitro transfection efficiency and gene inhibition properties of complexes and nanoparticles are analyzed in HEK293, HeLa and MCF-7 cell lines. With the used polymers, averagely 299nm, 253nm, 338nm sized and 8-28mV, -12-9 mV, 8-21mV surface charged chitosan/shRNA, protamine/shRNA and chitosan/protamine/shRNA complexes are obtained. Furthermore, 280 nm sized and 8-21 surface charged shRNA containing chitosan/TPP nanoparticles were prepared. The carrier systems protected VEGF-A shRNA against serum and nuclease degradation. A long term controlled release profile has been obtained with the nanoparticle formulations. With carrier systems, In in vitro transfection studies the most highest VEGF-A gene inhibition was obtained with 1/2/1 chitosan/protamine/shRNA complexes in HEK293 cell line (%98, HEK293>HeLa>MCF-7). We obtained more higher VEGF gene inhibition compared with complexes (chitosan/protamine/shRNA> protamine/shRNA>chitosan/shRNA) and nanoparticles(≈%50). As a result, with chitosan and/or protamine-based carrier systems, formulation of VEGF-A shRNA and effective gene transfer can be possible. The data obtained have the quality to provide significant contribution to VEGF-A shRNA stability and transfer studies in the RNAi technology.

Key Words; RNAi, chitosan, protamine, nanoplex, nanoparticle

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Gen tedavisi, farmasötik ürün olarak genlerin kullanılması yoluyla eksik, bozuk ve istenilen şekilde çalışmayan gene işlevselliğinin kazandırılması için alternatif bir yaklaşımdır. Gen tedavisinde, istenen genin etkili ve yeterli olacak düzeyde hücre içine taşınması, taşınan genin etkinliğini tedavi boyunca sürdürmesi, konakçı hücrenin taşıyıcı sistem ve gene cevabının hücresel ve organizma için uygun şekilde olması ve ayrıca bu genin başka bir hastalığa yol açmaması amaçlanmaktadır ⁽¹¹⁾.

Gen ekspresyonunun inhibisyonu, bir antijen teknolojisi olan RNA interferans teknolojisi olarak da tanımlanan teknikle mümkün olabilmektedir. Proteinlerin işlevlerinin ve aktivitelerinin, baskılanarak ya da durdurularak araştırılması moleküler biyoloji alanında günümüzde üzerinde durulan bir yöntemdir. Hücre kültürü çalışmalarında sekansa spesifik gen inhibisyonu sağlayan RNAi teknolojisi, antisens ve ribozimlere alternatif bir tekniktir. siRNA teknolojisi, daha önceden kullanılan metodlara göre daha güvenilir, etkin ve spesifiktir. Bu teknikte, çok küçük dozda siRNA spesifik olarak ilgili gene bağlanarak protein üretimini durdurmakta ve bu şekilde gen ekspresyonunun inhibisyonu sağlanmaktadır. 2000’li yılların bilimsel buluşu olarak tanımlanan RNAi ile gen susturulması günümüzde tedavisi son derece güç olan başta kanser olmak üzere viral enfeksiyonlar (HIV, hepatit) ve değişik genetik hastalıkların tedavisinde umut kaynağı olmuştur. RNAi teknolojisinin enfeksiyon hastalıkları, nörolojik hastalıklar, kanser, oküler hastalıklar, inflamasyon, apoptozis ve solunum sistemi hastalıklarını tedavi etmek için kullanılan terapötik uygulamalarına ek olarak, bilinmeyen genlerin fonksiyonel analizi açısından da kullanımı çok popülerdir. siRNA temelli ilaçlar çeşitli hastalıklar için faz I ve prelinik aşamalarına gelmiştir ^(3, 70, 132).

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) hem tümör büyümesi, hem de metastaza katılan büyüme faktörlerinden birisidir. Yeni kan damarlarının oluşması olarak da tanımlanan angiogenez tümör gelişmesi ve metastazda önemli bir faktördür. Tümörlerin büyümesinde yeni damarlanmanın engellenmesi ve/veya kısıtlanması, kanser önleyici tedavi olarak kullanımını gündeme getirmektedir. Angiogeneze katılan birçok büyüme faktörü (epidermal büyüme faktör reseptörü, integrinler, MMP

molekülleri, VEGF, siklooksijenaz-2) vardır ⁽⁸⁾. Bunlar arasında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), anjiogenez ile ilişkili birçok basamakta yer almaktadır. VEGF aktivitesinin inhibisyonu yada reseptörlerinin fonksiyonel kaybının çeşitli hayvan tümör modellerinde tümör büyümesi ve metastazı inhibe edebileceği gösterilmiştir ^(8, 51, 113).

Terapötik genlerin hücreye aktarılmasında kullanılan gen taşıyıcı sistemler, viral ve viral olmayan taşıyıcı sistemler olarak sınıflandırılabilir. Viral olmayan taşıyıcı sistemler, üretim ve saflaştırma kolaylığı, güvenli ve stabil olması, kolay uygulanabilmesi ve her boyutta genetik materyali taşıyabilmesi nedeniyle, viral taşıyıcı sistemlere kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Terapötik etki için vektör, yüksek transfeksiyon etkinliğine ve optimal gen anlatımı için uygun promotor-enhancer diziler ile kombine edilebilen, kontrol edilebilir gen dizaynına sahip olmalıdır ⁽¹⁷³⁾. Ayrıca ideal gen taşıyıcı sistemin maliyeti ucuz olmalı, stabil olmalı, biyouyumlu ve biyoparçalanır olmalı, toksik, inflammatuar, immunojenik ve onkojenik özellikte olmamalıdır ^(24, 198). Viral olmayan taşıyıcı sistemler olarak polikationik polimerler, lipidler ve lipozomlar en sıklıkla kullanılan sistemlerdir.

Tez kapsamında, shRNA içeren nanopartikül ve komplekslerin hazırlanmasında kullanılacak olan kitozan; degrade olabilen ve biyodegradable bir biopolimerdir; düşük toksisitesi ve kationik özelliği nedeniyle iyi bir gen-taşıyıcı sistem olarak dikkat çekmektedir ⁽⁸⁶⁾ ve başarılı bir şekilde nükleik asitlerin formülasyonunda kullanılmaktadır. Protamin ise, ısı ile koagüle olmayan kationik yapıda basit bir proteindir. Protamin, günümüzde antisens oligonükleotidlerin (AsODNs) taşınması çalışmalarında denenmektedir ^(15,197). Literatürde protamin nanopartiküller ile gen ekspresyonunu durdurma amaçlı olarak çeşitli çalışmalar mevcuttur ⁽⁴⁹⁾. Weyerman ve ark., 2004; AsODN içeren protamin nanopartiküller hazırlayarak fiziksel karakterizasyonunu ve in vitro transfeksiyon özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmalarında diğer taşıyıcı sistemlere kıyasla (Lipopleks ve lipozom), protamin esaslı nanopartiküler sistemlerin hücreye penetrasyonunun yüksek ve sitotoksitesinin çok düşük olduğunu rapor etmişlerdir ⁽¹¹⁸⁾. Benzer şekilde Dinauer ve ark., 2004 protamine-AsODN nanopartiküler sistemlerin hücre içerisi trafiğini ve HIV-1

transaktivasyonunu ⁽⁴⁹⁾; Kerkman ve ark., 2006 ise CpG oligonükleotidlerinin nanopartiküler formülasyonunda kitozan, jelatin ve protamin kullanımını, formülasyon parametrelerini incelemişler ve protamin'in CpG-ODN esaslı terapötikler için biyoyıkımlanabilir bir taşıyıcı sistem olarak immünstimülasyonu da uyarmadığını bildirmişlerdir.

VEGF, tümör anjiogenezini, tümör büyümesini ve vasküler permeabiliteyi artırır. Hücre göçünü uyarır, apoptozisi baskılar. Polilaktik ko-glikolik asit (50:50) kullanılarak formüle edilen antisens oligonükleotid nanopartikülleri şeklinde hücreye uygulanan VEGF'in enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü incelenmiştir ^(8, 51). Kitozan ve protamin ile oluşturulan nanopartiküllerle ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple tez kapsamında VEGF-A shRNA kitozan ve protamin nanopartikül ve kompleksleri hazırlanacaktır.

shRNA konusu çok yeni bir konudur ve shRNA terapötiklerinin çözümlenmesi gereken pek çok sorunu vardır ^(58, 95). Amacımız, pek çok ciddi hastalığın tedavisinde ümit vadeden shRNA molekülü için uygun bir taşıyıcı sistem geliştirmek ve bu taşıyıcı sistem ile hazırlanan shRNA ilaçlarının tümörde VEGF ekspresyonunu engellemesi amacıyla kullanılabilirliğini *in vitro* olarak araştırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. RNA İnterferans

RNA interferans, çift iplikli RNA'nın hücreye girdiği zaman homolog mRNA zincirinin degradasyonuna yol açması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen baskılama mekanizmasıdır (post-transcriptional gene silencing, PTGS) ⁽⁹³⁾. RNAi mekanizması biyolojik sistemlerde doğal ve evrimsel olarak yüksek düzeyde korunmuş olup, virus kalıtım materyali, transpozonlar gibi hareketli genetik elementlerin istilasına karşı genomu koruyarak hücrel savunmada önemli rol oynayan aynı zamanda istenmeyen yabancı genlerin elimine edilmesi, baskılanması ve gelişimsel yolların düzenlenmesinde de etkili olan bir mekanizmadır ^(1, 178).

RNAi olarak tanımlanan gen baskılama mekanizması ile ilgili ilk veriler 1980'li yılların sonlarına doğru bitkilerin genetik modifikasyonları üzerine yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Transkripsiyon sonrası gen baskılanması olarak ilk kez 1990 yılında Jorgensen ve arkadaşları tarafından Petunya çiçeklerinde tanımlanmıştır. Jorgensen ve arkadaşları çalışmalarında, genetik transformasyon ile petunya bitkisinde pigmentasyonu katalizleyen Antosiyanin üretim basamaklarında yer alan flavonoid enzimlerden chalcone synthase (CHS) ve dihydroflavonol-4-reductase (DFR) ekspresyonundan sorumlu bir genin aktivitesini düzenleyerek koyu mor petunya bitkileri elde etmeyi amaçlamışlardır. Ancak gerçekleştirdikleri ekzojenik gen transformasyonu sonrasında beklenen şekilde çiçek renginin koyulaşmadığını aksine alacalı pigmentasyon ile daha beyaz renkte petunyalardan oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu beklenmeyen durum karşısında yapılan çalışmalar nukleusta transkripsiyonun devam ettiğini ancak transkripsiyon sonrası sitoplazmada hem endojenik hem de ekzojenik gen ürünü mRNA'ların parçalandığını göstermiştir. Daha sonraki araştırmalar, ekzojenik transgenin ekspresyonunun çift zincirli RNA moleküllerinin (dsRNA) oluşumuna neden olduğunu ve dsRNA'ların da organizmada doğal olarak bulunan PTSG'yi başlattığını ortaya koymuştur ^(65, 96, 138). 1992'de Romano ve Macino, petunya bitkisindeki benzer bir PTSG mekanizmasını Neurospora crassa fungusunda gözlemlemişler ve bu olayı "Quelling" olarak adlandırmışlardır ⁽¹⁵⁶⁾. 1995'li yıllara gelindiğinde RNA baskılama mekanizmasında antisense RNA'nın mRNA ile hibridizasyonu ile translasyonun

inhibisyonunun yanı sıra sense RNA ile de gen ekspresyonunun antisense RNA kadar etkili bir şekilde baskılanabileceği Guo ve Kempfue tarafından gösterilmiştir⁽⁷⁹⁾. Sense ve antisense RNA'nın gen ekspresyonunun baskılanması üzerine gösterdiği sinerjik etkinin anlaşılmasından sonra 1998'de Andrew Z. Fire ve Craig Mello ekibi dsRNA'nın gen ekspresyonunu baskılamada sense ve antisense RNA'ya kıyasla 10 kat daha fazla etkili olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar *C. Elegans*'a bir kas proteinini kodlayan genin belirli bir dizisine spesifik dsRNA moleküllerini enjeksiyon yolu ile nakletmişler ve dsRNA enjekte edilen solucanlarda çalışılan kas protein defekti bulunan solucanlarda gözlenen kas seğirmesi fenotipini gözlemlemişlerdir⁽⁶⁵⁾. Elde edilen veriler, gerçekleştirilen genetik ve biyokimyasal çalışmalar bitkilerde, funguslarda ve ardışık olarak *C. Elegans*'ta rapor edilen co-supresyon/PTGS, quelling ve RNAi mekanizmalarının işlemsel olarak benzer olduğunu ve dsRNA indükleyici gen baskılama temeline dayanan bu biyolojik yolların hemen hemen bütün ökaryotik organizmalarda biyolojik süreçte yer aldığını RNAi'nin farklı şekilleri olduğunu ortaya koymuştur. RNAi, *Science* dergisi tarafından 2001'de "yılın molekülü", 2002'de "2002 yılının en önemli bilimsel hamlesi" seçilmiş ve 2006 yılında da RNAi ile ilgili yaptıkları çalışmaları ile Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello adlı araştırmacılar Fizyoloji ve Tıp alanında nobel ödülü almışlardır. Daha sonra memeliler de dahil olmak üzere pek çok organizmada tanımlanmıştır^(2, 55, 65, 178).

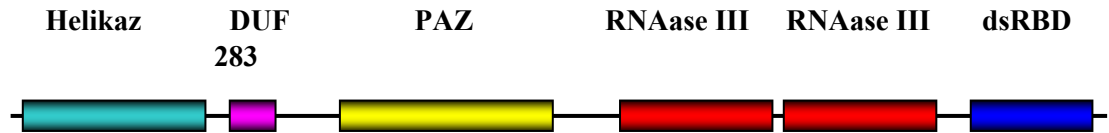
4.1.1. RNAi mekanizması

Genel olarak gen baskılanması 2 şekilde olabilir: Transkripsiyonel gen baskılanması (TGS) ve post transkripsiyonel gen baskılanması (PTGS). TGS, promotör inaktivasyonu sonucu oluşur. PTGS ise; promotör aktif fakat mRNA'lar akümüle olamıyorsa gerçekleşir. TGS'de, DNA metilasyonu, transgenin kromozomal çevresi, repeat-induced DNA metilasyonu ve DNA-DNA etkileşimi gibi faktörler rol oynar. PTGS'de ise; transgenin doğrudan ekspresyonunun rolü, RNA-güdümlü DNA metilasyonu (RdDM), homolog transkriptlerin eliminasyonu gibi konular belirleyicidir. En önemli farklılık olarak, PTGS mekanizması transgene homolog olan tüm RNA'lar üzerinde etkilidir. Viral dizisi olan transgenler kullanıldığında viral RNA'lar, viral olmayan dizi içeren kimerik virüsler kullanıldığında ise yapı

içerisindeki rekombinant diziler degradasyon için hedef alınabilir. Bütün bunların yanı sıra hücre içerisinde oluşabilecek hatalı RNA'ların da PTGS mekanizmasını indüklemeye olasılığı mevcuttur ^(74, 91).

RNAi mekanizması mRNA seviyesinde gen ekspresyonunun durdurulması ile sonuçlanan bir kontrol mekanizmasıdır. Mekanizma temelde; uzun dsRNA'ların RNA nükleazlar tarafından yaklaşık 22-23 nükleotidlik RNA fragmentlerine (siRNA) parçalandığı bir başlangıç ve multinükleaz RISC kompleksi yapısına katılan siRNA'nın rehberliğinde (antisens zincir) komplementer mRNA'nın degradasyonunun gerçekleştiği bir efektör olmak üzere iki basamaklı mekanistik bir olaydır ^(4, 74, 91, 178).

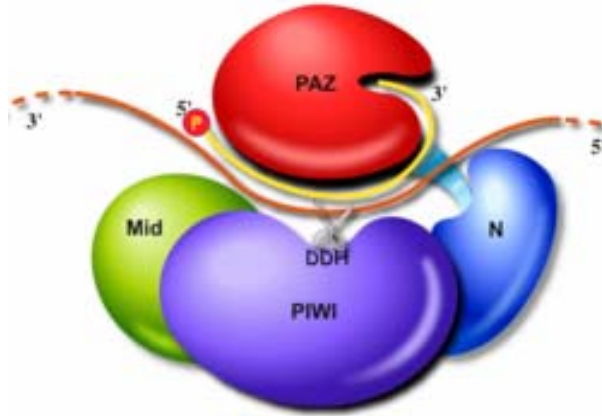
Bu mekanizmada önemli rol oynayan başlıca moleküller/bileşenler vardır; Dicer enzimi (RNAase III) ve RISC (RNA-Induced Silencing Complex, RNA indükleyici baskılama kompleksi). Dicer, ilk olarak *Drosophila melanogaster*'den izole edilmiştir ve RNAase III ailesinin bir üyesidir. Bu nükleazlar sahip oldukları dsRNAase aktivitesi ile dsRNA moleküllerini siRNA (small interfering RNA) olarak adlandırılan 21-23 nükleotid uzunluğunda küçük RNA'lara parçalamaktadırlar. Dicer enzimi, bir N-terminal helikaz domaini, bir PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille proteinlerini içeren domain) domaini, iki katalitik RNAase III domaini ve C-terminalinde bir adet dsRNA bağlanma domaini (dsRBD) olmak üzere yapısı ve fonksiyonu bilinen dört domaine ayrıca yapı ve fonksiyonu günümüz için tam olarak aydınlatılamamış bir DUF 283 domainine sahiptir ^(92, 183) (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Dicer Enziminin domain yapısı (şematize edilmiştir) ^(92, 183).

Dicer enzimi siRNA moleküllerinin oluşturulması işlevi yanı sıra siRNA moleküllerinin RISC kompleksine yüklenmesi aşamasında da önemli rol oynamaktadır ^(91, 183).

RISC, nükleaz aktivitesine sahip RNA-multiprotein kompleksi olup asimetrik olarak siRNA moleküllerine bağlanarak uygun siRNA zincirinin rehberliğinde (antisense zincir) komplementer hedef mRNA'yı degrades eder. RISC, endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimleri yanı sıra Argonaute ailesi içerisinde sınıflandırılan Argonaute proteinlerinin de yer aldığı bir protein kompleksidir ^(86, 91). Yapıdaki Argonaute proteinleri evrimsel süreçte korunmuş iki domain içerirler. Bunlar PAZ ve PIWI domainleridir; PAZ domaini, aynı zamanda dicer enziminde de bulunmaktadır. PIWI domaini ise argonaute proteinlerine spesifiktir. Argonaute proteini RISC kompleksinin temel bileşenidir ve mRNA degradasyonunda temel katalitik bölge olarak görev yapar. PAZ domaini ile rehber zincirin (antisense zincir) 3' ucuna bağlanan RISC kompleksinde, PIWI domaini ise yapısal olarak RNAase H aktif bölgesine eşdeğer işlevi ile mRNA molekülünde kesim işlemini gerçekleştirir ^(36, 183) (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. RISC protein kompleksinin domain yapısı.

(<http://www.nsls.bnl.gov/newsroom/science/2005/1-Joshua-Torr.htm>)

Başlangıç aşamasında; hücre içerisinde sentez edilen uzun dsRNA öncü molekülü PAZ domaininden dicer enzimine bağlanır ve dicer enziminin RNAase III katalitik aktivitesi sonucu 3'OH uçlarında iki nükleotid çıkıntısı bulunan 21-23 nükleotidlik siRNA molekülüne parçalanır. Efektör aşamasında ise; bu siRNA molekülüne termodinamik olarak daha stabil olan 3'OH ucundan dicer enzimi Dcr-2 ve daha az stabil olan 5'PO₄ ucundan ise dsRNA bağlama proteini R2D2 bağlanır. Dcr-2/R2D2 heterodimeri daha sonra RISC'in temel bileşeni olan argonaute proteini Ago2'ye bağladığı siRNA'yı transfer eder. Yapılan son çalışmalar, siRNA'nın Dcr-2/R2D2'den Ago2'ye bir dubleks olarak transfer edildiğini ve Ago2'nin hedef mRNA degradasyonu için gerekli rehber zincir (antisens zincir) dışındaki zinciri ayırarak parçaladığını göstermiştir. Sense zincirin yapıdan ayrılması ATP bağımlı bir reaksiyon ile meydana gelir. Sense zincirin yapıdan ayrılıp parçalanması ile aktif hale geçen RISC kompleksinde antisense zincir Ago2 üzerinde bağlı kalır. Ardışık olarak antisens zincir rehberliğinde hedef mRNA molekülüne yönelen RISC kompleksinde antisense zincir 3'OH ucu ile RISC kompleksinin temel bileşeni olan argonaute proteininin PAZ domainine 5'PO₄ ucu ile de PIWI domainine bağlanır. Argonaute proteininin yapısal olarak RNAase H'ın aktif bölgesine benzer katalitik aktivitesi olan PIWI domaini mRNA'yı antisense zincirin 5' ucundan ölçerek 10. ve 11. nükleotidler arasındaki fosfodiester bağlarını endonükleolitik olarak keser. Fragmentasyona uğrayan mRNA molekülü ATP bağımlı bir reaksiyon ile RISC kompleksinden ayrılır. Sitoplazmada serbest hale geçen mRNA 3' ucundan 5'→3' ekzonükleaz XRN-1 (veya homologları) ile 5' ucu ise eksozom olarak bilinen ekzonükleazların bir kompleksi tarafından parçalanmaktadır ^(86, 91).

RNAi organizmada doğal olarak meydana gelen bir yolak olduğu için bu mekanizmanın etki ve spesifitesi antisense oligonükleotid ve ribozimler gibi diğer nükleik aside dayalı baskılama/susturma mekanizmalarından farklıdır. Bu nedenle de RNAi diğer pek çok klasik antisense teknolojilerine karşı önemli potansiyele sahip alternatif bir mekanizmadır ⁽⁸⁶⁾.

4.1.2. siRNA Yapısı ve Özellikleri

RNAi'nin yaygın kullanımını engelleyen en önemli etken, siRNA'nın farmakokinetiğini, biyolojik stabilitesini ve hedeflenen hücre alımını arttırmak için gerekli olan biyoyoumlu ve mümkünse genouyumlulu taşıma sistemleri geliştirmektir.

4.1.3. İn Vitro siRNA taşınması

siRNA'nın in vitro etkisi, birçok farklı gen ve farklı hücre tipinin ekspresyonunun inhibe edilmesiyle gösterilmiştir. Hücre kültüründe siRNA'nın transfeksiyonu, plazmidler ve diğer gen ekspresyon sistemleri ile karşılaştırıldığında daha kolay gibi görünse de, sonuçlar intrasellüler taşıma araçlarına bağlıdır. Memeli hücrelerine çıplak, siRNA'ların verilmesi ile hedef gen etkin olarak susturulamaz, çünkü; 1) Memeli hücreleri *Caenorhabditis elegans* gibi diğer türlerde bulunan etkin dsRNA alım mekanizmasından yoksundur. 2) siRNA negatif yüklü olduğu için sitoplazmik membranı serbestçe geçemez. 3) Sıvı-faz endositoz ile siRNA'nın alınması siRNA'nın sitoplazmaya salımıyla sonuçlanmaz. Eğer siRNA sitoplazmik kompartmana etkin bir şekilde taşınamazsa diğer RISC komponentleri ile etkileşemez ve RNAi indüklenmez. siRNA taşıyıcı sistemlerin, güvenli, etkin, biyoyoumlu, yan etkisi az, uygulaması kolay ve terapötik kullanımına uygun olarak geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Bugüne kadar birçok farklı nükleik asit taşıma sistemi geliştirilmiştir; viral vektörler ve non-viral yaklaşımlar ile farklı hücre tiplerinde gen ekspresyonunun etkin olarak ve önemli ölçüde modülasyonu başarılmıştır ⁽⁶⁵⁾.

4.1.4. siRNA'nın Viral Vektörlerle Taşınması

Virüs-aracılı siRNA/shRNA taşıma sistemlerinin kullanılmasının başlıca avantajı, diğer yöntemler ile transfeksiyonu zor olan hücrelerde ve hatta bölünmeyen hücrelerde bile kullanılabilmesidir. Viral vektörler hücre içerisine doğal yollardan girer ve diğer transfeksiyon yöntemleri veya viral olmayan vektörlerle karşılaştırıldığında daha yüksek transdüksiyon etkinliği gösterir. Genetik mühendisliğin çabalarıyla, enfeksiyon için temel olmayan viral genler yabancı bir genle değiştirilerek genomlarını konak hücreye transfer etme yeteneğinde olan ve hücre içinde enfektif virüsler oluşturmeyen rekombinant virüsler oluşturulur. Bu

şekilde değiştirilen virüsler hücre içerisine girmek için kendi yöntemlerini kullanırlar ve genomlarının ekspresyonu sonucu taşıdıkları terapötik genin kodladığı protein hücre içerisinde üretilir. Virüsün kendini çoğaltmak için ihtiyaç duyduğu genler, terapötik genler ile yer değiştirmiş olduğundan virüs çoğalıp konak hücrenin ölümüne yol açamaz ^(171, 199).

İn vitro ve in vivo gen transferinde kullanılacak ideal bir viral vektör aşağıda belirtilen tüm özelliklere sahip olmalıdır; 1-Güvenilir olmalıdır. Vektör olarak kullanılan virus, kendisi hastalığa yol açmamalıdır, immün veya inflamatuvar cevap oluşturmamalıdır. 2-Hedef dokuya etkin olarak alınabilmelidir. 3-Pratik olarak kullanılabilmesi için manipulasyonu kolay olmalıdır ve saf halde üretimi yapılabilmelidir ⁽¹⁴⁸⁾.

siRNA/shRNA taşınmasında oldukça uygun olarak kullanılan viral vektörler; Adenovirüs, Adeno-ortaklaşa virüs (AAV), Lentivirüs, Retrovirüs, Herpes ve Baculovirüslerdir. Günümüzde viral vektörler, siRNA taşınmasında sıklıkla kullanılan favori yöntemlerden biri olsa da bazı dezavantajlara sahiptir. Bunlardan bazıları; toksisite, spesifik hücre tiplerine sınırlı hedefleme, üretim ve paketleme problemleri, rekombinasyon ve yüksek maliyettir ^(120, 148).

Retroviral Vektörler

Retrovirüsler tek zincirli, zarflı RNA virüsleridir ve ilk kullanılan viral gen taşıyıcı sistemlerdir. Oldukça yaygın olarak kullanılan retroviral vektörler, murine leukemia virüs (MLV) türevleridir. Retrovirüslerin konak genomuna entegre olması, taşıdıkları genin sürekli ifadesi açısından önemli olmakla birlikte, genoma gelişmiş entegrasyon konak için istenmeyen genlerin aktivasyonuna ya da inaktivasyonuna, mutajenik bir etkiye yol açabilir⁽¹⁷⁾. Buna bağlı gelişen karsinogenite (lenfoma) en önemli dezavantajlarıdır. Retrovirüsler, nükleer membrandan geçememeleri nedeniyle gen transferinin sağlanabilmesi için konak hücrelerin, bölünen hücreler olması zorunluluğu, bu vektörlerin gen transferi ve tedavisinde kullanımına önemli sınırlamalar getirmektedir. Konak aralığı sınırlıdır, sadece bölünen hücrelere spesifik reseptörlere bağlanarak girerler. Retrovirüsler, konak

organizmada immün yanıt oluşturmadaıkları halde, kompleman ile hızla yıkılabilirler ve bu özellikleri de bir dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca retroviral vektörlerin, sınırlı boyutlarda yabancı DNA molekülü taşıma kapasitesine sahip olmaları da önemli bir dezavantajlarıdır. Küçük olmaları nedeniyle taşıyabilecekleri genetik materyal boyutu 4-8 kb kadardır ⁽¹⁸⁾.

Lentiviral Vektörler

Lentiviral vektörler hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte edebilme yeteneğindedir, fakat bölünen hücrelerde daha yüksek transdüksiyon etkinliğine sahiptirler. Retroviral vektörlerin aksine, lentiviral vektörler bölünmeyen hücrelerin çekirdeğine girebilirler. Lentiviral vektörler sınırlı sayıda hücre tipini transdükte edebilirler, fakat yalancı tip lentivirüsler çok sayıda farklı hücre dizisi ve karaciğer, kas, nöronlar, beyin, kök hücreleri ve hematopoietik kök hücreleri gibi dokulara etkin olarak transdükte olabilirler ⁽²¹³⁾. Bu yaklaşım, HIV'in inhibisyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan lentiviral vektörlerin çoğu HIV temellidir, bu nedenle biyogüvenlik önemli bir konudur. İnsan ve fare genomunun büyük bir kısmını kaplayan shRNA kütüphaneleri, lentiviral vektörler kullanılarak yapılmaktadır ⁽²⁾.

Adenoviral Vektörler

Adenoviral virüsler, çift zincirli, zarfsız, doğrusal DNA taşıyan virüslerdir. Bölünen ve bölünmeyen birçok hücreyi transdükte edebilme yeteneğine sahip vektörler olarak oldukça sık kullanılmaktadır. Diğer vektörler ile karşılaştırıldığında, ilk ve ikinci kuşak adenoviral vektörlerin kullanılması immunojenisite ve düşük paketleme kapasitesi (yaklaşık 7.5 kb) nedeniyle sınırlıdır ⁽¹⁶³⁾.

Üçüncü kuşak adenoviral vektörlerde tüm viral genler delesyona uğratılmıştır. Pol II, pol III ve indüklenabilen promotör gibi çok sayıda promotör bu vektörlerde shRNA'ların ekspresyonu için kullanılabilir. Genellikle adenovirüs-aracılı ekspresyon kısa sürelidir, çünkü genoma entegrasyon olmaz. Bu nedenle ekspresyon süresini uzatmak için ilk kuşak adenoviral vektörler, AAV'lerin ITR'leri (inverted translated region) genetik mühendislik teknikleri ile aktarılır. Bu hibrid virüsler

adenovirüslere benzer şekilde replike olabilirler ve hücrel genoma entegre olurlar
(166).

Adenoviral vektörler, retroviral vektörlere kıyasla bazı avantajlara sahiptirler. Retroviral vektörlerin aksine konak hücrede serbestleşen adenovirüs genomu nükleusa taşınır, fakat konak genomuna entegre olmadan kalır. Vektörün konak genomuna entegre olmaması, organizma için önemli olan genlerin inaktivasyonu ya da bir kısım onkogenlerin aktivasyonu olasılığını ortadan kaldırır. Bu nedenle karsinojenite ve mutajenite riskleri düşüktür. Bütün bu avantajlarına karşın, adenoviral vektörler konak hücre genomuna entegre olmadığı için ilgili genin ekspresyonu geçici olarak sağlanır. Adenoviral vektörlerin en önemli dezavantajları; insanlar için potansiyel patojen olmaları ve birkaç uygulamadan sonra immün reaksiyona neden olmalarıdır. İmmünojeniteleri nedeniyle konak organizmada enflamasyon ve hücrel toksik reaksiyonlara yol açabilmektedirler. Vektör dizaynı yapılırken bu etkilerden sorumlu olan E2 geni çıkarılarak vektör hazırlanmaktadır.

Transgenlerin stabil entegrasyonu, Retrotranspozon-Adenovirüs hibrid vektörleri ve hibrid Adenovirüs-AAV vektörleri kullanılarak gösterilmektedir. RNAi'nin uzun süreli etkileri ile shRNA'ların stabil ekspresyonu için bu mükemmel bir strateji olarak görünmektedir ⁽⁸¹⁾.

Adenovirüsler ile ortaklaşan virüsler (AAV)

Adenovirüsler ile ortaklaşan virüsler (AAV), *Parvoviridae* sınıfına ait, 4861 nükleotidlik tek iplikli doğrusal DNA genomuna sahip, zarfsız, doğal replikasyon kusurlu bir parvovirüs olup patojenik özellikleri yoktur. AAV'ler insan popülasyonunda oldukça yaygın bulunan virüslerdendir.

Genomun önemli bir kısmında yaklaşık 145 nükleotidlik ters tekrar bölgeleri (ITR; inverted repeat region) bulunur. ITR'lerin varlığı genoma paketleme yapmak açısından önemlidir. shRNA eksprese etme yeteneğinde olan yaklaşık olarak 4.5 kb'lık DNA'yı pol II ve pol III promotorlarının kontrolü altında paketleyebilir.

Hümmoral immün cevapların indüklenmesinden kaçınmak ve tekrarlanabilirlik için farklı AAV serotiplerinde paketleme yapılabilir ⁽⁷⁸⁾.

Adenovirüsler ile ortaklaşan virüsler, bölünen ve bölünmeyen hücrelerde çok yüksek spesifiktikte genoma entegre olabilirler. Bu özellik, entegrasyona bağı gen aktivasyonu-inaktivasyonu ve mutajenik etki gibi olumsuzlukları ortadan kaldırmaktadır. Birçok çeşit hücre dizisini enfekte edebilirler. Yüksek titrede hazırlanabilirler ve fiziksel faktörlere karşı dayanıklıdırlar. Buna karşın, transdüksiyon oranları düşüktür. Gen tedavisinde kullanılan en küçük virüs olması nedeni ile taşıyabileceğı genetik materyal miktarı da sınırlıdır ^(78, 208).

4.1.5. siRNA'nın Viral Olmayan Vektörlerle Taşınması

Gen taşıyıcı sistemler arasında, viral vektörlerin birçok hücre dizisinde daha yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olmasına rağmen, viral olmayan vektörler sentez kolaylığı, düşük immün cevap, güvenlik ve genetik materyal taşıma kapasitesinin sınırlı olmaması nedeniyle daha çok dikkat çeken ve tercih edilen vektörlerdir.

DNA taşınmasında kullanılan birçok katyonik bileşik, siRNA taşınması için de kullanılabilir. İki taşıyıcı sistem arasında formülasyon, hücresel alım ve taşınma yolları gibi bazı farklılıklar olsa da; sonuçta siRNA formülasyon prosedürü, pDNA formülasyonuna dayanarak optimize edilmelidir ⁽¹⁶⁹⁾.

siRNA temel olarak nükleik asit yapısında bir moleküldür, bu nedenle prensip olarak plasmidler gibi diğer nükleik asitler için dizayn edilen taşıyıcı sistemler siRNA'lar için de tasarlanabilir. Nükleik asit transfeksiyon ajanları üç temel özelliğe sahip olmalıdır, bunlardan ilki, nükleik asit kargosu ile etkileşime girebilmelidir. Sıklıkla nükleik asit komplekslerinin oluşumunu sağlayan elektrostatik kuvvetler ile etkileşim sağlanır. Kompleksi oluşturan nükleik asit ve transfeksiyon ajanı aynı anda hücre membranına sunulurlar. Taşıyıcı ajanın yapısına bağı olarak kompleksler üç sınıfa ayrılırlar: lipopleksler, polipleksler ve lipopolipleksler. Lipopleksler katyonik

lipidler ile, polipleksler katyonik polimerler ile ve lipopolipleksler katyonik lipidler ve katyonik polimerlerin anyonik nükleik asitler ile etkileşimi sonucu hazırlanırlar⁽¹⁵⁷⁾.

Transfeksiyon ajanlarının ikinci temel özelliği, nükleik asidin hücre sitoplazmasına taşınması için biyolojik membranları yıkma ve/veya kaynaşma özelliğine sahip olmasıdır. Hem hücre membranı hem de lipoplekslerin lipid kompozisyonu nedeniyle nükleik asitlerin taşınması için lipopolipleksler hücre membranı ile kaynaşırlar. Bununla birlikte, hücre membranı ile lipopoliplekslerin füzyonu ve transfeksiyon arasında ilişki görülmemiştir⁽²⁰⁵⁾. Floresan ve elektron mikroskopisi çalışmalarına göre, lipopleksler hücreye endositoz yoluyla girerler ve daha sonra endozomal/lizozomal membranın yıkımıyla nükleik asit sitoplazmaya salınır⁽¹⁸¹⁾.

Endozom yıkımı, ya çift katlı membran yapısının denatürasyonu veya membranın şişme ve patlamasına yol açan osmotik basınç artışı ya da her ikisiyle gerçekleşebilir. Lipopleks hazırlamak için kullanılan katyonik lipidler, endozomal membran lipidleri ile etkileşerek endozomları yıkar. Membran yapısının bozulmasının yanı sıra, lipopleksden nükleik asidin ayrılması, lipopleksin katyonik lipidleri ile endozomal membrandaki anyonik lipidlerin yer değiştirmesiyle gerçekleşir⁽²⁰⁵⁾. Katyonik lipidler ticari transfeksiyon ajanı olarak yaygın kullanıma sahiptir. Bunlar, endozomların asidifikasyonuna bağlı olarak osmotik basıncın artmasıyla endozomal yıkıma sebep olurlar, çünkü endozomlar lizozomlara olgunlaşırlar. Endozomal olgunlaşma süresince, lümen pH'sı 7.0'den 5.0'a düşer. Bu viral aktiviteyi taklit etmek için polipleks-tip transfeksiyon ajanı olarak kullanılan birçok katyonik polimer, pKa değerleri 5-7 olan pH-bağımlı fonksiyonel gruplara sahiptirler. Bu tamponlanan gruplar, endozomal pH'nın azalmasını sağlayan protonların sayısını artırır ve proton sayısının artışı endozomun osmotik basıncını arttırarak membranın yıkılmasına sebep olur⁽¹⁵³⁾.

Son olarak taşıyıcı sistem, genetik materyali hem endositik yoldan hem de sitoplazmik nükleazlardan koruyarak nükleusa girmeden önce veya girdikten sonra

kondanse olmuş komplekslerden ayırabilmelidir (nükleer hedefleme/giriş). Nukleusa giriş, nükleer porlar (10 nm çapında) aracılığıyla veya hücre bölünmesi süresince gerçekleşir. Çekirdeğe girer girmez, genetik materyalin transfeksiyon etkinliği çoğunlukla gen ekspresyon sisteminin kompozisyonuna bağlıdır ⁽¹⁵⁷⁾.

Polimerler:

siRNA taşınmasında, polietilenimin (PEI), kitozan, poli-L-lizin (PLL) ve polietilenglikol (PEG) gibi polimerler ile hazırlanan kompleks ve nanopartiküller kullanılmaktadır. Bunlar polikasyon içeren blok polimerlerdir ve siRNA ile inter-polielektrolit kompleksler (IPEC) veya blok iyonomer kompleksler (BIC) oluşturma yeteneğindedirler. Günümüzde gen tedavisinde kullanılan IPEC sistemleri, PEI, PLL, polinükleik asitler (DNA veya RNA) ve polikasyon komplekslerinden oluşurlar. Zıt yüklü polielektrolitler arasındaki güçlü elektrostatik etkileşimler, kendiliğinden toplanmayı sağlarlar, enzimatik parçalanmayı önemli ölçüde önlerler. Son zamanlarda BIC'lar, konvansiyonel sistemlere göre sirkülasyon ve çözünme konularında oldukça etkindir. Polietilenoksit (PEO) ve poli-(N-2-hidroksipropil) metakrilamid, hidrofilik, immunojenik olmaması, nükleik asit bağlanması için katyonik segmentler olarak nötral blok ve sentetik kuaterner amin polimerleri veya biyokonjugatlar içermesi nedeniyle sıklıkla seçilmektedir ⁽¹⁶⁹⁾.

Sentetik polimerler kimyasal modifikasyonlarla geliştirilebilir. Örneğin lineer polietilenglikol (PEG), yoğun globüler PLL dendrimeri ile konjuge edildiğinde suda çözünebilen poli-iyonik sferik bir kompleks olan PEG-blok-PLL dendrimerlerini oluştururlar. Polietilenimin (PEI) ve mannoz-PEI, transferrin-PEI ve lineer-PEI konjugatları, jelatin ve kitozan, metakrilad/metakrilamid polimerleri ve pridinium surfaktantlar gibi kimyasallar (çoğunlukla polimerler) ile DNA taşınmasının arttırılmasına çalışılmaktadır ⁽¹⁷³⁾.

Polietileniminler, in vitro ve in vivo şartlar altında yüksek transfeksiyon etkinliği gösteren, etkin, viral olmayan nükleik asit taşıyıcılarıdır. Komplekslere taşınan DNA'yı kondanse eden ve kompakt bir yapı sağlayan yüksek katyonik yük yoğunluğuna sahiptir. Ayrıca, DNA moleküllerini sıkı şekilde kondanse etmesi ve

endozomlar ve lizozomlar gibi belli hücresel kompartmanlarda PEI’i tamponlama kapasitesi nedeniyle DNA’yı parçalanmaya karşı korur. Son zamanlarda siRNA için taşıyıcı vektör olarak, lineer PEI veya düşük moleküler PEI sıcak araştırma konusu olmuştur ^(24, 68).

Werth ve arkadaşları, ticari olarak mevcut PEI’ini fraksiyon ederek elde ettikleri düşük molekül ağırlıklı PEI ile farklı hücre dizilerinde düşük toksisite ve çok iyi transfeksiyon etkinliği sağlamışlardır. Sonuçlarda, bu PEI’nin kompleks yapabilme yeteneğine sahip olduğu, nükleaz degradasyonuna karşı siRNA’yı tam olarak koruduğu ve siRNA’yı hücrelere taşıyıp bu bölgede biyoaktivite gösterdiği saptanmıştır. VEGF’in siRNA-aracılı inhibisyonu ile hazırlanan taze veya liyofilize komplekslerle PC-3 prostat karsinoma hücreleri tedavi edildiğinde, farklı deneylerde hücre proliferasyonun azaldığı gösterilmiştir ⁽¹⁹⁶⁾.

Son yıllarda kitozan-temelli taşıyıcı sistemler, gen materyallerinin taşınmasında daha güvenli ve etkin olduğundan viral olmayan vektörler arasında giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Kitozan düşük toksisite, düşük immunojenite, mükemmel biyoparçalanabilirlik, biyouyumluluk gibi özelliklerinin yanı sıra, elektrostatik etkileşim ile negatif yüklü nükleotidler ile kolaylıkla polielektrolit kompleksler oluşturan yüksek pozitif yüke sahip bir biyopolimerdir. Taşıyıcı sistem olarak kitozanın kullanıldığı ilk gen transfer çalışmasında, kitozanı DNA ile belli oranlarda karıştırarak farklı boyutlarda kompleksler elde edilmiş ve in vitro özellikleri incelenmiştir. Sonuçta, kullanılan kitozanın molekül ağırlığına bağlı olarak fizikokimyasal özelliklerinin ve in vitro transfeksiyon etkinliğinin değiştiğini saptamışlardır ^(6, 24, 106, 162).

Yukarıda belirtilen tüm bu metodlarda, hücrelere belli zaman aralıklarında DNA veya siRNA’nın verilmesi gerekir. Hücreler, genetik materyal ve transfeksiyon ajanlarına kısa bir süre maruz bırakılır, bu nedenle, son zamanlarda biyouyumlu kontrollü salım polimerleri, sentetik DNA taşıma stratejilerinde önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda, çıplak DNA, biyoparçalanabilen poli(D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) mikropartiküllerine ve mikrokürelerine enkapsüle edilerek uzun süreli ve

kontrollü DNA salımı gerçekleştirilmiştir ⁽¹⁵¹⁾. FDA’ın onayladığı düşük maliyetli ve ayarlanabilir kontrollü salım yapan DNA taşıyıcı sistemler, salımdan önce DNA’yı koruma, polimerler aracılığıyla bölgeye spesifik taşıma ve sürekli tekrarlayan ilaç uygulamaları olmadan uzun-dönemli salım yapabilme gibi önemli avantajlara sahiptirler. ^(120, 123).

4.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler gelişim, embriyogenez süresince organ gelişimi ve farklılaşması için gerekli olan, en önemli ve en erken oluşan proseslerden birisidir. Ayrıca bu proses yetişkinlerde yara iyileşmesi ve reproduktif fonksiyonlar için de gereklidir. Fonksiyonel vasküler ağın büyümesi ve olgunlaşması komplike bir süreçtir. Embriyonik gelişimin erken basamaklarında vaskülogenezde rol oynayan, vasküler progenitorlerin aktivasyonuna katılan prosesler halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bu prosesler, birkaç büyüme faktörü ve reseptörlerinin sıkı bir şekilde aktivasyonlarının düzenlenmesini gerektirir ⁽⁸⁾. Vasküler endotel büyüme faktörü, özellikle endotel hücrelere özgü etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve differensiasyonuna sebep olur. VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir ⁽³¹⁾.

VEGF ailesi üyeleri, lenfanjiogenez, vasküler geçirgenlik ve hematopoesis gibi birçok önemli biyolojik proseslere katılmaktadırlar. Bu büyüme faktörünün, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynamasının yanı sıra, endotel hücrelerinin yaptığı bir çok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır ⁽⁵¹⁾.

VEGF tümör hücreleri tarafından salınır ve tümör neovaskülarizasyonunu hedefler. Bu nedenle VEGF antitümör tedavi için önemli bir hedeftir. Farklı VEGF ligandları veya reseptörlerindeki hasarlar, vasküler oluşum ve olgunlaşmada ciddi

defektler yaratmaktadır. Anormal VEGF sinyali, yaşla-ilişkili makular dejenerasyon ve romatoid artrit gibi diğer birkaç patolojik durumda ortaya çıkmaktadır ^(101, 102).

VEGF, vasküler sızmayı indükleme yeteneği nedeniyle vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak da bilinmektedir ⁽¹¹³⁾. Dvorak ve ark.'ları, mikrovasküler geçirgenlikteki artışın, tümörler ve yaralar ile ilişkili olarak anjiogenezde önemli bir basamak olduğunu göstermişlerdir ⁽⁵⁴⁾. Bu hipoteze göre, anjiogenik prosesteki VEGF/VPF'nin önemli bir fonksiyonu, plazma protein sızmasının indüklenmesidir. Bu etki, endotelial ve tümör hücre büyümesi için bir substrat olarak ekstrasvasküler fibrin jelin oluşumuyla ortaya çıkmaktadır. Son yapılan çalışmalarda, VEGF'in endotelial hücrelerinde fenestrasyonları indükleyen bir faktör olabileceği önerilmektedir. VEGF, topikal uygulandığında küçük venül ve kapillerlerin endoteliumunda ve hatta normal olarak fenestreleri olmayan endotelial hücrelerin bulunduğu bölgelerde de akut olarak fenestrasyonların gelişimine yol açmaktadır ve vasküler geçirgenliği artırmaktadır ^(54, 113).

4.2.1. VEGF Geninin Yapısı

VEGF, arterler, venler ve lenfatiklerden türevlenen mikro ve makrovasküler endotelial hücreleri için (ED50 2–10 pM) potent bir mitojendir. İnsanlardaki VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yerleşmiştir. Yedi intronla ayrılmış sekiz eksondan oluşmaktadır, kodlayıcı bölge ~14 kb'lık bir alan kaplamaktadır. Tek bir pre-mRNA'nın alternatif splicing'i (birleştirilmesi) çok sayıda farklı VEGF türünü oluşturur ⁽¹⁴⁰⁾.

4.2.2. VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

4.2.2.1. Hipoksi

VEGF gen ekspresyonunu düzenleyen birkaç mekanizma vardır. Bunlar arasında, hem in vitro hem de in vivo da oksijen basıncı çok önemli rol oynar. VEGF mRNA ekspresyonu, çeşitli normal ve transforme hücre tiplerinde düşük oksijen basıncı altında hızlı ve geri dönüşümlü olarak indüklenir. Hipoksi, VEGF mRNA

düzeylerinde hızlı ve güçlü bir artışı indüklemektedir. Bu durum özellikle, tümörlerin nekrotik alanları etrafında daha belirgin bir şekilde görülmesine karşın VEGF ailesinin diğer üyeleri ve bFGF, hipoksi tarafından indüklenmemektedir. Bu nedenle VEGF, hipoksi ile indüklenmiş neovaskularizasyonun esas, en önemli medyatörü olmalıdır. Hipoksik hücrelerden salgılanan adenosin, adenosin A2 reseptörlerine bağlanır ve c-AMP bağımlı protein kinaz (PKA) yolağı üzerinde VEGF'ü upregüle eder ⁽¹⁷⁹⁾.

HIF-1 bazik, heterodimerik ve heliks-loop-heliks bir protein olup, hipoksiye verilen transkripsiyonel cevapların bir aracısı olarak klonlanmış ve saflaştırılmıştır. Forsythe ve ark.'ları hipoksi süresince, HIF-1'in VEGF gen transkripsiyonunun aktivasyonunda rol oynadığını kanıtlamışlardır ⁽⁶¹⁾.

Hipoksi yanıt elemanı (HRE), VEGF geninin üst basamaklarında yer alan bir VEGF artırımı ile ilgili bir gen bölgesidir. Bu HRE hipoksi ile indüklenebilir faktör I (HIF-1) için bir bağlanma yeri içerir. Düşük oksijen basıncı HIF-1 düzeylerini post-transkripsiyonel düzeyde artırır ve ayrıca HIF-1'in DNA-bağlayabilme kapasitesini de artırır ⁽⁵¹⁾.

4.2.2.2. Sitokinler

Pek çok sitokin ve büyüme faktörü, VEGF mRNA'sını upregüle etmekte veya VEGF salgısını indüklemektedir. Bunlar arasında platelet-türevli büyüme faktörü (Platelet derived growth factor; PDGF), TNF-alfa, TGF-beta, FGF-4, keratinosit büyüme faktörü (KGF/FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), IL-1alfa, IL-1beta, IL-6 ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) bulunmaktadır. Bunların çoğu direkt bir anjiogenik etkiden yoksundur ancak VEGF ve bFGF üzerinde anjiogenik aktivite sergilerler. Koagülasyon faktörlerinden faktör VII/VIIa'nın bir reseptörü olan doku faktörünün sitoplazmik kuyruğu da VEGF üretimini regüle eder ve yara iyileşme yerlerinde önem taşıyabilir ⁽⁶¹⁾.

4.2.2.3. Farklılaşma ve Transformasyon

Hücre farklılaşması VEGF gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. C2C12 hücrelerinin miyojenik farklılaşması süresince veya 3T3 preadipositlerin adipositlere dönüşümü süresince VEGF mRNA'sı upregüle olmaktadır. Ters durumda, nöron-benzeri hücrelerde malign olmayan PC12'nin farklılaşması süresince de, VEGF gen ekspresyonu baskılanmaktadır. Yapılan bu çalışmalar, preadipositlerde VEGF mRNA ekspresyonunun indüklenmesinde protein kinaz C ve protein kinaz A aktivasyonu aracılı yollar gerektiğini göstermektedir ⁽¹⁰¹⁾.

Spesifik transformasyon, VEGF gen ekspresyonunun indüklenmesiyle oluşmaktadır. Murine p53 tümör baskılayıcı geninin mutasyona uğramış formu VEGF mRNA ekspresyonunu indüklemektedir. Benzer şekilde ras'ın amplifikasyonu veya onkojenik mutasyonları, VEGF up-regülasyonuna yol açmaktadır. Bunlara ilaveten, von Hippel-Linadu (VHL) tümör baskılayıcı gen, VEGF gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. VEGF, VHL sendromunun solid tümör özellikleri ve anormal vasküler proliferasyonların anahtar bir aracısıdır. ⁽¹²⁷⁾.

4.2.3. VEGF Üyeleri ve Yapısı

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF) süper ailesinin önemli bir üyesi olan vasküler endotelyal büyüme faktörü ailesi altı üyeden oluşur; VEGF-A (insan-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental büyüme faktörü (PIGF) ⁽¹⁴⁰⁾.

4.2.3.1. VEGF-A

VEGF-A geni, kromozom 6p21.3'teki lokalizasyonda kodlanmaktadır. VEGF-A, aynı zamanda human VEGF olarak da bilinmektedir. VEGF-A özellikle anjiogeneze katılan bir glikoproteindir. Çeşitli insan VEGF klonlarının cDNA sekans analizi yapıldığında, VEGF'in en az beş farklı moleküler tipten biri olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Bu moleküler heterojenitenin temelinde tek bir VEGF geninin alternatif ekson ayrılmaları yatmaktadır: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆. Diğer izoformlar, 148, 162 ve 183 aminoasid içerirler (VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂,

VEGF₁₈₃ olarak adlandırılırlar) ve VEGF₁₆₅'in son zamanlarda tanımlanan başka varyantları da vardır, VEGF_{165b} olarak adlandırılırlar. Ayrılan (splice) varyantlar heparin ve heparin-sülfata bağlanma yeteneklerine göre farklılık gösterirler ⁽¹⁴⁰⁾.

VEGF İsoformlarının Özellikleri

Doğal VEGF, 45.000 daltonluk bazik, heparine bağlanan, homodimerik bir glikoproteindir. İnsan VEGF'ün bugüne dek 6 isoformu tanımlanmıştır. Bu isoformların uzunluğu 121 ile 206 amino asitlik rezidüler arasında değişmektedir.

Ekson 1-5 tarafından kodlanan amino asitler tüm izoformlarda korunmuştur, fakat alternatif ayrılmalar (splice) ekson 6 ve 7'de gerçekleşir. Bu ekzonlar, reseptör bağlanmasını ve solubilitelerini etkileyen iki heparin-bağlanma domainlerini kodlarlar. Bu ekson 6'yı kodlayan izoformlar, hücre yüzeyine sıkı bir şekilde bağlanırlar (VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆). Ekson 6'dan yoksun izoformlar difüze olabilir. Ekson 6'dan yoksun olan VEGF₁₆₅ orta derecede difüze, gen yapısında ekson 6 ve 7 bulunmayan VEGF₁₂₁ de oldukça fazla difüze olma özelliğindedir. VEGF₁₆₅ en önemli izoformdur ve özellikle anjiogenezi uyarması açısından çok potenttir. Hem heparine hem de ekstrasellüler matrikse bağlanabilir. Son zamanlarda tanımlanan VEGF_{165b} splice varyantı, VEGF₁₆₅ ile benzer aminoasid sayısına sahiptir, fakat COOH terminal bölgesindeki 6 aminoasid diğerlerinden farklı olarak ekson 8 tarafından kodlanmaktadır. VEGF₁₆₅'in COOH terminali, mitojenik sinyali tanımlamak açısından önemlidir, bu nedenle bu bölgede oluşan değişiklikler muhtemelen fonksiyonu da etkileyecektir. Anjiogenezi stimule eden diğer VEGF isoformlarının aksine VEGF_{165b}, VEGF ile indüklenen proliferasyonu ve endotelial hücrelerin göçünü azaltan, VEGF'in endojen bir inhibitör formudur ⁽⁸⁾.

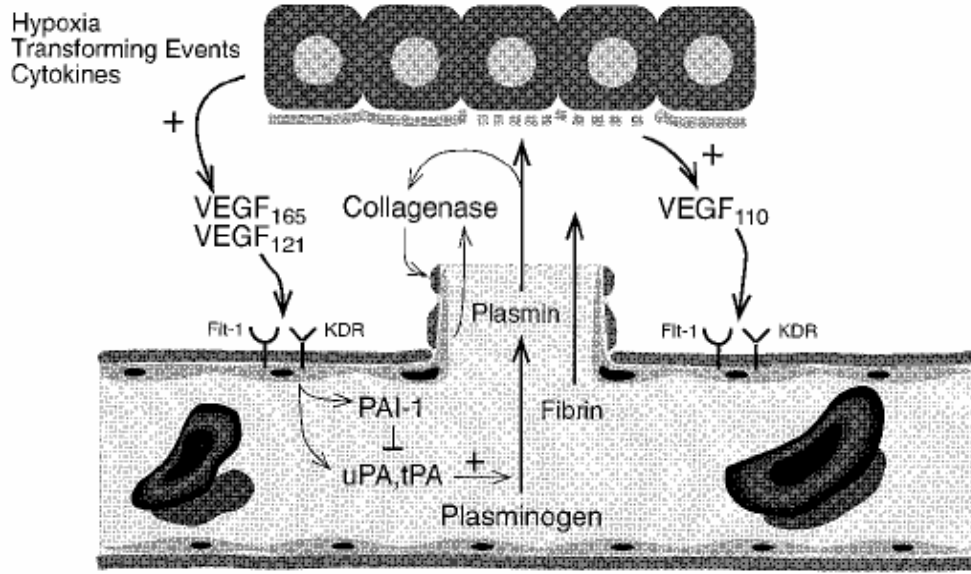
Farklı izoformlar arasındaki aminoasid sayı farklılıklarına bakıldığında; VEGF₁₆₅ ile VEGF₁₂₁ karşılaştırıldığında, VEGF₁₂₁ 44 aminoasitten yoksundur; VEGF₁₈₉'a bazik rezidülerle zenginleştirilmiş 24 aminoasid eklenmiştir ve VEGF₂₀₆'ya ek olarak 17 aminoasid eklenmiştir. VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₈₉'un kodlanan transkriptleri, VEGF genini eksprese eden birçok hücre ve dokuda tespit

edilmiştir. Aksine, VEGF206 çok nadir bulunan bir formdur, şimdiye kadar yalnızca insan fetal karaciğer cDNA kütüphanesinde tanımlanmıştır ⁽⁵¹⁾.

Yapılan çalışmalarda, murine VEGF geninin organizasyonu da tanımlanmıştır. İnsan genine benzer şekilde, murine VEGF geninin kodlanan bölgesi yaklaşık olarak 14 kb'lıktır ve yedi intronla ayrılmış sekiz ekzon içerir. Üç izoformu bulunmaktadır; VEGF120, VEGF164 ve VEGF188. Bu sebepten, murine VEGF'leri bir amino asit farkı ile insan VEGF'inden daha kısadır ⁽¹¹³⁾.

Özelliklerine göre VEGF165, VEGF'in en önemli izoformudur. VEGF121 zayıf asidik bir polipeptid olduğundan heparine bağlanamaz. VEGF189 ve VEGF206 daha baziktir ve VEGF165'den daha fazla bir afinite ile heparine bağlanır. Daha önce yapılan çalışmalarda, heparine afinite ve izoelektrik noktasındaki farklılıklar, VEGF'in biyoyararlanımını önemli ölçüde etkileyebilir. VEGF121 serbest olarak çözünen bir proteindir; VEGF165'in önemli bir fraksiyonu hücre yüzeyi ve ekstraselüler matrikse bağlanmasına rağmen sekrete edilebilir. Aksine VEGF189 ve VEGF206, ekstraselüler matriksten tamamıyla ayrılabilir. Bununla birlikte bu izoformlar, heparin ve heparinaz ile soluble formda salınabilir ve bağlanma bölgeleri, heparin-benzeri yoğunluk içeren proteoglikanlar ile birliktedir. İlginç olarak, uzun formlar COOH ucundaki ayrılmadan sonra plazmin tarafından salınabilir. Bu faaliyet, 34,000 daltonluk moleküler kütleyle sahip biyoaktif proteolitik fragmentin oluşumuna yol açar.

Plazminojen aktivasyonu ve plazmin oluşumunun anjiogenez kaskadında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. (**Şekil 4.5**) Böylece, VEGF'in proteolizisi in vivo olarak da oluşur. Proteolitik kesilme ile biyoaktif VEGF'in oluşumu, özellikle proteazların ekspresyon artışının olduğu tümör mikroçevresinde önemlidir. VEGF-heparan sülfat-reseptör komplekslerinin stabilitesi, etkin sinyal transdüksiyonu ve endotelial hücre proliferasyonunun stimülasyonuna katkıda bulunur. Böylece, VEGF dereceli ve kontrollü biyolojik cevap oluşturmak için yapısal ve fonksiyonel heterojenite eksprese etme potansiyeline sahiptir. Şekilde vasküler endoteliumda ve regülatör mekanizmalarda VEGF izoformlarının faaliyeti gösterilmektedir ⁽¹⁰⁰⁾.



Şekil.4.5. Vasküler endotelyumda VEGF isoformlarının faaliyeti. Gelen uyarılar ile difüze olabilen alternatif olarak ayrılan VEGF izoformları (VEGF165, VEGF121) farklı hücre tiplerinden salınır. Bu proteinler, vasküler endotelyumda etkileri indükleyebilir; hücre sprouting, interstisyel kollojenazın indüksiyonu, plazminojen aktivatörleri ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1)'in indüklenmesi, plazma proteinlerinin ekstravazyonu. Plazminojen aktivasyonu, difüze olabilen proteolitik fragmentin (VEGF110) salınımı için akstrasellüler matrikse bağlı VEGF (VEGF189 veya VEGF206) ayırabilen plazminin oluşumuyla sonuçlanır. Plazmin prokollojenazı aktive edebilir. PAI-1'in aktivasyonu, plazminojen aktivatörlerinin inhibisyonu ile negatif bir regülatör basamak oluşturabilir⁽⁵¹⁾.

4.2.3.2. VEGF-B

VEGF-B, başlangıçta VEGF-A ile %23'ü homolog olan bir sinyal peptidinin bölünmesinden sonra, 186 amino asitli bir protein olarak oluşur. Sonra ekson-6'da oluşan bir alternatif splicing ile tamamen farklı terminal COOH- grupları içeren 167 aminoasitli bir proteine dönüşür. VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır^(102,127).

4.2.3.3. VEGF-C

VEGF-C, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 amino asitten oluşmuştur. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki yapar. Yapılan bir çalışmada, transgenik farelerin derisinde

VEGF-C'nin fazla salgılanmasının endotel hücre proliferasyonuna ve lenfatik damarlarda genişlemeye neden olduğu, bununla beraber vasküler doku oluşmadığı rapor edilmiştir ⁽¹⁰²⁾. VEGF-C'nin Kaposi sarkomunda önemli oranda rol aldığı görülmüştür ⁽³²⁾.

4.2.3.4. VEGF-D

VEGF-D, 334 amino asitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında aynı amino asitler içeren bir proteindir. C-terminal uçlarında zengin sistein domainleri içerir. Bu da VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar ^(8,51).

4.2.3.5. VEGF-E

VEGF-E, VEGF-A ile amino asit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür. VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir ⁽¹⁴⁰⁾.

4.2.3.6. PlGF

PlGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahiptir. Daha sonra yeni amino asitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında benzeşen ve 152 amino asit içeren son şekli oluşur. VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir ⁽¹⁴⁰⁾.

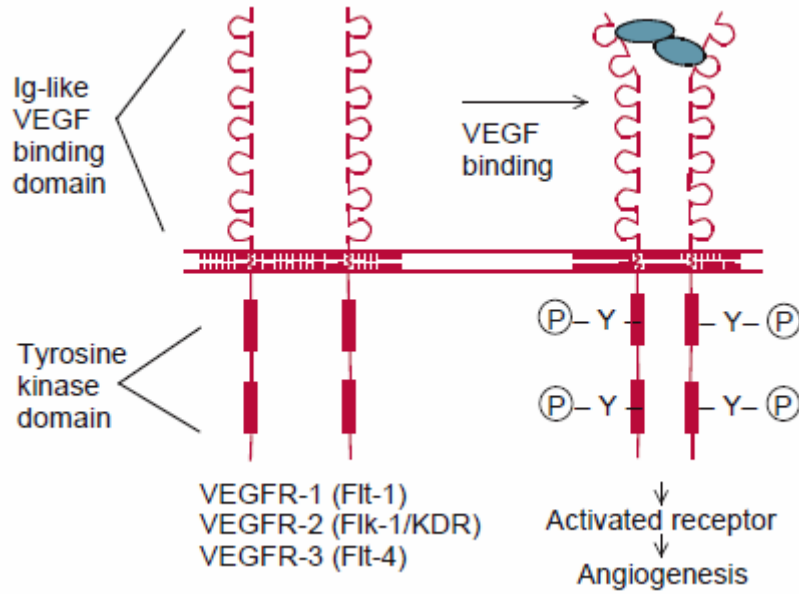
4.2.4. VEGF Reseptörleri ve Benzeri Etkili Reseptörler

VEGF ailesinin üyeleri, üç VEGF tirozin kinaz reseptörlerinden biri için farklı affiniteler gösterir: VEGF reseptör (VEGFR)-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3. Ayrıca, heparin sülfat proteoglikanlar ve nörofilinler gibi birkaç ko-reseptörler de VEGFR'lerinin aktivasyonuna katkıda bulunur ⁽¹⁴⁰⁾.

4.2.4.1. VEGF Reseptör 1

VEGF Reseptör 1 (VEGFR-1, flt-1) ve VEGFR-2, yüksek affiniteli VEGF reseptörleridir ve VEGFR-3 ile birlikte reseptör tirozin kinazların flt alt-ailesini

oluştururlar. Bu reseptörler, 7 adet ekstrasellüler immünglobulin (Ig)-benzeri domain ve bu domainleri izleyen membranı-geçen bir bölge ve korunmuş bir intraselüler tirozin kinaz domain'i ile bu domain'in arasına giren bir kinaz insert sekansı ile karakterizedir (Şekil 4.3).



Şekil.4.3. VEGF tirozin kinaz reseptörlerinin yapısı ⁽¹⁴⁰⁾.

~180 kDa'luk bir glikoprotein olan VEGFR-1 tanımlanan ilk VEGFR'dir ve VEGF'ye karşı en yüksek affiniteye sahiptir. VEGFR-1, VEGF-A, VEGF-B ve plasental büyüme faktörüne bağlanabilir. Vasküler endotelial hücrelerde eksprese olur. Ayrıca, VEGFR-1 monositler ve makrofajlar, hematopoetik kök hücreleri ve belirli endotelial olmayan hücre tiplerinde de eksprese edilir. Monositlerde doku faktörünün indüklenmesi ve kemotaksis ve vasküler düz kas hücrelerinde matriks metalloproteinaz ekspresyonunun artırılmasından sorumludur. Anjiogenik kaskad süresince bu reseptörün çözünabilir formu (splice'ı) VEGF aktivasyonuna katılır ve meme kanserinde tümör gelişimi için prognostik bir belirteçtir ⁽⁸⁾.

VEGFR-1, damar farklılaşması ve olgunlaşması açısından önemlidir. VEGFR-1 oluşturamayan fareler embriyonik dönemde 8,5 günde ölmektedir. Bu farelerde hem embriyonik hem de embriyo dışı yerlerde endotel hücreleri normal bir şekilde

oluşabilmekte ancak doğru bir şekilde bir araya gelerek kan damarları halinde organize olamamaktadırlar. Bu defekt, mezenkimal hücrelerin hemangioblast haline gelebilmek için VEGFR-1 'in gerekli olduğunu göstermektedir ⁽⁵¹⁾. Sessiz (inaktif durumdaki) endotel hücrelerinde olduğu kadar proliferen endotel hücrelerinde de VEGFR-1 mRNA'sının bulunması, bu reseptörün endotelin sürdürülmesinde sürekli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. VEGFR-1 vaskülogenez süresince esansiyeldir. Ayrıca VEGFR-1, endotel hücrelerinde doku faktörünün, uPA'nın ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1'in (PAI-1'in) upregüle edilmiş ekspresyonundan da sorumlu tutulmuştur.

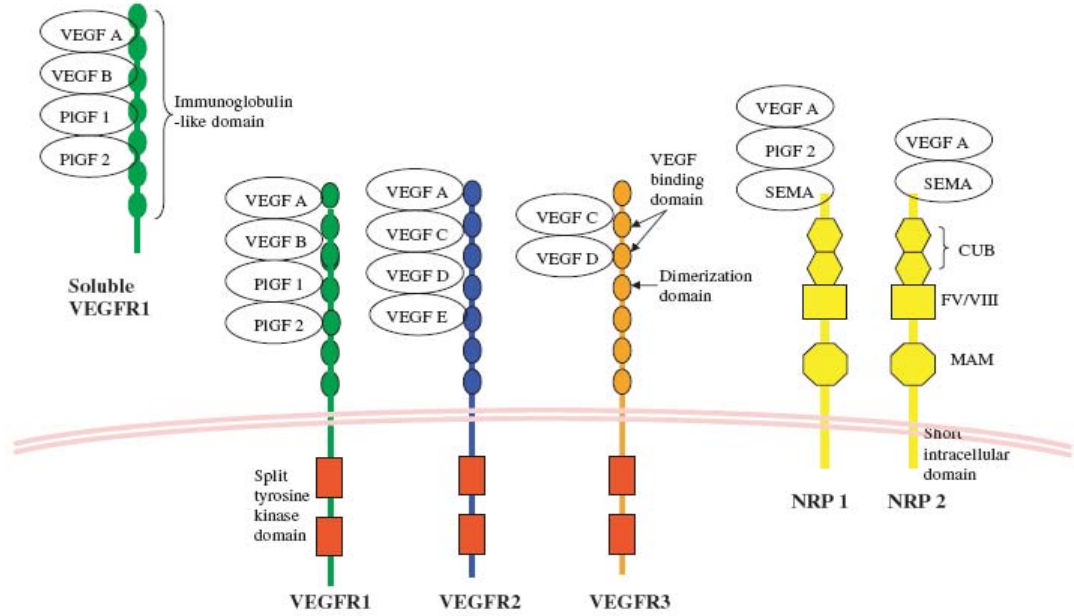
4.2.4.2. VEGF Reseptör 2

VEGF Reseptör 2 (VEGFR-2, Flk-1) (kinaz-insert-domaini-içeren reseptör; KDR olarak da bilinmektedir) 200 – 230 kDa'luk yüksek affiniteli bir VEGF reseptörüdür. VEGFR-2, primer olarak VEGF-A ile aktive olur. Ayrıca VEGF-C ve VEGF-D için de reseptör görevi yapabilmektedir. VEGFR-2 vasküler endotelial hücreler için mitojenik bir sinyal yaratması açısından önemli bir reseptör olup, vasküler geçirgenlik için sinyal aracısı olarak da önemli rol oynamaktadır. Endotel hücrelerinin yanı sıra, hematopoetik kök hücrelerinde de eksprese olmaktadır ⁽⁵¹⁾.

VEGFR-2 sinyali vaskülogenez için gereklidir. Fare embriyonik kök hücrelerindeki VEGFR-2 geninin inaktive edilmesi sonucunda hematopoietik ve endotelial precürsör hücrelerden yoksun embriyolar oluşmaktadır, dolayısıyla fareler E9 civarında ölmektedir. VEGFR-2 aktivasyonu, kanser gibi birçok patolojik durum içinde anahtar bir sinyal yoludur, bu reseptör sıklıkla gelişen damarlarda upregüle olmaktadır. Spesifik inhibitörlerin kullanıldığı birçok çalışmada, VEGF/VEGFR2 sinyal yolu tümör anjiogenezi açısından önemlidir ve bu nedenle solid tümör büyümesi gelişir. Farklı hücre tiplerinde VEGFR2'nin ekspresyonu, mitojenik sinyalin transdüksiyonu ile ligandlara cevap olarak oluşur ^(113, 127).

VEGFR-2 ligandla bağlandıktan sonra, sitoplazmik domaindeki birçok tirozin rezidüsünün fosforilasyonu sonucunda aktive olur (**Şekil 4.4.**). Sonrasında Shc, Grb2 ve MAP kinaz gibi çeşitli sinyal moleküllerinin rol aldığı intraselüler pek çok yolak

aktif olur ve endotel hücrelerinde mitogeneze, kemotaksise ve morfolojik değişikliklere yol açar⁽⁵¹⁾.



Şekil 4.4. VEGFR-1,2,3 ve Nörofilin reseptörüne bağlanabilen moleküller⁽¹⁴⁰⁾.

4.2.4.3. VEGF Reseptör 3

VEGF Reseptör 3 (VEGFR-3, Flt-4), reseptör tirozin kinazların flt alt-ailesinin bir üyesidir. VEGFR-3, yalnızca VEGF-C ve VEGF-D ile aktive edilebilir (Şekil 4.4.). Lenf damarlarının farklılaşması ve mitojenik sinyal açısından lenfatik endotelial hücreler için önemli bir reseptördür. Normal ve tümör lenfanjiogenezi düzenler ve yetişkinlerdeki ekspresyonu ancak lenfatik endotelial hücrelerle sınırlıdır⁽¹⁴⁰⁾.

VEGFR-3'teki mutasyonlar ciddi patolojik durumlara yol açabilir. Erken kan damarı oluşumunda VEGFR-3, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile birlikte eksprese edilir fakat daha sonra gelişim süresince ekspresyonu olgun lenfendotelial hücrelerle sınırlıdır. VEGFR3, lenfatikler için spesifik bir belirteçtir ve farklı endotelial öncü hücre karışımından lenf endotelialini izole etmek için kullanılabilir^(51, 127).

4.2.4.4. Nörofilinler

Endotelial hücreler, ya VEGFR-2 ya da VEGFR-3'den daha küçük bir kütleye sahip VEGF reseptörlerini de içermektedirler. Endotelial hücrelerin bu küçük VEGF reseptörleri, spesifik bir izoformdur ve VEGF165'e bağlanır. Daha önceleri yapılan çalışmalarda endotelial olmayan birkaç hücre tipinde, VEGF165'e spesifik bu reseptörlerin eksprese olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu izoform-spesifik reseptörlerin, prostat ve meme kanser hücre dizilerinde de fazla miktarda eksprese oldukları görülmüştür ⁽¹⁴⁰⁾.

Bu reseptörler, VEGF'ün ekson 7 tarafından kodlanan domain'ini tanırlar ve dolayısıyla da VEGF121'e değil ama VEGF165'e bağlanırlar. Bu tür reseptörlerden biri neurophilin-1'dir (NRP-1). NRP-1, kollapsin/semaphorin ailesinin belirli üyeleri için nöronal bir reseptör olarak daha önceden karakterize edilmiş olan 120 – 130 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. NRP1'in tümör kökenli hücreler ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere çok geniş bir doku dağılımı mevcuttur. Embriyonik nöronlar üzerinde bulunan NRP-1 akson büyümesinin kontrolünden ve semaphorin ailesine mensup olan belirli üyelerin bağlanması yoluyla akson büyümesine kılavuzluk etmekten sorumlu tutulmaktadır ⁽¹¹³⁾.

Son zamanlarda NRP-1'in, PIGF ve PIGF-2'nin heparine bağlanma formu için de bir reseptör olarak fonksiyon gördüğü gösterilmiştir. NRP1'in VEGF-B ve PIGF-2'ye bağlanmasındaki biyolojik rolü henüz belli değildir çünkü bu büyüme faktörleri sadece VEGFR-1'e bağlanmaktadır. PIGF, VEGFR-1 reseptörünün aktivasyonu aracılığıyla hücre göçünü indüklemektedir. PIGF-2, NRP1 eksprese eden endotel hücrelerinin proliferasyonu üzerinde herhangi bir etkiye sahip değildir ve VEGFR-1 aracılı migrasyonu stimule etmede PIGF-1'den daha etkili değildir ⁽¹²⁷⁾.

Nörofilinler çok kısa bir intrasellüler domaine sahiptir ve bu sebepten bağımsız reseptörler olarak fonksiyon göremezler. NRP-1 eksprese eden hücrelerde veya VEGFR-2'nin bulunmadığı hücrelerde VEGF165'e karşı bir cevap

gözlenmemektedir. NRP1, VEGF165 için bir ko-reseptör şeklinde etki ederek bu isoformun VEGFR-2'ye bağlanmasını ve bioaktivitesini arttırmaktadır (Şekil 4.4.).

Yapılan çalışmalarda, NRP-1'in kan damar gelişiminde önemli bir regülatör olabileceği ortaya konmuştur. NRP-1'den yoksun olan fare embriyoları, kardiyovasküler sistem oluşmadığından ölmektedir. Endotel hücrelerinde indirekt etkili bir anjiogen olan TNF-alfa tarafından, hem NRP1 hem de VEGFR-2 upregüle edilmektedir ⁽¹⁰²⁾.

NRP1 reseptörü vaskülogenez, angiogenez ve sinir sisteminin gelişimi gibi çok çeşitli proseslerde rol oynamaktadır. VEGF165 periferik sinir sisteminde bulunan hücrelerin proliferasyonu ve sürveyi ile birlikte aksonal büyümeyi stimule eden nörotrofik bir faktör şeklinde etki edebilmektedir. Benzer şekilde, kimyasal itici bir molekül olan semaphorin Sema III (NRP1'e bağlanır ve akson mobilitesini inhibe eder) aynı zamanda endotel hücre motilitesini de inhibe etmekte ve NRP1'e bağlanmak için VEGF165 ile yarışmaktadır ⁽¹⁴⁰⁾.

4.2.4.5. Heparan Sülfat

Disakkarit tekrarlarından oluşan heparan sülfatlar, dallanmamış polisakkarit zincirleridir. Sekrete edilebilir veya belli proteinlerin serin rezidülerine tutunabilirler. Glikozilasyon golgide gerçekleşir, şeker zincirleri N-asetil gruplarının sülfatlanması gibi modifikasyonlar geçirirler. Proteinlerin heparin sülfata bağlanması ile heparin sülfat proteoglikanlar (HSPG) olarak adlandırılırlar. Birçok ligand-reseptör etkileşimi, HSPG'ye bağımlıdır veya ondan etkilenir. HSPG, VEGF 'ü stimule eden VEGFR-2'nin daha güçlü bir aktivasyon oluşturmalarını engeller, muhtemelen komplekse bağlanarak internalizasyonu ve degradasyonu önler ^(31, 32).

4.3. Anjiogenez

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiogenez vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda kanser, iskemik kardiyovasküler hastalıklar, retinopatiler, yara iyileşmesi ve enflamasyon gibi pek çok önemli hastalık durumunu önemli ölçüde etkilemektedir. Anjiogenezin

kendisine benzer olan pek çok durumdan örneğin vaskülogenezden, arteriyogenezden ve lenfanjiogenezden ayırt edilmesi gerekir. Vaskülogenez ve anjiogenez birbirinden farklı regülatör mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Anjiogenez başlangıçta özel olarak, embriyonik gelişim sürecinde primitif hücrelerden yeni kan damarlarının de novo (sıfırdan, yeni baştan) bir şekilde formasyonunu ifade etmek amacıyla kullanılmaktaydı. Ancak, kemik iliğinde ve dolaşımda bulunan endotelial prekürsör hücrelerin de bazı durumlarda anjiogeneze katkıda bulunabilecekleri gözlenmiştir. Ayrıca, anjiogenez terimi genel olarak kullanılan, küçük kan damarlarının formasyonunu ifade etmektedir ve bu nedenle, yeni arterlerin gelişimini ifade eden arteriyogenez teriminden ayırt edilmelidir. Yine anjiogenez ile, yeni lenfatik damarların formasyonunu ifade eden lenfanjiogenez'in de ayırt edilmesi gerekmektedir ^(22,54). Anjiogenez, normal ya da fizyolojik ve patolojik anjiogenez olarak ayrılabilir;

Fizyolojik anjiogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenir. Anjiogenez gelişmekte olan fetüste başlar ve doğum sonrasında, erişkin dokulardaki normal kan damarlarını oluşturacak biçimde devam eder. Normal kan damarları, düzenli ve birbirinden yakın boşluklarla ayrılmış bir biçimde dağılım gösterirler ve elastik ve müsküler arterler, arterioller, kapillerler, postkapiller venüller ve ufak ve büyük venler şeklinde hiyerarşik bir düzenlenmeye sahiptirler. Proanjiogenik ve anti anjiogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenez kontrol edilemez ⁽³⁴⁾.

Patolojik anjiogenez; indüklenen yeni kan damarları açısından son derece anormaldir. Damarlar uniform olmayan bir biçimde dağılırlar, düzensiz dallanırlar, arteriovenöz şantlar oluştururlar ve belirli kesin bir hiyerarşik paterne uymazlar. Ayrıca yapısal ve fonksiyonel açıdan heterojendirler. Plazma proteinlerine ve plazmaya karşı genellikle yüksek derecede geçirgendirler. İnflamatuvar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retino-pati) anjiogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yara iyileşmesinde ise anjiogenezin yetersizliği söz konusu olmaktadır ⁽³⁰⁾.

4.3.1. Anjiogenik Dönüşüm

Anjiogenezis, endojen pro-anjiogenik uyarıcıların ve anti-anjiogenik inhibitörlerin dengesine bağlıdır. Tümör büyümesi bu dengenin bozulmasıyla oluşur, bu durum “anjiogenik dönüşüm” olarak adlandırılır. Anjiogenik uyarıların artışı ve anjiogenez inhibitörlerinin azalışı anjiogenezi başlatmaktadır ⁽³⁰⁾. Anjiogenik ve antianjiogenik faktörler **Tablo 4.5.**’de gösterilmektedir.

Tablo 4.5. Anjiogenik faktörler ve anjiogenezi önleyen faktörler ⁽³⁴⁾.

Anjiogenik Faktörler	Anjiogenezi Önleyen Faktörler
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktör)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme faktör)	Anjiostatin
FGF (Asidik,bazik fibroblast büyüme-fak.)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	Vasküler endotelial büyüme faktörü
TGF- α (Transforme edici büyüme faktör- α)	Trombosit faktör-4 fragmanı
TGF- β (Transforme edici büyüme faktör- β)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- α (Tümör nekroz faktör- α)	İnterferon- α - β
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenebilen protein- 10
Anjiogenin	
Proliferin	

4.3.2. Anjiogenez Basamakları

a-Vasodilatasyon, endotelial permeabilite ve periendotelial destek

Anjiogenez, nitrik oksidle ilgili bir proses olan vasodilatasyonla başlar. Vasküler permeabilite VEGF’e yanıt olarak artar ve böylece plazma proteinleri ekstravaze

olur. Jel formasyonuna gelen ekstraselüler alan, damar dışına çıkarak göç eden endotel hücreleri için bir yapı iskelesi görevi görür. Permeabilitedeki bu artış;

- Fenestraların formasyonu,
- Vezikülo-vaküoler organellerin formasyonu,
- Platelet-endotelyal hücre adhezyon molekülü (PECAM-1),
- Vasküler endotelyal (VE)-cadherin'in redistribüsyonu aracılığıyla meydana gelir ve Src kinazları ilgilendirir .

Permeabilite anjiogenez açısından iyi olmakla beraber, aşırı vasküler kaçak ve sızıntı kötü olabilir ve sirkulatuar kollapsa, intrakranyel hipertansiyona, adhezyon formasyonuna, metastazlara, premenstruel rahatsızlığa ve körlüğe yol açabilir. Endotelyal Tie2 reseptörünün bir ligandı olan angiopoietin (Ang)-1 vasküler permeabilitenin doğal bir inhibitörü olup önceden mevcut bulunan kan damarlarını sıkılaştırmaktadır. Ang1, erişkin damarlarına akut bir şekilde uygulandığı zaman, vasküler morfolojiyi şiddetli bir şekilde etkilemeden plazma sızıntısına karşı koruma sağlamaktadır ⁽³²⁾.

Endotel hücrelerinin bulundukları yerden migrasyon yapabilmeleri için, interendotelyal hücre temaslarının gevşemesi ve periendotelyal hücre desteğinden kurtulmaları gerekir. Yani, matür kan damarlarının destabilize hale gelmesi gerekir. Endotelyal Tie2 reseptör sinyalleşmesinin inhibitörlerinden biri olan Ang2, düz kas hücre tutunmasında ve matriksin gevşetilmesinde yer alabilmektedir. Proteinazlardan plasminojen aktivatörü, matriks metalloproteinazları (MMP'ler), chymase (kimaz) yada heparanase aileleri, matriks moleküllerini parçalayarak ve ekstraselüler matriks içinde hapsedilmiş (sekestre edilmiş) büyüme faktörlerini serbestleştirerek (bFGF, VEGF ve IGF-1 gibi) anjiogenezi etkilemektedirler. MMP-1 veya -3'ün ya da MMP-2 fragmanı olan PEX'in doku inhibitörleri MMP-2'nin $\alpha v\beta 3$ 'e integrinine bağlanmasını inhibe ederek anjiogenezi etkilemektedir ⁽⁶¹⁾.

b-Endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu

Prolifere olan endotel hücreleri, yolakları bir kez belli olduktan sonra uzak yerlere göç etmeye başlarlar. VEGF, Plasental büyüme faktörü (PLGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve bunların reseptörleri olan VEGFR2, VEGFR3 ve neuropilin-1 spesifik fonksiyonlara sahiptirler: VEGF ve reseptörü (VEGFR2) embriyonik, patolojik ve neonatal anjiogenezi etkiler ancak farklı VEGF isoformlarının ya da VEGF ailesi üyelerinin heterodimerlerinin bu süreçte yer almaları konusunda moleküler mekanizmalar tam netleşmemiştir. VEGF120 anjiogenezi tek başına başlatabilmekte ancak bu süreci tamamlayamamaktadır ⁽³²⁾.

VEGF-C (VEGFR3'ün bir ligandıdır) erişkin patolojilerinde anjiogenik iken ⁽³²⁾, VEGFR3 hem embriyonik anjiogeneizde yer alır, hem de patolojik anjiogeneizde eksprese edilir.

VEGF'nin aksine Ang1 kendi başına endotel hücre ağı organizasyonunu başlatamaz ancak VEGF tarafından başlatılmış olan network'ları stabilize eder. Bunu, endotel hücreleri ile periendotelyal hücreler arasındaki etkileşimleri stimule ederek yapmaktadır. Bu durum, Ang1'in VEGF'den daha geç aşamalarda etki ediyor olabileceğini düşündürmektedir ⁽³⁴⁾. Ang2 de en azından VEGF varlığında anjiogeniktir. Erişkinlerin sessiz vaskulatüründe Fosforile Tie2'nin düşük düzeylerinin saptanması damarların sürdürülmesinde Tie2'nin yer aldığını göstermektedir.

Fibroblast büyüme faktörü ve platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF) ailesinin üyeleri normal gelişim esnasında bol miktarda bulunurlar ancak uygulandıkları zaman mezenkimal ve enflamatuvar hücreleri çekerek (toplayarak) anjiogenezi etkilerler. TGF- β 1 ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) endotel hücre büyümesini inhibe ya da stimule edebilirler ve tümör progresyonunu belirleyebilirler ^(30, 33).

Hücre-hücre yada hücre-matriks etkileşiminde yer alan $\alpha v\beta 3$ integrin gibi moleküller endotelial yayılmaya aracılık ederler ve $\alpha v\beta 3$ antagonistlerinin angiogenezi inhibe etmesini açıklayabilirler ⁽³⁴⁾.

PECAM-1 ve Ephrin-B2 de patolojik angiogeneizde yer alabilmektedir. VEGF'den sonraki basamaklarda yer alan bir VEGF efektörü olan nitrik oksid, TGF- $\beta 1$ ve diğer angiogenik faktörler embriyonik vasküler gelişim için zorunlu değildirler ancak patolojik angiogenezi etkilerler ve damarların re-endotelizasyonunu geliştirirler. Ekzojen yoldan uygulandıktan sonra angiogenik olduğu keşfedilen ancak endojen angiogenik aktivitesi belirlenmeyi bekleyen moleküllerin listesi giderek uzamaktadır. Bunlar; eritropoietin, IGF-1, Neuropeptide-Y, leptin, Thy-1, epidermal büyüme faktörü, doku faktörü (koagülasyonun başlatıcısı olan), hepatosit büyüme faktörü, interlökinler, hormonlar ve kemokinler ⁽³⁴⁾ olarak sayılabilir.

Angiogenik tomurcuklanma, aktivatörler ve inhibitörler arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. Endotel hücrelerinin proliferasyonunu veya migrasyonunu suprese eden angiogenez inhibitörleri; Angiostatin, Endostatin, Antitrombin III, İnterferon- β , Lösemi inhibitör faktör, Platelet-faktör 4'dir ⁽³²⁾.

c-Lümen formasyonu (oluşumu, şekillenmesi)

Endotel hücreleri çoğunlukla, daha sonradan lümenlenen solid bir kordon şeklinde bir araya gelirler. Tümör damarları ve patolojik angiogeneizde damarlar normal damarların aksine genellikle anormal şekilde genişlemişlerdir ama tümör damarlarının içindeki kan akımı genellikle kaotik (yönü tam anlaşılamayan) biçimde olmaktadır ve metabolik ihtiyaçları karşılamada etkisiz kalmaktadır ⁽⁶¹⁾.

VEGF189 lümen çapını azaltırken VEGF121, VEGF165 ve reseptörleri lümen formasyonunu artırır ve ayrıca damar çapını da artırır. Bazı belirli dokularda (örneğin psoriatik cilt dokusunda) VEGF , mevcut olan kan damarlarını büyütürken morfogenetik bir aktivite sergilemektedir ^(31, 32).

d-Endotelyal sürvey (sağkalım)

Endotel hücreleri yeni damarlarda bir kez toplandıktan sonra sessiz bir hale gelirler ve uzun yıllar boyunca canlı, kalırlar. Azalmış sağkalımın embriyoda vasküler regresyona yol açtığı gözlenmesi, endotel sürveyinin önemini göstermektedir ⁽⁶¹⁾.

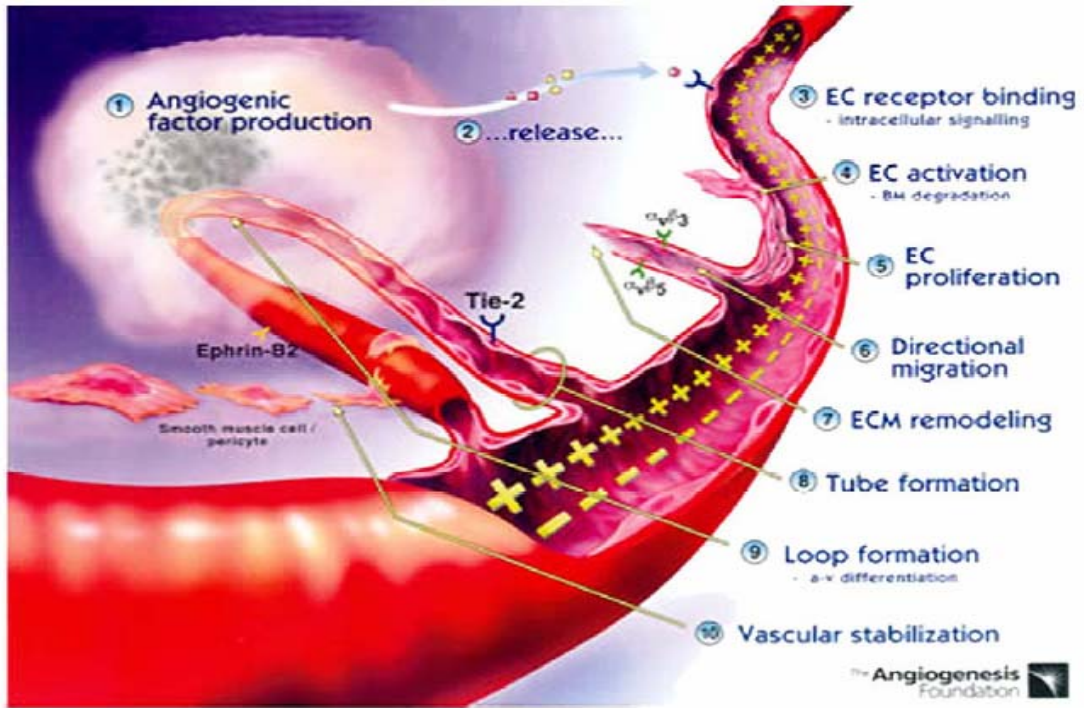
VEGF'nin sürvey fonksiyonu, VEGFR2, β -catenin ve VE-cadherin arasındaki etkileşimlere bağlıdır ⁽⁹⁹⁾. Ang1 endotel sürveyini artırırken Ang2 süprese etmektedir. Matriks makromolekülleri ile etkileşimin $\alpha\beta3$ antagonistleri ya da desintegrin accutin kullanılarak engellenmesi de endotel apoptosisi ile sonuçlanabilir ancak $\alpha\beta3$ sadece proliferatif hücrelerde eksprese edildiği için önceden mevcut bulunan sessiz kan damarları etkilenmeden kalmaktadır.

e-Endotel diferansiyasyonu

Endotel hücreleri, lokal fizyolojik gereksinimlere uyum sağlayabilmek için, kısmen konak doku tarafından belirlenen bazı özel karakteristik özellikler kazanırlar. Bu duruma, VEGF ile ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimler aracılık etmektedir. Tümörlerde ve patolojik anjiogeneizde bulunan endotel hücreleri pek çok bakımdan anormaldir: çok katlıdırlar, intersellüler ve transsellüler delikler içerirler, kontrolsüz bir geçirgenlik sergilerler ve sürekli yeniden modellenme geçirirler. Tümör damarlarının “mozaik” damarlar oldukları (hem endotel hem tümöre ait hücreler içerir) ve hem endotel hücrelerle hem de malign “vaskülojenik” tümör hücreleriyle kaplı oldukları şeklindeki yeni ve tartışmalı bir bulgu anti-anjiogenik tümör tedavisini daha anlamlı hale getirmiştir. Tümör endotel hücreleri tarafından yapılan hücre yüzeyinde spesifik olan epitoplara, anti-kanser tedavisinde pro-apoptotik veya trombotik moleküllerin yapışması için cazip hedeflerdir. Mikroçevresel faktörler de tümörlerdeki endotel bariyerini belirleyebilmektedir. Çünkü tümörler ciltte büyüdüklerinde, beyinde büyümeleri durumunda olduğundan daha fazla fenestra içermektedir ^(31, 54).

f-Remodeling (yeniden modellenme, şekillenme)

Endotel hücrelerine doğru yönde gelişmeleri yönünde ve üç boyutlu ağlar oluşturacak şekilde yol gösteren spatial (mekansal) ipuçları hakkında şu ana dek çok az şey bilinmektedir. Bu, terapötik anjiogenez için önemli bir hedef teşkil etmektedir. Endotel ağının matürasyonu, uniform büyüklükteki kapiller-benzeri damarların remodeling'ini ve bazılarının ayıklanmasını ve dallanan damar yapılarından oluşan yapılandırılmış bir ağ yapısına düzensiz bir şekilde organize olmayı içermektedir. Gen inaktivasyon çalışmaları, farklı VEGF izoformlarının ve VEGFR3'ün endotelial "orphan" reseptörü Tie1, T-hücreli-lösemi protein stem cell lösemi faktörü/tal-1, TEL, GTP bağlayıcı protein Gα13, kemokin reseptörü 4, VCAM-1, α4 integrin ve fibronektin açısından değişik morfojenetik fonksiyonlarının olduğunu göstermektedir ⁽⁹⁾.



Şekil 4.6. Anjiogenez prosesi ⁽⁴⁸⁾.

Şekil 4.6.'da verilen anjiogenez prosesinin basamakları;

1) Tümörler yakın dokulara difüze olabilen anjiogenez büyüme faktörlerini üretir ve çevreye salarlar.

- 2) Anjiogenik büyüme faktörleri yakınında bulunan önceden var olan kan damarlarının endotelial hücrelerinde lokalize olan spesifik reseptörlere bağlanırlar.
- 3) Büyüme faktörleri reseptörlerine bağlanır bağlanmaz, endotelial hücreler active olur. Sinyaller hücre yüzeyinden nükleusa gönderilir. Endotelial hücrelerde yeni proteinler, enzimler üretilmeye başlanır.
- 4) Enzimler, kan damarlarını çevreleyen bazal membranda küçük delikler açar.
- 5) Endotelial hücreler bölünmeye başlar ve tümöre doğru var olan damarlardaki küçük deliklerin açılmasıyla göç eder.
- 6) Adezyon molekülleri veya integrinler ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$) olarak adlandırılan özel moleküller çıkıntılarının yeni kan damarlarına doğru çekilmesine yardımcı olur.
- 7) Ek enzimler (matriks metalloproteinazlar veya MMP) çıkıntı yapan damar dokusunda üretilir. Damar uzadığı zaman, damar çevresinde doku yeniden modellenir.
- 8) Dallanan endotelial hücreler, kan damarı tüpünü oluşturmak için yuvarlanırlar.
- 9) Kan sirkülasyonu yapabilen kan damarı looplarını oluşturmak için ayrı kan damarı tüplerine bağlanırlar.
- 10) Sonuçta, yeni oluşan kan damarı tüpleri, yapısal destek sağlayan özelleşmiş kas hücreleri (düz kas hücreleri, perisitler) tarafından stabilize edilir. Daha sonra kan akışı başlar ⁽⁴⁸⁾.

4.3.3. Angiogeneze ve Kansere

İlk olarak 1971 yılında Judah Folkman tümör büyümesinin yeni bir kan damarı oluşumuna bağlı olduğunu düşünmüştür. Solid tümörlerin büyümesine destek olan bu önemli prosese angiogeneze adı verilmiştir. İnsan karsinomalarının yaklaşık olarak %95'i vasküler olmayan epitelyal tabakadaki in situ lezyonlardan kaynaklanır. Bu mikroskopik tümörler, yalnızca nodül çevresindeki dokuların vaskülarizasyonundan sonra büyüyebilirler ⁽²²⁾. Tümör mikroçevresindeki anjiogenik cevap, stroma komponentleri ve tümör hücreleri tarafından sekrete edilen pro-anjiogenik ve anti-anjiogenik faktörlerin dengesine bağlıdır (anjiogenik dönüşüm).

Damarlanma hem tümör büyümesi hem de metastaz oluşumunda çok önemlidir. Difüzyon yoluyla beslenmenin 2-3 mm'yi geçmeyeceği düşünülürse, damarlanması iyi olmayan tümörün nekroza gideceği kolayca anlaşılır. Boyutu 2-3 mm³ 'ün üstünde olan tümörler, besin ve oksijen sağlamak için vasküler desteğe ihtiyaç duyarlar. Damarlanma için gerekli faktörler, hem tümör hücrelerinden hem de makrofajlar ve diğer iltihap hücrelerinden salgılanmaktadır. Bu faktörler arasında en önemlileri VEGF ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) sayılabilir ⁽¹¹³⁾. VEGF gibi anjiogenik büyüme faktörlerinin sekresyonu ile önceden var olan kan damarlarından yeni damarlar gelişir (anjiogenez). VEGF önceden var olan endotelyumdaki reseptörlerine bağlanır, endotelial hücre proliferasyonunu stimüle eder ve vasküler dallanmalar ile tümör içerisinde göç olur. Bu dallanmalar, sonuçta tümör içerisinde yeni kan damarlarını oluşturur. VEGF, endotelial damar oluşumu için kemik iliğinden endotelial öncü hücrelerin katılmasıyla vaskülogenezde de rol oynar. Yeni damarlar tümöre yeni yollar sağlar, tümör hücreleri kan sirkülasyonuna girebilir ve uzak yerlere metastaz yapabilir ^(54, 8).

Buna karşılık, bizzat tümör hücrelerinden salınan ya da indüklenen; trombospondin 1, angiostatin, endostatin gibi moleküllerden oluşan antianjiogenik faktörler unutulmamalıdır. Genetik mutasyonlar sonucu tümör baskılayıcı genin (p53) fonksiyon kaybı, trombospondin gibi anjiogenez inhibitörlerinde azalmaya sebep olur ve VEGF sekresyonunu artırır.

Ayrıca tümör hücre apoptozisindeki azalmalar tümör anjiogenezinin başlamasına neden olur. Buna karşılık EGFR, önemli bir lenfanjiogenik sitokin olan VEGF-C'yi upregüle eder ⁽³¹⁾.

Tümörlerde VEGF üretiminin artmasının, tümör vaskülaritesinin ve metastazın, artmasıyla ilişkisi vardır ve VEGF-negatif tümörler ile karşılaştırıldığında daha zayıf prognoza sahiptir. Sirküle olan VEGF meme, akciğer ve gastrointestinal

kanserlerinde artmaktadır. Ameliyat sonrası örneklerde fazla VEGF ekspresyonu olan meme tümörleri, düşük VEGF seviyeli tümör örnekleri ile karşılaştırıldığında fazla VEGF ekspresyonu olan tümörlerde erken çöküş görülmüştür. Bu nedenle, VEGF ekspresyonu prognostik bir belirteç olarak rol oynayabilir, sirkülasyonda veya tümör dokusundaki yüksek VEGF seviyeleri yaşam süresini negatif olarak etkilemektedir. Bu durumun VEGF'in tümörde anjiogenezi arttırması mı, yoksa kanserin gelişiminde oynadığı diğer roller nedeniyle mi olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir ⁽⁸⁰⁾.

VEGF mRNA neoplastik hücrelerde eksprese edilir, fakat çok az miktarda endotelial hücreler tarafından da sentezlenir. Aksine, endotelial hücreler VEGFR1 ve VEGFR2 mRNA ve proteinlerini eksprese ederler. Neoplastik hücrelerden salınan VEGF yakın çevredeki endotelial hücreleri etkiler. Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, VEGF'in hem neoplastik hem de endotelial hücrelerde lokalize olduğu gösterilmiştir ⁽¹¹³⁾.

Dvorak ve ark.'ları, kobaylarda ve insanlarda yaptıkları çalışmalarda VEGF proteininin solid tümörlere yakın damarlarda biriktiğini, fakat tümörden 0,5 mm'den daha uzakta bulunan damarlarda ise bulunmadığını göstermişlerdir ⁽⁵⁴⁾.

Anti-anjiogenik tedavilerin çoğunda VEGFR-aracılı sinyal yollarının bloklanması amaçlanır. VEGF/VEGFR sistemi iyi karakterize edilmesine rağmen, VEGF için anjiogenik sinyalleri aktive edebilen endotelial hücreler üzerinde bulunan diğer reseptör-benzeri moleküller tam olarak bilinmemektedir ⁽¹²⁷⁾.

4.3.4. Kanserde siRNA Aracılığı İle VEGF Gen İnhibisyonu

Kanser hücreleri, yoğun bir sinyal transdüksiyon yol ağı ile karakterize edilmektedir. Ancak bu yolda yer alan tüm onkogenler eşit olarak karsinogeneze katılmazlar. Bu nedenle kanserde gen susturmasında başarılı olmak için; onkogenez

yolları, apoptozis, hücre siklus regülasyonu, hücre yaşlanması, tümör-konak etkileşimi ve konvansiyonel tedavilere direnç mekanizmalarının iyi bilinmesi gereklidir.

Gen ekspresyonunun susturulmasında yüksek etkinlik ve spesifiteye sahip olan RNAi teknolojisi, hem kanser gelişimine neden olan genlerdeki değişiklikler hem de potansiyel terapötik stratejiler açısından araştırılmaktadır. Bununla birlikte birçok kanser olgusunda tek bir genin bloklanması, hastalığı ortadan kaldırmak için yeterli değildir. Aynı zamanda birçok sinyal yolunu inhibe etmek veya diğer tedaviler ile gen susturmasını kombine etmek gerekebilir.

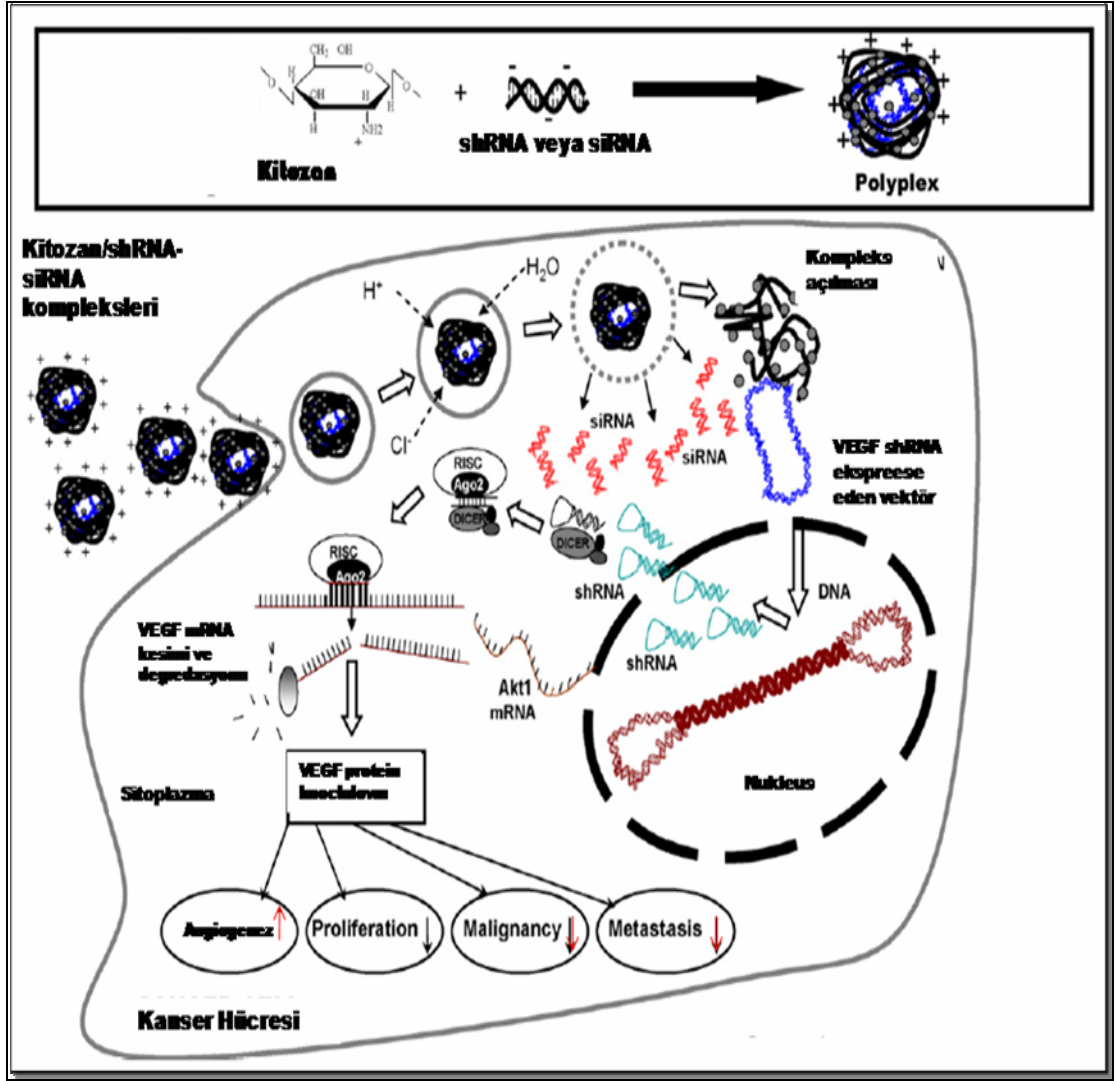
Kanser, AMD (age-related macular degeneration) ve inflamatuvar hastalıklarda, VEGF aile üyelerini hedefleyen Anti-VEGF antikorları, (Bevacizumab (Avastin®) ve Ranibizumab (Lucentis®)), solubl VEGFR'leri, VEGFA₁₆₅ aptamerleri (Pegaptinib (Macugen®)) ve reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörleri gibi anti-anjiyogenik ajanlar çoğunlukla tümör büyümesini ve vaskülarizasyonunu inhibe etmek için kullanılmaktadır. Günümüzde birkaç siRNA terapötüğü, makular dejenerasyon, solunum yolu hastalıkları ve kanserlerin tedavisinde klinikte kullanım için geliştirilmektedir (**Tablo 4.6**)⁽¹⁵⁷⁾.

Kanser tedavisinde anti-anjiyenez aktiviteyi başarmak için iki farklı yaklaşım kullanılmaktadır (**Şekil 4.7.**); 1. Sentetik siRNA aracılı inhibisyon, 2. Plazmid temelli vektör, shRNA'lar ile inhibisyon. siRNA, özellikle hem potenslik hem de sekansa-spesifik seçicilik açısından hücre kültürü anti-anjiyenez çalışmalarında güçlü bir inhibitördür^(157, 152).

Tablo 4.6. Klinik tedaviler için geliştirilen siRNA terapötikleri ⁽¹⁵⁷⁾.

Şirket	Ürün	Hedef Gen	Hedef Hastalık	Verime Yolu	Faz
Opko Health	Bevasiranib (Cand 5)	VEGF	AMD DME	Intravitreal	Faz III FazII
Allergan	AGN211745 (Sirna 027)	VEGF Reseptör	AMD	Intravitreal	Faz II
Alnylam Farmasötik	ALN-RSV01	RSV	RSV Enfeksiyonu	Intranasal	Faz II
Quark Farmasötik	RTP801i-14 AKli-5	RTP801 P53	AMD ARF	Intravitreal Intravenöz	Faz I Faz I
Calando Farmasötik	CALAA-01	Ribonükleotid redüktazın M2 subünitesi	Solid tümör	Intravenöz	Faz I
Nucleonics	NUC B1000	HBV	HBV enfeksiyonu	Intravenöz	FazI
Transderm	TD101	Keratin 6a'da tek nükleotid mutasyonu	PC	Intradermal	Faz I

DME: Diabetik makular ödem, RSV: respiratuar sinsityal virüs, AMD: yaşla-ilişkili makular dejenerasyon, HBV:Hepatit B virüs, ARF:Akut renal hasar, PC: Pachyonychia konjenital.



Şekil 4.7. Kanser hücresine VEGF-hedeflenen siRNA ya da shRNA salımının şematik gösterimi.

Schiffelers ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, siRNA nanoplekslerini tümör anjiogenezinin VEGF-aracılı yolunu inhibe etmek amacıyla kullanmışlar, tümör içerisinde protein ekspresyonunun sekansa spesifik inhibisyonu ve tümör anjiogenezi ve büyüme oranının inhibisyonu amacıyla tümör taşıyan fareye i.v olarak siRNA vermişlerdir. Sonuçta hazırladıkları siRNA nanopleksler ile nanopartikül ligand aracılığıyla tümör dokusuna seçici olarak taşınma ve siRNA oligonükleotid aracılığıyla gene spesifik hedefleme olmak üzere iki seviyede hedeflemeyi başarmışlardır. Böylece oluşturdıkları sistemde, siRNA'nın gen sekans seçiciliği ile dokuya hedeflenen seçicilik kombine edilmiştir⁽¹⁶⁴⁾.

Takei ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, insan prostat kanser hücre dizisinde (PC-3) in vitro ve in vivo olarak VEGF ekspresyonunu inhibe etmeye çalışmışlardır. Bu amaçla 4°C'de sıvı, 37°C'de jel kıvamında olan atelokollojen kullanmışlardır. Atelokollojen hücresel alımı, nükleaz direncini, tümöre enjekte edilen siRNA'nın etkin transfeksiyonu, stabilizasyonunu ve tümöre verilen siRNA'nın uzun süreli salımını artırmak amacıyla denenmiştir. Atelokollojen ile taşınan VEGF siRNA, tümör anjiogenezi belirgin bir şekilde baskılamış ve fare tümör modelinde tümör büyümesini inhibe etmiştir ⁽¹⁷⁹⁾.

Chono ve ark.'ları metastatik tümör modeline, siRNA'nın sistematik olarak taşınması için lipozom-protamin-hyaluronik asid (LPH) nanopartikül formülasyonu geliştirmişlerdir. İn vitro gen susturma çalışması stabil olarak lusiferaz eksprese eden B16F10 hücrelerinde yapılmıştır. Hücre dizilerinde nanopartiküllerin gen susturma etkinliği %40 bulunurken, B16F10 akciğer metastaz modelinde lüsiferaz aktivitesi %80 susturulmuştur ⁽⁴³⁾.

Kim ve ark.'ları, siRNA için yeni bir taşıyıcı sistem olan polielektrolit kompleksleri (PEC) çalışmışlardır. VEGF siRNA'yı PEG ile konjuge etmişler ve siRNA PEG konjugatı katyonik polietileniminle (PEI) etkileşerek PEC misellerini oluşturmuştur. Yapılan VEGF siRNA-PEG/PEI PEC miselleri siRNA'yı enzimatik degradasyona karşı korumuştur. Bu misellerin PC-3 hücrelerinde VEGF gen ekspresyonunu %96.5'a kadar susturduğu saptanmıştır. VEGF siRNA/PEI kompleksleri ile VEGF siRNA-PEG/PEI PEC miselleri, N/P oranları (0, 2, 4, 8, 16 ve 24) artırılarak karşılaştırıldığında salınan VEGF protein miktarında belirgin bir azalma görülmektedir. Aynı şekilde siRNA konsantrasyonu arttıkça VEGF protein miktarında da azalma olmuştur ⁽¹⁰²⁾.

Mulkeen ve ark.'ları, kolon kanser hücrelerinde VEGF-A'nın ekspresyonunu inhibe etmek amacıyla birkaç siRNA dizisi ve shRNA-VEGF plazmidini ve hücrelere, sentetik siRNA'ların transfeksiyonu amacıyla lipid-temelli ticari ajan oligofektamin, shRNA'ların transfeksiyonu için de yine lipid-temelli ticari ajan olan

lipofektamini kullanmışlardır. İnsan kolon kanser hücrelerinde (RKO hücre dizisi) VEGF-A ve VEGFR2'nin ekspresyonunu in vitro çalışmalar ile değerlendirmişler, VEGF mRNA'sını hedefleyen farklı miktarlarda siRNA (1, 12, 24, 36, 48 ve 50 nM) kullandıklarında VEGF ekspresyonunda transfeksiyondan sonraki 48. saatte %67,5-%94 susturma (en iyi susturma 12 nM), hücresel proliferasyonda ise %67 oranında azalma sağlamışlardır. Hücrelere shRNA-VEGF'in transfeksiyonundan 48 saat sonra ise VEGF protein ekspresyonunda %77 susturma sağlamışlardır ⁽¹³⁴⁾.

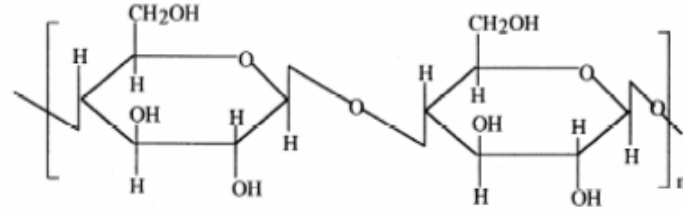
4.4. Kitozan Hakkında Genel Bilgiler

4.4.1. Kitozanın Yapısı ve Elde Edilmesi

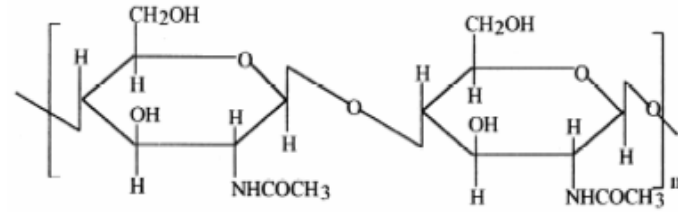
Kitin yengeç ve karides gibi deniz kabuklarının ve böceklerin dış iskeletinde, doğada selülozdan sonra en fazla bulunan ikinci polisakkarittir. Kitin yapı olarak selüloza benzer, genellikle selülozun bir türeği gibi görülür. Kitozan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen yüksek molekül ağırlıklı bir katyonik polisakkarittir. Kitin polimerinin temel ünitesi (**Şekil 4.8**) 1-4-bağlı-2-asetamid-2-deoksi-β-D-glukandır. Kitin ve selüloz, lineer β(1 4)-bağlantılı monosakkaritlerdir. Bununla birlikte, selülozla kitozan arasındaki en önemli farklılık, kitozanın glikozidik bağlantılar ile 2-amino-2-deoksi-β-D-glukan'dan oluşmasıdır. Kitozan yapı olarak, glukozamin ve N-asetil glukozamin monomerlerinin β-1,4 pozisyonunda bağlanması ile oluşan bir polimer şeklindedir (**Şekil 4.9**) ⁽¹⁷⁶⁾.

Kitozanın primer amin grupları farmasötik uygulamalarda polimere çok önemli bir özellik kazandırır. Diğer doğal polimerlerle karşılaştırıldığında, kitozan pozitif yüke sahiptir ve mukoadeziftir. Bu sebepten ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitin yapı olarak selüloza benzerlik gösterdiğinden, kitin uygulamaları kitozanla karşılaştırıldığında daha sınırlıdır. Kitinin asetamid grubu kitozanı oluşturmak için amino gruplarına dönüştürülür, bu reaksiyon kitinin konsantre alkali çözeltide (%40 NaOH) ve yüksek sıcaklıkla (120°C) muamele edilmesiyle gerçekleştirilir. Kitin ve kitozan birkaç milyon daltona kadar olan moleküler kütleyle sahip uzun zincirli polimerlerdir. Kitozan nispeten reaktiftir ve toz, pasta, fiber gibi farklı formlarda üretilir. Kitozanın üretim koşullarına bağlı

olarak molekül ağırlığı 25-2000 kDa, deasetilasyon derecesi %40-98 arasında geniş bir dağılım gösterir ⁽¹⁷⁶⁾.

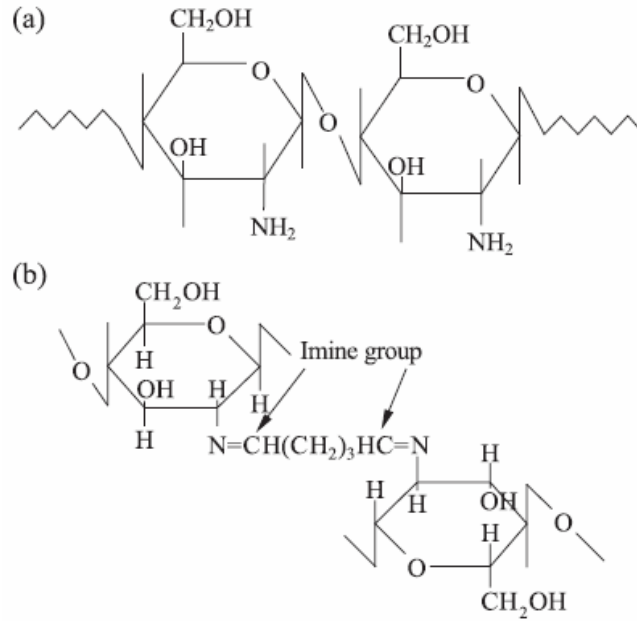


SELÜLOZ



KİTİN

Şekil. 4.8. Sellüloz ve kitinin moleküler yapısı ⁽¹⁷⁶⁾.



Şekil 4.9. a) Kitozan yapısı [poli (1-4-D-glukozamin)] b) Çapraz bağlantılı kitozan yapısı ⁽¹⁷⁶⁾.

Fizyolojik çevrede, kitozan biyolojik açıdan uyumlu, lizozim enzimleriyle veya intestinal flora tarafından üretilen belli bakteriyel polisakkaritleri degrades eden enzimler ile parçalanabilen, parçalanma ürünleri toksik özellik göstermeyen doğal bir polisakkarittir. Kitozanın hem i.v. hem de oral yoldan kullanılması durumunda biyolojik açıdan geçimli olduğu saptanmıştır. Ayrıca kitozan zararlı bir monomer içermediğinden fizyolojik olarak da güvenilirdir ⁽¹⁷²⁾.

4.4.2. Kitozanın Fizikokimyasal Özellikleri

Kitozanın deasetilasyon derecesi, kristal yapısı, monomer sayısı, viskozitesi, su tutma özelliği, molekül ağırlığı, pKa değeri ve hidrasyon enerjisi önemli özellikleridir.

Kitin beyaz renkte, suda çözünmeyen bir polimerdir. Kitinin deasetilasyon ürünü olan kitozan ise asetik asit, formik asit, sitrik asit gibi pek çok organik asitte çözünür, ancak fosforik ve sülfirik asitte çözünmez. Asit ortamında amino gruplarının protonlanması sonucunda ise suda çözünebilir.

Kitozanın deasetillenmiş birimlerinin yani glukozaminlerinin mol fraksiyonu, deasetilasyon derecesi olarak bilinir ve bu değer %40-98 arasında değişmektedir. Düşük deasetilasyon seviyesine sahip kitozan (%40) pH 9 ve üzerinde çözünürken, yüksek deasetile kitozan (%85) pH 6,5 ve altında çözünür. Kitozanın deasetilasyon derecesi, polikasyonik özelliğini gösterir. N-asetil gruplarının bulunuşu ise hidrofobik özellik verir ⁽⁸⁷⁾.

Genellikle kitozanın deasetilasyon derecesi (DD), yük yoğunluğu, çözünürlük, kristalite ve degradasyon gibi polimer özelliklerini etkiler. DD ve moleküler ağırlık, partikül boyutu, partikül formasyonu ve agregasyonu etkileyen başlıca faktörlerdir ⁽¹⁷⁷⁾. Tae-Hee ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, gen transfeksiyon etkinliğinde asetik anhidrid ile asetillenmiş kitozanın deasetilasyon derecesi araştırılmıştır; çalışılan birçok kitozan/DNA komplekslerinde, deasetile (%80) kitozan

kullanılmıştır. Bu sonuçlar da gösteriyor ki, DNA bağlanma etkinliği, azalan DD ile düşer, bu nedenle tam DNA kompleksasyonunu etkilediği için $\pm$ yük oranının artması gereklidir ⁽¹⁷⁷⁾.

Kitozanın çözünürlüğü, serbest amino ve N-asetil gruplarının dağılımına bağlıdır. Genellikle %1-3 sulu asetik asitte kitozan çözündürülebilir. Kitozan biyolojik pH'larda (pH<6) pozitif yüklüdür. Nötral pH'larda ise çöker. Kitozan çözeltisinin içerisine iyon eklenmesi çözünürlüğü etkiler. Bunun nedeni, birbirlerine komşu olan glukozamin birimlerinin birbirlerini itmeleri nedeniyle kitozanın çözelti içerisinde serbest formda kalmasıdır. Çözeltiye bir elektrolit eklendiğinde bu serbest formu oluşturuucu etki azalır ve sarmalımsı gelişigüzel bir yapı oluşur. Bu şekilde elektrolit konsantrasyonu arttıkça iyonik kuvvet de artacağından 'salting-out' etkisiyle kitozan çöker ⁽⁵⁶⁾.

Kitozan yüksek moleküler ağırlığı ve doğrusal dallanmamış yapısı nedeniyle viskozite arttırıcı bir polimer olarak kullanılabılır. Kitozan çözeltisinin viskozitesi, kitozan konsantrasyonu ve deasetilasyon derecesi ile doğru orantılı, sıcaklıkla ise ters orantılı olarak artar.

4.4.3. Kitozanın Genel Kullanımı

İlk olarak 1975'de kitozan Japon endüstrisinde atık suların temizlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra, kitin, kitozan ve türevlerinin pratik uygulamalarını geliştirmek için çaba sarfedilmiştir.

Kitozanın genel kullanımı;

- Tarım alanında
- Fotoğrafçılıkta
- Kağıt ve tekstil sanayinde
- Hayvan yemlerinde
- Zehirli maddelerin uzaklaştırılmasında
- Canlı hücrelerin ve enzimlerin immobilizasyonunda
- Kozmetik sanayinde

- Biyomedikal amaçlı (Kontakt lens, ortopedi, diş hekimliği, yara-yanık tedavisi)
- Farmasötik endüstride (katı ve kontrollü salım dozaj formlarında, yara tedavisi ürünlerinde, gen taşıyıcı sistemlerde) ^(151, 172)

4.4.4. Gen Taşıyıcı Sistem Olarak Kitozan

Gen tedavisinin başarısı, etkin vektör sistemlerinin kullanılması ile sağlanır. Gen tedavisi günümüzde AIDS, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok farklı sağlık probleminde uygulanmaktadır. Birkaç deneme için kullanılan gen tedavi protokolleri kistik fibrozisli hastalarda ve adenoazin deaminaz eksikliğinde başarıyla tamamlanmıştır. Bununla birlikte bazı vakalarda gen transfer vektörlerinin etkin olmayışı nedeniyle etki sağlanamamaktadır ⁽¹⁶¹⁾.

İnsan vücuduna yabancı genetik materyali transfer etmek için birkaç sistem kullanılır. Transfer edilen DNA, makromoleküllerin birikimini etkileyen proseslerden kaçmak zorundadır. Bu prosesler; kan komponentleri ile etkileşim, vasküler endotelial hücreler ve retikuloendotelial sistem tarafından alınma gibi sayılabilir. Ayrıca serum nükleazlar tarafından terapötik DNA'nın degradasyonu, hedef hücreye fonksiyonel taşınması için potansiyel bir engel oluşturur ⁽¹⁶¹⁾.

Kitozan hücre membranını geçen ilaçların transportunu arttırmak için de kullanılır. Kitozanın katyonik polielektrolit yapısı; negatif yüklü mukozal yüzeyler, mukus ve DNA gibi diğer makromoleküller ile güçlü elektrostatik etkileşimini sağlar. Kitozanın intrinsik özellikleri, biyomedikal ve farmasötik uygulamalar için çekici bir polimer olmasını sağlar ^(24, 161).

Genelde kitozan-temelli plazmid DNA transferi, büyük ölçüde transfekte edilecek hücrelerin yüzeyi ve kitozanın karbonhidrat omurgası arasındaki iyonik ve iyonik olmayan etkileşimlere bağlıdır. Kitozan ile plazmid DNA taşınması, enzimatik degradasyon, etkin olmayan hücresel alım, endo-lizozomlarda enkapsülasyon, nükleik asit/polimer ayrılmasındaki başarısızlık ve nükleer lokalizasyon gibi birçok olası hücresel bariyerlerden geçmesi ile başarılabilir. PEI ile karşılaştırıldığında (genellikle yüksek transfeksiyon özelliğine sahip fakat oldukça

sitotoksik özellikte) kitozan daha düşük transfeksiyon etkinliğine sahiptir. Bu durum endo-lizozomalitik proton-sponge (hidrojen iyonlarını endozom içerisine alma) etkisinin zayıf olması ile ilişkilidir ve PEI ve kitozanın tamponlama kapasiteleri arasındaki farklılıktan kaynaklanır. Bununla birlikte kitozan bir membran bozucusu olarak da tanınmaktadır ^(84, 110).

Fang ve ark.'ları membran yapısını bozmada kitozanın etkilerini araştırmışlar ve kitozanın protonlanma derecesi ile bu etkinin artması arasındaki ilişkiyi saptamışlardır ⁽⁵⁷⁾. 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC) çift tabaka-kitozan etkileşiminde pH ve kitozanın molekül ağırlığının etkilerini çalışmışlardır ⁽⁵⁶⁾. Kitozanın mol fraksiyonundaki artış, molekül ağırlığındaki artışa karşın yardımcı ünitelerde önemli azalmaya yol açar. Kitozan çift katlı lipid membranı kıvrılarak geçebilir ve polipleksin hücre alımını kolaylaştırabilir. Kitozan yaklaşık olarak pKa değeri 6,5 olan primer amin gruplarına sahiptir. Asidik sulu vasatta pozitif yüklü tek helikoidal formda katı zincirler oluşturur. Kitozanın pozitif yüzey yükü, eksojen nükleik asit, negatif yüklü mukozal yüzeyler ve plasma membranı gibi farklı makromoleküller ile etkileşmesini sağlar. Buna ilaveten, kitozanın konfigürasyonu asidik pH altında tam olarak değişebilir ve bu konfigürasyondaki kitozan hücreler arası sıkı bağlantıları açmaya başlayabilir ve bu nedenle hidrofilik ajanların parasellüler transportu artar ^(24, 161).

Taşıyıcı biyomateryal olarak kitozan ile DNA taşınmasıyla ilgili yapılan birçok çalışmada in vitro ve in vivo reporter genlerin etkin ekspresyonu gösterilmiştir, böylece kitozanın siRNA taşınmasında da etkin bir aday olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. İn vitro siRNA taşınmasında kitozanı kullanan ilk çalışma grubu Katas ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, kitozanın etkin bir taşıyıcı biyopolimer olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Katas ve ark.'larının çalışmasını, in vitro ve in vivo gen transferinde etkin bir sistem geliştirmek amacıyla, kitozan ve kitozan türevi polimerler üzerinde yapılan yeni çalışmalar izlemiştir ⁽⁹⁹⁾.

İlk olarak 1995 yılında Mumper ve arkadaşları tarafından kitozanın gen taşıyıcı özelliği araştırılmıştır ⁽¹³⁵⁾. Araştırmacılar plazmid DNA ile farklı molekül

ağırlığındaki (108-540 kDa) kitozanı birbiriyle karıştırarak farklı boyutlarda (150-500 nm) kompleksler hazırlamışlardır. Hazırlanan komplekslerin in vitro özelliklerini incelemişler ve oluşan kompleks boyutunun formülasyonda kullanılan kitozanın molekül ağırlığına bağlı olarak değiştiğini saptamışlardır. DNA ve kitozan kompleksleri ile ilgili bu yapılan ilk çalışmayı, gen transferinde etkin bir sistem geliştirmek amacıyla yeni çalışmalar izlemiştir. Tae-Hee ve ark.'ları ⁽¹⁷⁷⁾, gen transfeksiyon etkinliğinde asetik anhidrid ile asetillenmiş kitozanın deasetilasyon derecesinin etkisini araştırmışlar ve birçok kitozan/DNA kompleksinde oldukça deasetile kitozan kullanmışlardır. Sonuçta DNA bağlanma etkinliğinin azalan deasetilasyon derecesi ile azaldığını göstermişlerdir. Deasetilasyon derecesindeki azalma, nanopartiküllerin stabilizasyonlarının bozulması nedeniyle hücrelerdeki lüsiferaz ekspresyon seviyesinin azalmasına yol açmıştır ⁽¹⁷⁷⁾.

Benzer şekilde Huang ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, kitozan/DNA nanopartiküllerinin A549 hücreleri tarafından alımı, önemli ölçüde kitozanın deasetilasyon derecesinin düşmesi ile azalmaktadır ve düşük transfeksiyon etkinliği ile sonuçlanmaktadır ⁽⁸⁴⁾. Diğer yandan Lavertu ve ark.'ları aynı zamanlı düşük molekül ağırlığı ve artan deasetilasyon derecesi veya düşük deasetilasyon derecesi ve artan molekül ağırlığı ile maksimum ekspresyon seviyesini elde ettiklerini göstermişlerdir. Partikül stabilitesinin rolünü ve yardımcı elektrostatik bağlanmaların, transfeksiyon etkinliğinin tanımlanmasında önemli olduğunu vurgulamışlardır ⁽¹¹¹⁾.

Kitozanın molekül ağırlığı, ortamın biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinden önemli ölçüde etkilenir. Ayrıca molekül ağırlığındaki değişiklikler gen transfer etkinliğini etkileyebilir. Yüksek molekül ağırlıklı kitozan, DNA ile elektrostatik etkileşim başlar başlamaz daha kolay kompleks haline gelebilir. Huang ve ark.'ları, düşük molekül ağırlıklı kitozanın dilüsyon süresince DNA'yı korumada daha az etkin olduğunu ve DNAaz ve serum komponentleri tarafından parçalanmaya karşı kondanse DNA'yı daha az koruduğunu ve sonuçta düşük molekül ağırlıklı kitozanın düşük transfeksiyon etkinliği gösterdiğini saptamışlardır ⁽⁸⁴⁾.

Asidik pH'da (pH 5,5 ve altı), kitozandaki primer aminler pozitif yüklüdür, pKa değeri 6,3-6,4 civarındadır. Komplekslerin transfeksiyon etkinliği kültür vasatının pH'ına bağlıdır, çünkü kitozanın protonlanmış aminleri negatif yüklü DNA'ya bağlanmayı kolaylaştırır. Sato ve ark.'ları pH 6,9 ve 7,6 arasında A549 hücrelerinin transfeksiyon etkinliğini karşılaştırmışlardır. Sonuçlarda pH 6,9'un transfeksiyon etkinliğinin pH 7,6'dan daha fazla olduğu görülmüştür çünkü pH 6,9 'da DNA/ kitozan kompleksleri pozitif yüklüdür ve elektrostatik etkileşimle negatif yüklü hücrelere bağlanabilir ⁽¹⁶²⁾. Ayrıca Zhao ve ark.'ları kondrositlere transfeksiyon etkinliğinde transfeksiyon vasatının pH değerinin transfeksiyon etkinliğine olan etkisini araştırmışlardır. En yüksek ekspresyon etkinliği pH 6,8 ve 7,0'da elde edilmiştir; transfeksiyon etkinliği transfeksiyon vasatının pH'sı 7,4'e yükseldiğinde belirgin olarak azalmıştır. Bu durum, daha yüksek pH'da kompleksten serbest plazmidin ayrılması nedeniyle oluşmuştur ⁽²⁰⁹⁾.

Komplekslerin yük oranı (N/P), kitozanın nitrojen ve DNA'nın fosfat gruplarının stokiometrisi ile verilir. Lavertu ve ark.'ları yaptıkları çalışmada farklı deasetilasyon dereceleri ve farklı molekül ağırlıklarına sahip kitozanlar sentez etmişler, bu sentezledikleri kitozanların fizikokimyasal karakterizasyonunu yaptıktan sonra in vitro transfeksiyonda kullanmışlardır. Sonuçta, kitozanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi arasında önemli bir ilişki bulunduğunu saptamışlardır ⁽¹¹¹⁾. Kitozanın molekül ağırlığı azaltılıp deasetilasyon derecesi arttırıldığında veya deasetilasyon derecesi azaltılıp molekül ağırlığı arttırıldığında benzer ekspresyon düzeylerine ulaşılması, transfeksiyon etkinliğinin tayin edilmesinde elektrostatik bağlanma ile sağlanan partikül stabilitesinin baskın rolünün olduğunu düşündürmektedir. N/P oranı düşük olduğunda fiziksel olarak stabil olmayan ve transfeksiyon etkinliği düşük kompleksler oluşur, fakat N/P oranı çok yüksek olduğunda kompleksler daha çok stabil hale gelir, transfeksiyon daha da azalır, bu nedenle kullanılan kitozana spesifik optimal aralıkta N/P oranı seçilmelidir.

DNA ile kompleks oluşumunda, etkin bir gen taşıma sisteminde hücre içerisine genin transportu ve girdikten sonra hücre içerisinde salınması, gen ekspresyonu için nükleus içerisine girmesi ve sonuçta protein sentezine yol açması gereklidir. Kitozan-

aracılı transfeksiyon hücre tipine bağımlıdır, bu nedenle farklı hücre dizilerinde gen taşıma özelliğinin test edilmesi gereklidir. Farklı hücre tipleri arasında hücresel membran kompozisyonu farklılık gösterir ve bu durum komplekslerin bağlanmasını ve daha sonra internalizasyonunu ya kolaylaştırır veya engeller. Kitozan/DNA kompleksleri başlıca HeLa, HEK293, A549 ve COS-1 hücreleri gibi farklı hücre tiplerinde çalışılmıştır, fakat mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu konuda Corsi ve ark.'ları, kitozan/DNA komplekslerinin transfeksiyonu için HEK293 ve M69 mezenkimal hücreleri ve MG63 hücre dizilerini karşılaştırmışlar, HEK293 hücrelerine transfeksiyon etkinliğinin en fazla olduğunu tespit etmişlerdir ⁽⁴⁶⁾. İlginç olarak Köping-Höggard ve ark.'ları ultrasaf ve toksik olmayan kitozan kompleksleri ile HEK293 hücrelerinde transgen ekspresyonunu, PEI ile yapılan çalışma sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Ultrasaf kitozan komplekslerinin, HT-1080 ve Caco-2 gibi daha farklılaşmış epitelyal hücrelerinde PEI'den daha az etkin olmasına rağmen, oldukça saflaştırılmış kitozanın diğer az veya çok toksik katyonik polimerlere göre daha yüksek transfeksiyon etkinliği gösterdiğini saptamışlardır ⁽¹⁰⁶⁾. Özgel ve Akbuğa yaptıkları çalışmada, hIL-2 genini taşıyan plazmid DNA ile kitozan, PEI ve DOTAP polimerlerini belli oranlarda karıştırarak kompleks formülasyonları hazırlamışlardır. Hazırladıkları komplekslerin fizikokimyasal özelliklerini (partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, enzim ve serum stabilitesi) incelemişler ve in vitro transfeksiyon etkinliklerini araştırmışlardır. Sonuçta komplekslerin serum ve enzime karşı oldukça stabil olduğunu bulmuşlardır. İn vitro transfeksiyon çalışmalarını HeLa ve 3T3 hücrelerinde yapmışlar ve transfeksiyon etkinliğinin DOTAP/DNA>PEI/DNA>Kitozan/DNA şeklinde gerçekleştiğini, transfeksiyon etkinliğinin hücre tipine bağlı olarak değiştiğini ve HeLa hücrelerinde 3T3 hücrelerine göre daha fazla transfeksiyon etkinliğinin elde edildiğini göstermişlerdir ⁽¹⁴⁵⁾.

Günümüzde kitozan mikro ve nanopartikülleri ilaç taşıyıcı sistemler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Özellikle kitozanla hazırlanan bu partiküler sistemler, kolay hazırlama metodu ve karakterizasyonu, biyouyumlu, biyoparçalanabilir olması, stabil olması, immunojenik ve toksik olmaması, suda çözünbilmesi, liyofilize edilebilmesi, birçok ilaç için uygun taşıyıcı özellikte olması

(küçük moleküller, proteinler ve polinükleotidler gibi) ve farklı şekillerde in vivo uygulanabilmeleri gibi özellikleri nedeniyle gün geçtikçe daha da önem kazanmaktadır ⁽¹⁸⁴⁾.

Özbaş-Turan ve ark.'ları tarafından, kitozan mikropartikülleri hazırlanarak iki farklı reporter geni taşıyan plazmid DNA moleküllerinin enkapsülasyonu ve serbestleşmesi çalışmaları yapılmıştır. B-galaktosidaz veya lüsiferaz genlerini taşıyan plazmid DNA ayrı ayrı veya birlikte enkapsüle edilerek kompleks koaservasyon yöntemiyle mikroküreler oluşturmuşlar ve oluşan mikrokürelerin in vitro ve in vivo özelliklerini çalışmışlardır. Sonuç olarak, plazmid DNA'lar yüksek oranda mikroküreler içerisine enkapsüle olmuştur ve enzimatik degradesyona karşı korunmuştur. Yapılan in vivo transfeksiyon çalışmalarında da β -galaktosidaz ve lüsiferaz gen ekspresyonları yüksek düzeyde elde edilmiştir ⁽¹⁴⁴⁾.

Li ve ark.'ları ise lüsiferaz kodlayan pGL3-kontrol ve β -galaktosidaz proteinini kodlayan pCH110 plazmidleri içeren kitozan nanopartikülleri hazırlamışlar ve bu hazırladıkları nanopartikülleri HEK-293 hücrelerine ve CHO-K1 hücrelerine uygulayarak plazmid DNA transfeksiyonunu araştırmışlardır. Sonuçta bu kitozan nanopartiküllerinin 10 gün içerisinde lüsiferaz ekspresyonunu sağlayabildiği ve artan başlangıç plazmid DNA miktarına göre de beta-galaktosidaz ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Kitozanın memeli hücreler üzerine toksisitesi gözlenmemiştir ⁽¹¹⁵⁾.

Bozkır ve ark.'ları, kitozan kullanarak pDNA ile nanopartikül formülasyonları hazırlamışlar ve hazırladıkları kitozan nanopartiküllerinin pDNA'yı enzimatik parçalanmadan koruyabildiğini, COS-7 hücrelerinde yapılan transfeksiyonun nanopartiküllerle çıplak pDNA'ya göre 3 kat daha iyi olduğunu belirtmişlerdir ⁽²⁶⁾.

Aral ve ark.'ları, kompleks koaservasyon yöntemi ile plazmid DNA içeren kitozan mikroküreler hazırlamışlardır. Çalışmalarında; plazmid DNA molekül ağırlığı, konsantrasyonu, DNA'nın formülasyona ilave edilme tekniği, kitozan konsantrasyonu gibi faktörlerin mikroküre formülasyonu üzerine etkilerini

araştırmışlardır. Ayrıca, oluşturulan plazmid DNA içeren mikrokürelerin in vitro salım ve in vivo transfeksiyon özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, oluşturulan mikroküre formülasyonları ile uzun süreli ve kontrollü bir salım elde edilebildiğini, mikrokürelerin in vitro ve in vivo özelliklerinin formülasyon faktörlerine bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir ⁽¹⁴⁾.

Akbuğa ve ark.'ları, hIL-2 genini taşıyan plazmid DNA molekülünün kitozan mikrokürelerde enkapsülasyonunu çalışmışlar ve kompleks koaservasyon yöntemi ile hazırladıkları plazmid DNA içeren kitozan mikrokürelerde; kitozanın molekül ağırlığı ve konsantrasyonu, plazmid DNA konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ilavesi gibi faktörlerin, formülasyon üzerine etkilerini; mikrokürelerden plazmid DNA'nın in vitro salım ve transfeksiyon özelliklerini incelemişlerdir. Kullanılan yöntem ile küresel, net pozitif yüzeyel yüke sahip ve plazmid DNA molekülünün %82-92 oranında enkapsüle edilebildiği mikrokürelerin oluştuğunu bildirmişlerdir. İn vitro salım çalışmalarında; mikrokürelerden plazmid DNA molekülünün salımında, kullanılan kitozanın molekül ağırlığı ve konsantrasyonu ile plazmid DNA miktarının etkili faktörler olduğunu, oluşturulan mikroküre formülasyonları ile yaklaşık 150 gün gibi uzun süreli ve kontrollü bir salımın elde edildiğini saptamışlardır. İn vitro transfeksiyon çalışmalarında ise; mikroküre formülasyonları ile neredeyse ticari transfeksiyon ajanı olan lipofektaminTM'e eşdeğer düzeyde transfeksiyon etkinliği ve gen ekspresyonunun sağlanabildiğini bildirmişlerdir ⁽⁵⁾.

4.4.5. siRNA Taşıyıcı Sistem Olarak Kitozan ve Kullanılan Farmasötik Şekiller

Kitozan hem plazmid DNA'yı transfer edebilme, hem de RNA'yı taşıyabilme özelliğine sahip bir polimerdir. Bu nedenle kitozan in vivo ve in vitro çalışmalarda çıplak siRNA'nın zayıf olan hücresel alımının artırılmasında ve hızlı degradasyona karşı korunmasında etkin olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Howard ve ark.'ları, in vitro ve in vivo RNAi uygulamaları için kitozan-temelli siRNA nanopartikül taşıyıcı sistemleri kullanmışlardır. siRNA dupleksleri (21-merlik) ve kitozan polimeri arasında oluşan kompleksler, 40-600 nm arasında

değişiklik göstermiştir. İn vitro çalışmada, NIH 3T3 hücrelerine Cy-5 etiketli nanopartiküller verildiğinde hücrelere 1 saat içerisinde kompleksler hızlı olarak alındığını ve 24 saat içerisinde biriktiğini semikonfokal epifloresans mikroskop kullanarak göstermişlerdir. Endojen arttırılmış yeşil floresan proteinin (EGFP) nanopartikül aracılı olarak susturulması hem H1299 insan akciğer karsinoma hücrelerinde ve murin peritoneal makrofajlarda (EGFP floresansındaki azalma %78-90) çalışılmıştır. Kitozan/siRNA formülasyonlarının transgenik EGFP farelere nasal olarak verilmesinden sonra bronşiol epitel hücrelerinde etkin in vivo RNA interferans başarılmıştır. Mismatch ve kontrol ile karşılaştırıldığında %37-43 oranında azalma görülmüştür. Bu çalışmada, akciğer hastalıklarının tedavisinde bir yaklaşım olarak respiratuar bölgelerde RNA interferans ve etkin taşıma için kitozanın mukoadhezif ve geçirgenlik özelliğinden faydalanılmıştır. Elde edilen bulgular ile siRNA taşıyıcı kitozan-temelli sistemlerin sistemik ve mukozal hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği gösterilmiştir ^(82, 202).

Sailong ve ark.'ları, gen susturması için siRNA taşıyıcı sistemler olarak kitozan/siRNA nanopartiküllerini kullanmışlar, siRNA ve kitozan arasındaki etkileşim gücünün nanopartiküllerin stabilite ve oluşumunu anlamada katkı sağlayacağını düşünmüşlerdir. Yaptıkları çalışmada, moleküller arası etkileşimlerde pH'ın, kitozan ve nükleik asit arasındaki kompleksasyon oranını ve nanopartiküllerin stabilite ve ayrılma oranlarını etkilediğini göstermişlerdir ⁽¹⁵⁹⁾. Bu çalışmada atomik kuvvet mikroskopisi kullanarak farklı pH'lardaki fizyolojik fosfat tampon tuzunda (PBS) ölçülen siRNA ve kitozan arasında etkileşim kuvvetlerini incelemişlerdir. Kuvvet ölçümlerinde, pH 4,1'den 6,1'e ve 7,4'den 9,5'a arttığı zaman, adhezif etkileşimler kuvvet gerginliği ve kuvvet frekansını azaltmıştır. Asidik pH'da siRNA ve kitozan molekülleri arasında etkileşim kuvvetleri farklı multimodal dağılımlar göstermiştir. Nötral veya alkali pH'da kitozan ve siRNA molekülleri arasında, kitozan moleküllerinin agregasyonu ve yük yoğunluğunun azalmasından dolayı daha az baz çiftinin temas etmesi nedeniyle etkileşim olmadığını düşünmüşlerdir. Düşük pH koşullarında, kuvvetli siRNA-kitozan etkileşiminde yüksek yük yoğunluğuna sahip siRNA ile kitozanın serbest olarak uzayan kısmı arasında birçok temas bölgesi oluşabilir. Bu durum, siRNA/kitozan nanopartiküllerinin iyi şekilde kompakt yapı

oluşturmasını ve stabilitesini yansıtır. siRNA/kitozan etkileşimlerinin güçlü pH-bağımlılığı, siRNA/kitozan kompleks oluşumunu ve düşük asidik koşullarda nanopartikül stabilitesini sağlayabilir. Bu bulgular, adesif kuvvet ölçümleri için kuvvet spektroskopisinin kullanılması ile siRNA ve kitozan arasında oluşan komplekslerin özellikleri değerlendirilebildiğini ve nanopartikül stabilitesinin tahmin etmede fayda sağlayabildiğini göstermektedir ⁽¹⁵⁹⁾.

Andersen ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, liyofilize katyonik polimer olan kitozan ile lipid (TransIT-TKO) siRNA formülasyonlarının gen susturma mekanizmaları için yeni bir metod tanımlamaya çalışmışlardır. Liyoprotektan olarak sükröz içeren kitozan/siRNA formülasyonu (~%70) ve TransIT-TKO/siRNA ile önceden kaplanmış plate'lerde transfekte edilen H1299 insan akciğer karsinoma hücrelerinde EGFP'nin (enhanced green fluorescent protein) etkin ve spesifik olarak susturulduğunu göstermişlerdir. Bu metod, hem kullanmadan önce acil olarak siRNA'nın çözündürülmesini hem de hücrelere eklenmesi gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca, yaklaşık olarak 2 ay oda sıcaklığında saklandığı zaman kitozan/siRNA formülasyonunun susturma aktivitesinin olduğu da gösterilmiştir. Lipid formülasyonu ile karşılaştırıldığında, kitozan sisteminde daha yüksek hücre canlılığı saptanmıştır. Proinflamatuvar sitokin olan tumor nekrozis faktörünün (TNF- α) susturulması, liyofilize kitozan/siRNA sisteminin kullanıldığı RAW makrofaj hücre dizisinde de gösterilmiştir, bu durum medikal uygulamaların biyoyumluluğunu arttırmak için kaplama yönteminin kullanılabileceğini desteklemektedir. Bu çalışma, daha uzun raf ömürlü terapötiklerin, biyoyumlu medikal implant komponentlerin ve gen fonksiyonunun taranması gibi potansiyel uygulama alanlarında dondurularak-kurutulan formülasyonların kullanılmasını amaçlayan etkin bir gen susturma yöntemini tanımlamaktadır ⁽¹²⁾.

Katas ve ark.'larının yaptıkları çalışma, siRNA için kitozan-temelli ilk araştırmalardandır. siRNA'nın potansiyel terapötik bir ilaç olarak kullanımı, in vitro ve in vivo hücrelere zayıf alımı ve hızlı parçalanması nedeniyle sınırlanmaktadır. Bu nedenle çalışmada düşük toksik özelliğe sahip, biyoparçalanabilen ve biyoyumlu olması gibi birçok avantaja sahip kitozanın siRNA taşıyıcısı olarak kullanılması

araştırılmıştır. Kitozan nanopartikülleri iyonik çapraz bağlanma, basit kompleksasyon ve TPP kullanarak yapılan iyonik şelasyon yöntemleriyle hazırlanmıştır. Kullanılan her iki metod ile kullanılan kitozanın tipine, moleküler ağırlığına ve konsantrasyonuna bağlı olarak 500 nm'den daha az nano boyutta partiküller oluşturulmuştur. İn vitro çalışmada CHOK1 ve HEK 293 hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre tiplerinde siRNA'nın kitozanla hazırlandığı formülasyonun, susturma etkinliğinde önemli rol oynadığı saptanmıştır. siRNA'nın enkapsüle olduğu kitozan-TPP nanopartikülleri, kitozan/siRNA kompleksleri ile karşılaştırıldığında, nanopartiküllerin yüksek bağlanma kapasitesi ve yükleme etkinliği nedeniyle daha iyi bir taşıyıcı sistem olarak kullanılabilecekleri gösterilmiştir. Bu nedenle, kitozan-TPP nanopartikülleri daha güvenli ve etkin siRNA taşınması için potansiyel bir taşıma aracı olarak kabul edilebilir ⁽⁹⁹⁾.

Liu ve ark.'ları, kitozan/siRNA nanopartiküllerinin fizikokimyasal özellikleri (boyut, zeta potansiyeli, morfoloji ve kompleks stabilitesi) ve in vitro susturma etkinlikleri, kitozanın moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesine kuvvetli şekilde bağlı olduğunu göstermişlerdir. Yüksek molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesine sahip kitozanlar ile yaklaşık 200 nm boyutunda stabil nanopartiküller oluşturmuşlardır. Düşük molekül ağırlıklı (10 kDa) kitozan ile hazırlanan kitozan/siRNA (N:P 50) formülasyonlar, H1299 insan akciğer karsinoma hücrelerine verildiğinde endojen EGFP'de önemli ölçüde bir susturma sağlanamamıştır, fakat daha yüksek molekül ağırlıklı (64,8-170 kDa) ve deasetilasyon dereceli (%80) kitozan ile hazırlanan formülasyonlarda gen susturma etkinliği %45-65 arasında değişmektedir. En yüksek gen susturma etkinliği (%80) daha yüksek molekül ağırlıklı (114-170 kDa) ve deasetilasyon dereceli (%84) kitozan/siRNA nanopartikülleri (N:P 150) kullanıldığında başarılmıştır, bu durum yaklaşık olarak 200 nm boyutunda stabil nanopartiküllerin oluşumu ile ilişkilidir. Bu çalışma sonucunda, siRNA için viral olmayan taşıyıcı sistem olarak kitozanın uygulanabilirliği ve kitozan/siRNA nanopartikülleri kullanılarak gen susturma etkinliğinin optimizasyonu için kitozanın polimerik özelliklerinin önemli olduğu vurgulanmıştır ⁽¹¹⁶⁾.

Rojanarata ve arkadaşları, kitozan ve tiamin pirofosfat (TPP) kullanarak yeni bir siRNA taşıyıcısını formüle etmişlerdir. Stabil ve devamlı olarak EGFP-ekspresse eden HepG2 hücrelerine (insan hepatokarsinoma hücre dizisi) siRNA'nın taşınmasını incelemişlerdir. Jel elektroforezi sonuçlarına göre, kitozan-TPP ve siRNA'nın bağlanması, kitozanın ağırlık oranına ve moleküler ağırlığına bağlı olarak değişebilir ve hazırlanan kitozan-TPP/siRNA komplekslerinin partikül boyutu ise nano boyuttadır. Çalışmada endojen EGFP geninin kitozan-TPP aracılı siRNA susturması maksimum %70-73 etkinlikle gerçekleşmiştir. En düşük molekül ağırlıklı kitozan (20 kDa) ile hazırlanan kitozan-TPP/siRNA kompleksinde en güçlü gen ekspresyonu sağlanmıştır. MTT yöntemi ile komplekslerin ortalama hücre canlılığı %90'nın üzerinde bulunmuştur. Bu çalışma ileride kitozan-TPP komplekslerinin in vitro siRNA taşımada, güvenli ve etkin olarak kullanılabileceğini göstermektedir ⁽¹⁵⁵⁾.

So-Ly Wang ve ark.'ları, shRNA için yeni bir taşıyıcı sistem geliştirmeye çalışmışlardır. Bu amaçla araştırmacılar, insan rabdomyosarkom RD hücre dizisinde TGF- β 1 ekspresyonunu inhibe etmek için shRNA ekspresse eden kitozan nanopartikül-aracılı taşıyıcı sistem kullanmışlardır. shRNA ile TGF- β 1'in susturulmasıyla in vitro RD hücre büyümesinde ve nude farelerin tümör hacminde azalma görülmüştür. Ayrıca TGF- β 1'in gen susturma etkinliği, hedef bölgelerin seçilmesi ile değişiklik göstermiştir ⁽¹⁹²⁾.

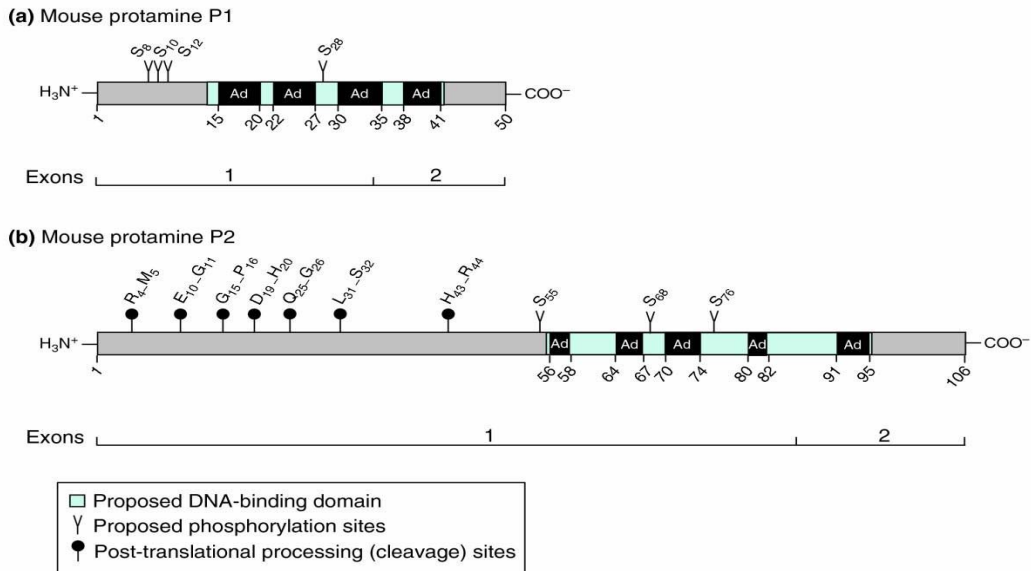
4.5. Protamin Hakkında Genel Bilgiler

Protamin yaklaşık 5 kDa ağırlığında düşük molekül ağırlıklı kuvvetli katyonik yapıda bir peptittir. pKa'sı 12-13 izoelektrik noktadadır. Yüksek oranda arginin (molar olarak %66 oranında) aminoasiti içermektedir ve bu nedenle yapısal olarak arginin aminoasiti ile benzerlik göstermektedir ⁽²¹⁾.

Protamin suda çözünen (10mg /ml) major bir komponenttir. Protein ve nükleik asitlerin komponentlerinin birbirlerine sıkıca bağlı olduğu kuvvetli bir yapıdan söz etmek mümkündür. Bu yapı bazı önemli özelliklere sahiptir ⁽²¹⁾.

4.5.1. Protaminin Yapısı

Protamin çok komplike yapıda bir protein değildir, bilakis tersine çok basit yapıdaki nükleoproteinlerden oluşur. Gerçekte, nukleozomlar için ayrıntılı bir moleküler model mevcuttur ^(21, 191). Protaminin histon komponenti, sekiz protein aktivitesine (alt ünitesine) sahiptir ve yaklaşık protaminden daha çok atomu bulunur. İnsan protamini P1 ve P2 isimli her biri 50 a.a. içeren iki zincirden oluşan küçük bir proteindir. Bu 50 amino asidin yarısı arginindir. Arginin olmayan yapılar ise lizin ve histidin amino asitlerini içerir. Böyle bir yapının yokluğunda sperm nükleoproteinlerinin oluşumu mümkün değildir. Protaminin DNA ve RNA ile kompleks oluşumunda argininin pozitif yüklü guanidin grupları, DNA ve RNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarına elektrostatik olarak bağlanır. Bu şekilde elektrostatik çekim yoluyla kompleksler oluşturulur. Yalnız bu komplekslerin stabilitesi konusunda problemler mevcuttur ^(53, 62). Protamin-DNA kompleksi hemen kristalize olabilen bir yapı değildir ve bu yüzden laboratuvar solusyonu stabil değildir. Uzun süreli dayanıklı kompleksler henüz oluşturulamamıştır. Protamin komplekslerle yapılan in vitro çalışmalarda uygulanacak kompleks formları uygulama öncesi hemen hazırlanıp yaklaşık 1 saat kompleksasyon süresi sonunda hemen hücreye verilmelidir ^(53, 62, 118).



Şekil 4.10. Fare protamin gen sekansı.

(<http://genomebiology.com/content/figures/gb-2007-8-9-227-1>).

Fare proteinlerinin (P1 ve P2) şematik şekli **Şekil 4.10.**'da gösterilmiştir. Aminoasit artıklarının numaraları işaretlenmiştir. Her iki proteinin de alt kısmında exon parçaları gösterilmiştir. DNA bağlantı alanları, 3 ve daha fazla sayıda arjinin ve lizin artıklarını içeren bölgelerdir. Fosforilasyon bölgeleri ya spermden izole edilen proteinlerin aminoasit kalıntılarının fosforilasyonu ya da cAMP-bağlı protein kinaz ya da protein kinaz C ile beş memeli türünden izole edilmiş proteinlerin in vitro inkübasyonu ile aydınlatılmıştır.

Protamin molekülü ile ilgili literatürlerde geniş bir bilgiye rastlanamamaktadır. Araştırılan yeni bir moleküldür. Özellikle hücre içine taşınmada ekspresyonu artırıcı özellikleri üzerinde durulmaktadır. Taşıyıcı sistem olarak protamin ve böyle önemli bir yapının moleküler modeli daha evvel ortaya çıkarılamamıştır ^(21, 62, 118).

Öncelikle sperm hücrelerinde, protamin ve DNA arasında bazı basit kompleks oluşumunun varlığı gösterilmiştir. Protamin ve DNA arasındaki etkileşim kesinlikle elektrostatik bir etkileşimdir, çünkü protamin pozitif yüklü bir peptittir ve üzerindeki pozitif yüklü yapılar DNA'daki negatif yüklü fosfat gruplarıyla bağlanarak bir kompleks yapı oluşturmaktadır. Özellikle sperm hücrelerinde kuvvetli bir protamin ve DNA kompleksi bulunmaktadır ⁽¹⁴⁷⁾.

Protamin antibakteriyel özelliklere sahiptir. Pepsin aktivitesini inhibe eder. Protamin sülfat ve diğer polikasyonlar, komplementin klasik yolunu inhibe eder. Heparinin antikoagülan aktivitesini nötralize eder ve lipoprotein lipaz yoluyla lipoproteinlerin yıkılmasını inhibe eder. Protamin sülfat varlığında eritrositlerin agregasyonu, MN fenotiplerinin uyarılması için araştırılmaktadır ⁽²⁰⁶⁾.

Protamin sülfat küçük, katyonik bir proteindir. DNA'ya bağlanır ve DNA'yı hızlandırır, oluşumunu çabuklaştırır. DNA'nın protein örneklerinden ayrıştırılmasında ya da DNA bağlı proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır. Protamin sülfat ayrıca retroviral kaynaklı-aracılı gen transferinde polybrene'e bir alternatif olarak kullanılabilir ^(18, 62, 69).

4.5.2. Protaminin Gen Tedavisinde Kullanımı

Protamin, vertebra ve caepod ların sperm hücrelerinden izole edilir. Sperm maturasyonu sırasında sperm hücre nükleuslarında bulunan histonların yerini alır ⁽¹⁴⁷⁾.

Protamin sülfat, heparinin oluşturduğu antikoagülan etkiyi nötralize etmek için rutin olarak kullanılmaktadır. Diğer yandan protamin sülfatın hipotansiyon oluşturduğu, ancak bu yan etkinin kalp, pulmoner ya da periferel dolaşımdan mı kaynaklandığı konusu henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Konuyla ilgili yapılan ilk çalışmalarda, protaminin kalbin fonksiyonlarını etkileyecek kadar toksik bir ilaç olmadığı bildirilmiştir. Oysa son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, protamini izole edilmiş kardiyak kas striplerinde doza bağılı olarak kasılmayı deprese ettiği bildirilmektedir ^(139, 200, 206,).

Intravenöz veya subkutan heparin uygulamasından sonra görülen ciddi hemoraji vakalarında heparini inaktive etmek ve ekstrakorporeal dolaşım ve hemodiyalizden sonra heparini inaktive etmek amacıyla kullanılan protaminin “Protamin ICN® ampul 5000 IU/5ml” ticari isminde Onko firmasına ait preparatı bulunmaktadır. Protamin plazmada enzim etkisi ile inaktive edilir. Hayvanlarda i.v. uygulamayı takiben, en yüksek konsantrasyonu içeren organlar karaciğer ve böbrektir. Protamin başlıca böbrek yoluyla, daha az miktarda ise karaciğer ve safra yoluyla atılır. Heparin ile inaktif bir kompleks oluşturur, bunun yarı ömrü hayvanlarda 24 dakika olarak saptanmıştır ⁽²⁰⁶⁾.

Wernig ve ark’ları, idiyopatik arteriyel hipertansiyon tedavisinde kullanılan, sistemik ve pulmoner vasodilatör olan vazoaaktif intestinal peptidleri (VIP), protamin-oligonükleotid nanopartikülleri şeklinde hazırlamışlar ve bu şekilde enzimatik degradasyona karşı VIP’leri korumuşlardır. Bu çalışmada oluşturulan nanopartiküllerin boyutunu ve zeta potansiyellerinin ölçümünü yapmışlar ve VIP salınımını incelemişlerdir. Enkapsülasyon etkinliğini %80, VIP salınımını %77-87 ve uygun nanopartikül boyutunu da 177-251 nm olarak tesbit etmişlerdir. Sonuç olarak, protaminin pulmoner VIP depo formülasyonları için uygun bir ilaç taşıyıcı sistem olduğunu göstermişlerdir ⁽¹⁹⁵⁾.

Weyermann ve ark'ları, ticari liposomlardan DOTAP ve lipofektini kullanarak poliyoma VP1 virüs kapsoidi ile akrilat içeren nanopartikül ve protamin bazlı nanopartiküller hazırlayarak bu taşıyıcı sistemlerin fiziksel parametrelerini incelemişlerdir.(boyut, yüzey yükü, yük dağılımı) Fare fibroblastlarından hücre alım, konfokal lazer mikroskopisi yoluyla gözlenmiştir. Farklı ilaç taşıyıcı sistemlerin sitotoksitesini karşılaştırmak amacıyla bir MTT protokolü çalışılmıştır. Sonuçlara göre boş oligonükleotidlerle karşılaştırıldığında hazırlanan bütün taşıyıcı sistemlerde yüksek bir oligonükleotid (ON) alımı görülmüştür. Protamin ON 'leri diğer taşıyıcı sistemlere oranla çok düşük sitotoksite göstermiştir ⁽¹⁹⁷⁾.

Kratzer ve ark'ları, protamin-oligonükleotid nanopartiküllerin (proticles) beyin kapiller endotel hücrelerinin fonksiyonel özellikleri üzerine etkisini ve bu hücrelerin geri alımlarını ve sitoplazmadan geçirgenliklerini araştırmışlardır. Proticles'lerin beyin kapiller endotel hücreleri ve kan-beyin bariyer fonksiyonlarında negatif bir etkileri bulunmamaktadır. Proticles'lerin yüzeyinden salınan apoA-I'lerin absorpsiyonu, kaplanmamış komplekslere göre belirgin şekilde geri alım ve geçirgenlik özelliklerini arttırmıştır. Yapılan çalışma apoA-I kaplı protamin komplekslerin kan-beyin bariyer sistemine geçişte kullanılacak taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde hedef teknolojilerden biri olacağını göstermektedir ⁽¹⁰⁸⁾.

Araştırmalar, kedi, köpek ve domuz gibi değişik hayvan türlerinin kalp kasılma fonksiyonlarının protaminden etkilenip azaldığını bildirmektedir. Ayrıca protamin içeren Krebs solüsyonundaki sıçan kalp papiller kas preparatında direkt elektriksel uyarı ile gelişen izometrik kasılma kuvvetinin, protamin dozuna bağlı olarak azalıp deprese olduğu gösterilmiştir. Bu durum protaminin sıçan kalp papiller kasında negatif inotropik etki yaptığını göstermektedir ⁽¹³⁹⁾.

Poli-L-lizin benzeri sentetik katyonik peptidler ile oluşturulan ON kompleksleri endositoz yoluyla hücre alımın artırılması amacıyla uzun yıllardır kullanılmaktadır. Reseptör aracılı endositoz yoluyla spesifik hücre alımını arttırmak amacıyla PLL moleküllerine çeşitli ligandlar eklenmektedir. Benzer olarak doğal bir

peptid olan protamin de ON taşıyıcı sisteminde bir yardımcı faktör olarak kullanılmaktadır. Bundan başka arjinin ve histidinden zengin peptidler sitoplazma içerisindeki ON'lerin endozomal kaçışını arttırmaktadır. Füzyonik peptidler membran destabilizasyonuna sahiptir ve litik özelliklerinden dolayı sitoplazma içindeki ON salınımını arttırabilirler. Ayrıca, nükleer lokalizasyon sekans motifleri (NLS- peptidleri) ON'lerin nükleusa transportuna aracılık edebilir ⁽¹¹⁷⁾.

(40 mg/ml) protamin dozunun miyositin β - adrenerjik reseptör yanıtını deprese ettiği, yüksek dozda ise bu yanıtın tamamen yok olduğu ve bunun sonucunda dinlenim zar potansiyelinin önemli derecede düşüp kasın depolarize olduğu saptanmıştır. Protaminin miyokardın fonksiyonlarını etkilerken hücre dışından mı, içinden mi yoksa her iki yoldan birlikte mi etkilediği konusu tam olarak açıklığa kavuşmuş değildir. Birçok araştırmacı, protaminin miyosit sarkolemmasındaki ekstraselüler reseptör sistemini etkileyerek kasılma genliğini azalttığı görüşündedir ^(107, 139).

Protamin, 40 ve 80 mg/ml dozlarında CT, $\frac{1}{2}$ RT, dF/dT ve $-dF/dt$ değerlerinin sürelerini uzatmakta, kasılma ve yarı gevşeme sürelerini uzatmakta, kasılma ve gevşeme hızlarını yavaşlatmaktadır. Sıçan papiller kasının kasılma kuvvetini azaltmakta, kasılma ve gevşeme sürelerini uzatmakta ve kontraktür oluşturmaktadır. Bu etkileri muhtemelen: Hücre zarının iyon iletkenliklerini düşürerek, spesifik Ca^{+2} ATPase aktivitesini zayıflatarak, sarkoplazmik retikulum ve mitokondri gibi internal membranlardan Ca^{+2} tekrar alımını (reabsorpsiyonunu) azaltarak ve kalsiyum iyonlarının filamentlere bağlanma süreçlerini uzatarak yapmaktadır ^(107, 206).

Hayatı tehdit eden veya intrakraniyal bir kanama halinde kriyopresipitat veya taze dondurulmuş plazma ve heparin antidotu olan protamin sülfat (son dört saatte kullanılan heparinin her 100 ünitesi için 1 mg) 10-30 dakikada yavaşça i.v. verilir. Protamin sülfat allerjik reaksiyon yapabilir, hipotansiyon ve bradikardiye neden olabilir. Protaminin yavaş infüzyonu ile bu yan etkiler önlenabilir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Kimyasal Sarf Malzemesi

Akrilamid/Bisakrilamid	Serva (Almanya)
Agaroz	Sigma (ABD)
Amfoterisin B	Biochrom (Almanya)
Amonyum asetat	Sigma (ABD)
Amonyum klorür	Sigma (ABD)
Amonyum molibdat	Sigma (ABD)
Amonyum persülfat	Serva (Almanya)
Ampisilin	Sigma (ABD)
Asetik asit	E. Merck (Almanya)
Bacto agar	Difco (ABD)
Borik asit	Sigma (ABD)
Bovin serum albumin	Biological Industries (İsrail)
Bromfenol mavisi	Sigma (ABD)
Cla I	MBI Fermentas (Litvanya)
Dimetil sülfoksit	Sigma (ABD)
di-Potasyum hidrojen fosfat	E. Merck (Almanya)
di-Sodyum hidrojen fosfat	E. Merck (Almanya)
DMEM	Biological Industries (İsrail)
DNase I	Sigma (ABD)
EDTA	Sigma (ABD)
ELİSA kit	Biosource (USA)
Etanol (absolü)	Riedel de Haen (Almanya)
Etidyum bromür	Sigma (ABD)
Fenol	Sigma (ABD)
Featal bovin serum	Biological Industries (İsrail)
Glasiyal asetik asit	E. Merck (Almanya)
Gliserol	Fluka (Almanya)
Glisin	Sigma (ABD)

Glukoz	Sigma (ABD)
Glutaraldehit	Sigma (ABD)
HEPES	J. T. Baker (ABD)
Hidrojen florür	Sigma (ABD)
Hidroklorik asit	E. Merck (Almanya)
Hind III	Roche (Almanya)
Izo-propanol	Sigma (ABD)
Kalsiyum klorür	Fluka (Almanya)
Kitozan	mwt. 70 kD., %75-85 DA, Sigma (ABD)
Kitozan	mwt.400 kD.,%87 DA, Fluka (Almanya)
Kitozan	mwt.750 kD., %75-85DA, Sigma (ABD)
Kloroform	E. Merck (Almanya)
L-Glutamine	Biochrom (Almanya)
Lipofektin™ reagent	Gibco-BRL(ABD)
Lizozim	Roche (Almanya)
Luria Bertani medium	Sigma (ABD)
Magnezyum klorür	E. Merck (Almanya)
Magnezyum sülfat	E. Merck (Almanya)
MEM	Biological Industries (İsrail)
Metanol	E. Merck (Almanya)
Metilen mavisi	Sigma (ABD)
PEG 8000	Sigma (ABD)
Penicillin-Streptomycin	Biochrom (Almanya)
Plazmid İzolasyon Kiti	Roche (Almanya)
Polivinil formal	Fluka (Almanya)
Potasyum asetat	Sigma (ABD)
Potasyum di-hidrojen fosfat	E. Merck (Almanya)
Potasyum hidroksit	E. Merck (Almanya)
Potasyum klorür	Sigma (ABD)
Protamin sülfat	Sigma (ABD)
Proteinase K	Roche (Almanya)
RNAase A	Roche (Almanya)

Sodyum asetat	Sigma (ABD)
Sodyum azid	E. Merck (Almanya)
Sodyum bikarbonat	E. Merck (Almanya)
Sodyum di-hidrojen Fosfat	E. Merck (Almanya)
Sodyum Dodesil Sülfat	J. T. Baker (ABD)
Sodyum hidroksit	J. T. Baker (ABD)
Sodyum karbonat	Carlo Erba (İtalya)
Sodyum klorür	Sigma (ABD)
Sodyum sitrat	E. Merck (Almanya)
Sukroz	Sigma (ABD)
TPP (STTP)	Sigma (ABD)
Tripan mavisi	E. Merck (Almanya)
Tripsin 1:250	Sigma (ABD)
Trizma base	Roche (Almanya)
Triton® X-100	Sigma (ABD)
Tween 20	Glaxo-wellcome (İngiltere)
Zeocin	Invivogen (ABD)
Xba I	MBI Fermentas (Litvanya)
λ DNA / Hind III marker	Roche (Almanya)
2-β-Merkaptoetanol	Fluka (Almanya)

5.1.2. Kullanılan Cihazlar

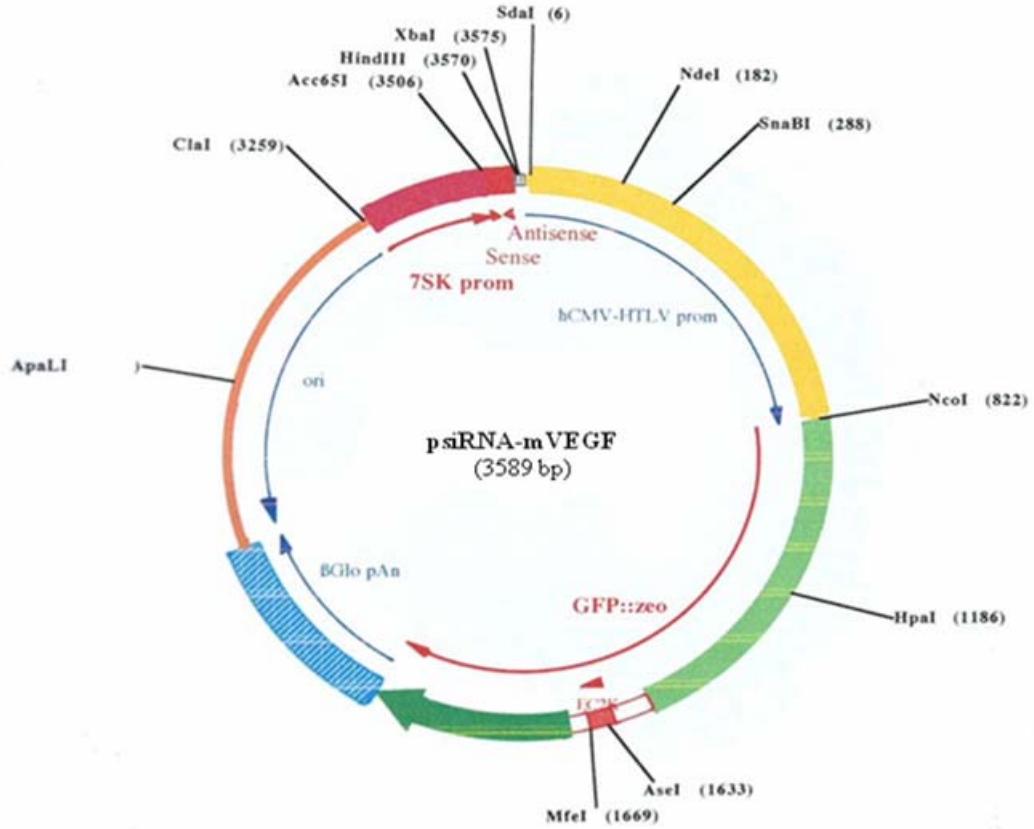
Çalkalayıcı Su banyosu	Nüve BM 102 (Türkiye)
Çalkalayıcı Su Banyosu	Memmert (Almanya)
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu (-80)	Nuar (ABD)
Dikey Jel Elektforez Cihazı	Atto (Japonya)
Distile Su Cihazı	GFL (Almanya)
Elektforez Güç Kaynağı	EC-Techne (İngiltere)
ELİSA Okuyucu	Bio-Rad (ABD)
Etüv	Heraeus (Almanya)
Etüv	Memmert (Almanya)

Fluoresan Mikroskop	Olympus BX50 (Japonya)
Hassas Terazı	Shimadzu (Japonya)
Horizontal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Isıtıcı Tabla	Ika-Werk (Almanya)
İnvert Mikroskop	Olympus BH40 (Japonya)
Jel Analiz Sistemi	Kodak 1D Dijital Science (ABD)
JVC Spot Junior Kamera Sistemi	JVC (Japonya)
Karbondioksitli Etüv	Sanyo (Japonya)
Laminair Akışlı Doku Kültürü Kabini	Holten-Safe 2000 (Danimarka)
Laminair Akışlı Doku Kültürü Kabini	Herasafe KS-12 (Almanya)
Liyofilizatör	Leybold, Lyovac GT2 (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mekanik Karıştırıcı	Ika-Werk (Almanya)
Mikropipet seti	Gilson (Fransa)
Mikrosantrifüj	Hettich (Almanya)
Bioküler Mikroskop	Olympus (Japonya)
Mili-Q Su Sistemi	Milipore (ABD)
Otoklav	Kermanlar (Türkiye)
Partikül Ölçüm Cihazı	Malvern Nano-ZS (İngiltere)
pH metre	WTW (Almanya)
Santrifüj	Hettich (Almanya)
Soğutmalı Santrifüj	Eppendorf 5810R (Almanya)
Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec-1601 (Japonya)
Sterilizatör	Heraeus (Almanya)
Su Banyosu	Techne (İngiltere)
Taramalı Elektron Mikroskobu	Jeol JSM-5200 (Japonya)
Transmission Elektron Mikroskobu	Jeol (Japonya)
Terazi	Sartorius (Almanya)
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat (Fransa)
Vertikal Karıştırıcı	Velp Scientifica (İtalya)
Yatay Jel Elektroforez Cihazı	Atto (Japonya)
Yüzey Yükü Ölçüm Cihazı	Malvern Nano-ZS (İngiltere)

5.1.3. Plazmid siRNA (Short Hairpin), shRNA Yapısı

VEGF Plazmid siRNA (psiRNA-mVEGF, shRNA) InvivoGen (ABD) kullanıldı.

Tez çalışmamızda ökaryotik hücrelerde anlatım yapabilen psiRNA-mVEGF (shRNA) vektörü kullanılmıştır. psiRNA-mVEGF, 3589 baz çifti uzunluğunda bir plazmid vektördür. Yapısında E.coli orijini (Ori), 7SK ve hCMV-HTLV memeli promotorları ile EC2K bakteri promotoru, seleksiyon amaçlı zeocin direnç geni ve yeşil floresan protein (Green Fluoresans Protein, GFP) reporter geni bulunmaktadır. psiRNA-mVEGF plazmidinin ökaryotik hücrelere transfeksiyonu halinde, hücrelerde VEGF proteininin ekspresyonu siRNA ile baskılanabilmektedir. psiRNA-mVEGF plazmid vektörünün haritası **Şekil 5.1** 'de verilmiştir.



Şekil 5.1. psiRNA-mVEGF plazmidinin yapısı (shRNA-mVEGF ticari ismi).

Tez çalışmamıza ait metinde psiRNA-VEGF vektörü “shRNA” kısaltması ile kullanılmıştır.

5.1.4. Kullanılan Hücre Hatları

HEK 293 (insan embriyonik böbrek hücre kültürü):

HEK293 hücreleri Alex Van der Eb tarafından adenovirüs 5 DNA ile normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin kültürde transformasyonu ile oluşturulmuş hücre dizileridir. Orjinal HEK 293 dizisi, orjinal HEK 293 hücre klonunun 293. deney ürünüdür. Bu hücreler, böbrekte bol bulunan ya fibroblastik, endotelyal veya epitelyal hücrelerin transformasyonu ile oluşturulmuştur. Sodyum kanallarına ilaç etkilerinin araştırılması, indüklenebilir RNA interferans sisteminin test edilmesi, iki protein arasındaki etkileşimlerin araştırılması, proteinde nükleer çıkış sinyalinin araştırılması gibi alanlarda kullanılmaktadır ⁽⁷⁴⁾.

HeLa (insan serviks adenokarsinomu hücre kültürü):

31 yaşında zenci bir kadından alınarak W.F.Scherer tarafından stoklanan yüzeye tutunan ve epitelyal serviks adenokarsinom hücreleridir. Hücreler immünoperoksidaz ile boyama sonrasında keratin için pozitif reaksiyon verirler. HeLa hücrelerinin insan papilloma virüs 18 (HPV-18) sekansları taşıdığı rapor edilmiştir. P53 ekspresyonu düşük ve pRB (retinoblastoma baskılayıcı) düzeyi normal olarak tespit edilmiştir. Hücrelerin %98'inde küçük telosentrik kromozomlar vardır ^(81, 91).

MCF-7 (insan meme adenokarsinomu hücre kültürü):

C.M. McGrath tarafından 69 yaşında 0 Rh+ kan grubuna sahip Orta Asyalı bir kadından plevral efüzyon ile elde edilmiş yüzeye tutunan, epitelyal süt bezi adenokarsinomudur. Östrojen reseptörü pozitif hücrelerdir. MCF-7 hücrelerinin büyümeleri TNF- α tarafından inhibe edilir. MCF-7 hücreleri sitoplazmik östrojen reseptörleri aracılığıyla östradiolü prosleme de dahil diferansiye olmuş meme epitel hücrelerinin çeşitli özelliklerini taşımaktadır. Radyasyon uygulanan MCF-7 hücrelerinde çekirdekte p53 akümüasyonunun p21waf1 ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir ve p53'ün hücre siklusu süresince değişimleri araştırılmıştır ^(2, 180).

5.1.5. Besiyerleri ve Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında kullanılan besiyeri ve çözeltilerin isimleri, hazırlama yöntemleri, sterilizasyon ve saklama koşulları aşağıda verilmiştir.

5.1.5.1. Besiyerleri

Luria Bertani (LB)

LB besiyeri, 10.0 g tripton, 5.0 g maya özütü ve 10.0 g sodyum klorür 1000 ml bidistile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı ve sodyum hidroksit ile besiyerinin pH değeri 7.0'a ayarlandı. Çalışmalarda ayrıca ticari olarak satılan hazır LB besiyeri de kullanıldı.

Luria Bertani Agar (LBA)

Yukarıda formülasyonu verilen sıvı LB besiyerine, % 1.5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı.

Hazırlanan Luria Bertani ve Luria Bertani Agar besiyerleri, 121⁰C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak steril edildiler. Besiyerine, psiRNA-mVEGF plazmid vektörünü içeren GT116 bakteri kültürünün ekiminden önce 25 µg/ml konsantrasyonda Zeocin® ilave edildi.

RPMI

RPMI (Sigma, 1x1lt) besiyeri, 1000 ml bidistile su içerisinde çözündürüldü. Besiyeri 0.22µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilizasyon sonrası +4°C' da saklandı.

MEM

MEM (Sigma, 1x1lt) besiyeri, 1000 ml bidistile su içerisinde çözündürüldü. Besiyeri 0.22µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilizasyon sonrası +4°C' da saklandı.

DMEM

DMEM (Sigma, 1x1lt) besiyeri, 1000 ml bidistile su içerisinde çözündürüldü. Besiyeri, 0.22µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilizasyon sonrası +4°C’ da saklandı.

RPME, MEM ve DMEM hücre kültürü besiyerlerinin pH değeri, % 5.0 steril sodyum bikarbonat çözeltisi kullanılarak 7.2-7.4’e ayarlandı. Deneysel çalışmalar esnasında gerekli koşullarda besiyerlerine % 10 (h/h) oranında featal bovine serum, % 0.03 (a/h) oranında L-glutamin sırasıyla 100 IU/ml, 10 µg/ml, 5.0 µg/ml nihai konsantrasyonlarda penisilin, streptomisin ve amfoterisin B ilave edildi.

5.1.5.2. Çözeltiler

TE Tamponu (Tris-EDTA, pH 7.6)

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

1 mM EDTA (pH 8.0)

TE tamponu, 121°C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak sterilizasyon sonrası +4°C’ da muhafaza edildi.

TE Tamponu (Tris-EDTA, pH 8.0)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

TE tamponu, 121°C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak sterilizasyon sonrası +4°C’ da muhafaza edildi.

TBE Tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA, pH 8.0)

0.090 M Tris

0.090 M Borik asit

0.002 M EDTA

TBE tamponu, 121°C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak sterilizasyon sonrası +4°C’ da muhafaza edildi.

Cözelti I

50 mM Glukoz

25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

Çözelti, 121°C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak sterilizasyon sonrası +4°C' da muhafaza edildi.

Cözelti II

0.2 N NaOH (10 N NaOH stok çözeltisinden seyreltilerek)

% 1.0 SDS (% 10 SDS stok çözeltisinden seyreltilerek)

Çözelti II, çalışma esnasında stok çözeltiler kullanılarak istenilen konsantrasyonlarda taze olarak hazırlandı.

Cözelti III

5.0 M KAc 60.0 ml

Glasiyal Asetik Asit 11.5 ml

Bidistile H₂O 28.5 ml

KAc'ın çözeltideki nihai konsantrasyonu 3.0 M. Çözelti III, 121°C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklav sterilizasyonu sonrası +4°C' da muhafaza edildi.

RNAase A Reaksiyon Tamponu

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

15 mM NaCl

0.22 µm por çapına sahip filtre sterilizasyonu sonrası +4°C' da muhafaza edildi.

Proteinaz K Reaksiyon Tamponu

0.01 M Tris-HCl (pH 7.8)

0.005 M EDTA

% 0.5 SDS

Proteinaz K reaksiyon tamponu, 0.22µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilizasyon sonrası +4°C' da muhafaza edildi.

pDNA Saflaştırma Çözeltisi

1.6 M NaCl

% 13 (a/h) PEG 8000

pDNA saflaştırma çözeltisi, 0.22µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilizasyon sonrası +4°C’ da muhafaza edildi.

Tamponlanmış Fenol Çözeltisi

-20°C’da muhafaza edilen moleküler biyoloji çalışmalarında kullanıma uygun saflıktaki kristalize fenol 68°C’deki su banyosuna alınarak çözündürüldü ve içerisine oksidasyonu önlemek amacı ile % 1.0 nihai konsantrasyonda 8-hidroksikinolin ilave edildi (8-hidroksikinolin, yapısal olarak antioksidan bir bileşiktir, kısmi RNAase inhibitörü ve metal iyonlarının zayıf kelat oluşturduğu bir maddedir. Fenol çözeltisine sarı renk verdiğinden dolayı organik fazın sulu fazdan ayrılmasında kolaylık sağlar). Eşit hacim 0.5 M steril Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 15 dakika karıştırıldı. Organik faz (fenol) ve sulu fazın (Tris-HCl tamponu) birbirinden ayrılması için karışım +4°C’ da 60 dakika bekletildi. Üst sulu faz bir pipet yardımı ile dikkatlice alınıp uzaklaştırıldı ve işleme 0.1 M steril Tris-HCl (pH 8.0) tamponu kullanılarak organik fazın (fenol) pH değeri 7.8 olana kadar devam edildi. Fenol fazında pH 7.8 değerine ulaşıldığında sulu faz tamamen alınıp uzaklaştırıldı. Tamponlanmış fenol çözeltisi, fenol fazının üzerine 0.1 hacim 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ilave edilerek +4°C’ da koyu renk bir şişe içerisinde saklandı.

Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol (25:24:1)

25 kısım tamponlanmış fenol çözeltisi

24 kısım kloroform

1 kısım izoamil alkol

Fenol: kloroform: izoamil alkol karışımı üzerine, 0.1 hacim 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ilave edilerek +4°C’ da koyu renk bir şişede muhafaza edildi. Çalışma esnasında alınacak miktar, üst sulu fazın altındaki organik fazdan alınarak kullanıldı.

Elektroforez Yükleme Tamponu (x 6)

% 0.25 Bromfenol Mavisi

% 0.25 Ksilen Siyanol

% 30 Gliserol

Hazırlanan elektroforez yükleme tamponu, küçük hacimlere bölünerek +4°C' da muhafaza edildi. Jel elektroforezi çalışmaları esnasında elektroforez yükleme tamponu, örnekler ile 1:5 oranında karıştırılarak kullanıldı.

Nükleaz (DNAase I) Hazırlama Tamponu

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

50 mM NaCl

10 mM MgCl₂

1 mM DTT

% 50 Gliserol

Nükleaz (DNAase I) hazırlama tamponu, DTT ilave edilmeden 121°C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavlandı. Tampon, sterilizasyon sonrası konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde DTT eklenerek +4°C' da muhafaza edildi.

Nükleaz (DNAase I) Reaksiyon Tamponu

20 mM Tris-HCl (pH (8.4)

10 mM KCl

2 mM MgCl₂

Nükleaz (DNAase I) hazırlama tamponu, 121°C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak sterilizasyon sonrası +4°C' da muhafaza edildi.

PBS Tamponu (Fosfat-Sodyum Klorür, BP, pH 7.4)

137 mM NaCl

6.65 mM Na₂HPO₄

1.40 mM KH₂PO₄

PBS tamponu, 121°C, 1.2 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak sterilizasyon sonrası +4°C' da muhafaza edildi.

Liziz Tamponu (x 5)

25 mM Tris-PO₄ tamponu (pH 7.8)

2 mM EDTA

2 mM DTT

% 10 Gliserol

% 1 Triton[®] X-100

Liziz tamponu, 0.22µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilizasyon sonrası +4°C’ da saklandı.

Tripsin-EDTA Czeltisi

% 0.05 (a/h) Tripsin

% 0.05 (a/h) EDTA

Tripsin-EDTA czeltisi, 0.22µm por çapına sahip filtre kullanılarak sterilizasyon sonrası -20°C’ da saklandı.

Akrilamid ve N,N’-Metilen Bisakrilamid (%30)

%29 (w/v) akrilamid

%1(w/v) bisakrilamid

Akrilamid-N,N’-Metilen Bisakrilamid czeltisi pH değeri 7’ye ayarlanır. Oda sıcaklığında gün ışığından korunarak saklanır.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (%10)

10 g SDS

Cözelti oda sıcaklığında saklanır.

Tris Tamponu

1,5 M Tris-HCL pH 8,8

Konsantre HCL ile pH 8,8 ‘e ayarlanır, oda sıcaklığında saklanır.

Tris-HCL Tamponu

1 M Tris-HCL pH 6,8

Konsantre HCL ile pH 6,8 ‘e ayarlanır, oda sıcaklığında saklanır.

Amonyum Persülfat (%10)

10 g Amonyum Persülfat

Taze olarak hazırlanmalıdır.

Resolving Jel Çözeltisi (Ayırma Jeli)

%30 akrilamid

1,5 M Tris-HCL (pH 8,8)

%10 SDS

%10 APS

TEMED

H₂O

Stacking Jel Çözeltisi (Yükleme Jeli)

%30 akrilamid

1 M Tris-HCL (pH 6,8)

%10 SDS

%10 APS

TEMED

H₂O

Tris-Glisin Elektroforez Tamponu (pH 8,3)

25 mM Tris

250 mM glisin (pH 8,3)

%0,1 SDS

+4°C’ de saklanır. Kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilip 5 kez sulandırılır.

1×SDS Jel Yükleme Tamponu

Tris-HCL (pH 6,8)

%10 SDS

Bromfenol blue (%0,2)

Gliserol

dd H₂O

5.2. YÖNTEM

5.2.1. shRNA İle İlgili Çalışmalar

5.2.1.1. shRNA

Tez çalışmasında, hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde anlatım yapabilen ticari psiRNA-mVEGF (İnvivoGen, USA) plazmid vektörü kullanılmıştır. psiRNA-mVEGF plazmid vektörü; 3589 baz çifti uzunluğunda, yapısında mouse (fare) VEGF (mVEGF) genine spesifik sense ve antisense dizilerini içermektedir. Vektöre ilişkin bilgiler bölüm 5.1. Gereç kısmında ‘Plazmid siRNA (Short Hairpin) Yapısı’ başlığı altında 5.1.3’de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

5.2.1.2. shRNA’nın Transformasyonu

Ticari olarak satın alınan psiRNA-mVEGF plazmid vektörünün transformasyonunda konak bakteri olarak *Escherichia Coli* GT116 suşu kullanıldı. Transformasyon üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak yapıldı.

Transformasyon protokolünde; LyoComp GT116 liyofilize edilmiş kompetant hücreler buzda 5 dakika bekletildi. Üzerine 1 ml soğuk rekonstitüf solüsyon eklendi ve buz üzerine inkübasyona devam edildi. Kompetent hücreler hafifçe karıştırılarak hücrelerin tamamiyle rehidrate olması sağlandı. Rehidrate olan kompetent hücre solüsyonu üzerine 1µg süper sarmal shRNA ilave edilerek karışım 30 dakika süresince buzda tutuldu. Ardışık olarak karışım üzerine 1 ml LB besiyeri ilave edilerek vasat 37°C’de 1,5 saat inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda Zeocin® içeren TBA petrilere 100µl bagetle ekim yapıldı. Ekim sonrası petriler bir gece boyunca 37°C’de inkübe edildi. Petrilere gelişen kolonilerden, gerçekleştirilecek çalışmalarda kullanılmak üzere petri, eğri besiyeri (+4°C) ve gliserine (-20 ve -80°C) stok alındı. Alınan stoklardan shRNA izolasyonu ve kontrolleri yapıldı ⁽¹⁵⁸⁾.

5.2.1.3. shRNA’nın İzolasyonu

shRNA içeren *E.coli* suşlarından plazmid DNA izolasyonu, Birnboim ve Doly’nin modifiye alkali-liziz yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi ⁽¹⁸⁾.

shRNA'nın transforme edildiği *E.coli* GT116 suşunun, 25 µg/ml konsantrasyonda Zeocin içeren 25 ml TB besiyerinde doymuş kültürü hazırlandı. Hazırlanan ön kültürden 1000 ml antibiyotikli TB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 18-24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.

Elde edilen doymuş kültürler, +4°C, 10000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktüldü ve besiyeri kalıntılarının uzaklaştırılması amacı ile TE tamponu ilavesi ile hücreler yıkandı. Hücre çöktürülmesi, 2.5 µg/ml son konsantrasyonda lizozim içeren 1 hacim Çözelti I içerisinde süspansiyon edildi ve 20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücre süspansiyonu üzerine, taze hazırlanmış 2 hacim Çözelti II ilave edildi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Hücre lizatı üzerine, 1.5 hacim buzda soğutulmuş Çözelti III ilave edildi ve lizat buz içerisinde 30 dakika bekletildi. Bu aşamada hücre artıkları, genomik DNA ve proteinlerin önemli bir kısmının çökmesi sağlandı. Lizat, +4°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant hacmi ölçülerek temiz bir tüpe aktarıldı. shRNA'yı içeren süpernatant üzerine 0.6 hacim izopropanol ilave edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika bekleme süresi sonunda shRNA, +4°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktüldü. Çökelti 1 hacim Tris-EDTA (TE, pH 8.0) tamponu ilavesi ile çözündürüldü, 20 µg/ml nihai konsantrasyonda RNAase A ve ardışık olarak 50 µg/ml nihai konsantrasyonda Proteinase K ile muamele edildi. Enzimatik olarak kısmen saflaştırılan shRNA'nın üzerine 4 hacim PEG 8000/NaCl (% 13 / 1.6 M) çözeltisi ilave edildi ve karışım 3-4 saat buz içerisinde bekletildi. Sürenin sonunda shRNA, +4°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. 1 hacim TE tamponu ilave edilerek çözündürülen shRNA, fenol:kloroform:izoamil alkol ekstraksiyonunu takiben amonyum asetat (NH₄Ac)/Etanol uygulaması ile +4°C, 15000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Pellet, % 70 etanol ile yıkandı ve uygun hacim TE tamponu ilave edilerek çözündürüldü. Bu şekilde hazırlanan shRNA stokları kontrolleri yapılarak -20°C'de saklandı.

Çalışmamızda DNA izolasyonu için klasik alkali lizis yöntemi yanı sıra ticari plazmid izolasyon kiti kullanılarak da izolasyonlar yapılmıştır.

5.2.1.4. shRNA'nın Kontrolü

Yöntem 5.2.1.3.'de belirtildiği şekilde izole edilen shRNA örneklerinin miktar tayini, saflık derecesi ve konformasyonel yapı kontrolleri spektrofotometrik ve elektroforetik olarak yapıldı.

shRNA'nın Spektrofotometrik Kontrolü

shRNA'nın, izolasyon sonrasında, konsantrasyonu ve saflık derecesi spektrofotometrik olarak 260 ve 280nm dalga boylarındaki ölçüm sonuçlarından yararlanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi. Yapısal olarak çift zincirli shRNA molekülü için konsantrasyon;

$$\mu\text{g/ml DNA} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{seyreltme oranı}$$

formülüne göre hesaplandı.

shRNA'nın saflık derecesinin belirlenmesinde ise $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ oranından yararlanıldı. Spektrofotometrik olarak, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin birbirine oranının 1.8-1.9 arasında olması DNA molekülünün yüksek derecede saf olduğunu göstermektedir ⁽¹⁵⁸⁾.

shRNA'nın Elektroforetik Kontrolü

İzole edilen shRNA'nın saflığı, içerdiği formlar, restriksiyon enzim haritasının ve plazmid yapısının doğruluğu agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak kontrol edildi ⁽¹⁵⁸⁾.

shRNA'nın elektroforetik analizinde % 0.8 (a/h) konsantrasyonda agaroz jeller kullanıldı. Tris-Borik asit-EDTA (TBE, pH 8.0) tamponu içerisinde kaynatılarak çözündürülen agaroz 60°C'a kadar soğutulduktan sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür ilave edilerek yatay agaroz jel kasetlerine döküldü. Hazırlanan agaroz jel kasetleri, jelin donmasını takiben içerisinde pH 8.0 TBE tamponu bulunan yürütme tankına alındı. Elektroforetik analiz için izolasyon sonrası spektrofotometrik kontrolleri yapılmış örnekler, 5:1 (örnek:elektroforez yükleme tamponu) oranında 6x agaroz jel yükleme boyası ile karıştırılarak jele uygulandı ve

elektroforez işlemi sabit 80 volt akımda 1.5 saatte tamamlandı. Elektroforez işlemi sonrası, UV transillüminatör üzerinde incelenen jeller, Kodak Digital Science, DC40 Camera ve 1D Image Analysis Software sistemi kullanılarak değerlendirildi. shRNA topolojik form yüzdeleri,

$$(KH, \%) = \frac{KH \text{ DNA Hacmi} - \text{Boş Hacim}}{[(KH \text{ DNA Hacmi} + \text{Doğrusal DNA Hacmi} + AH \text{ DNA Hacmi}) - (3 \times \text{Boş Hacim})]}$$

KH; Kapalı halkasal pDNA, süper sarmal pDNA.

AH; Açık halkasal pDNA, gevşek sarmal pDNA

formülü yardımıyla hesaplandı ⁽¹³⁾.

Kalitatif ve kantitatif kontrolleri yapılan shRNA'ları uygun restriksiyon endonükleazları ile kesildikten sonra, agaroz jel elektroforezinde verdikleri DNA bantları ve boyutları değerlendirilerek restriksiyon enzim haritasının doğruluğu kontrol edildi. Bunun için psiRNA-mVEGF plazmid DNA'sı restriksiyon enzim haritasında belirtilen XbaI ve ClaI restriksiyon endonükleazları ile kesilerek elektroforetik olarak incelendi.

shRNA'nın Standart Eğrisinin Hazırlanması

Standart eğri oluşturmak amacı ile, 0.5-12.0 µg/ml (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0 ve 12.0) konsantrasyon aralığında n=3 olacak şekilde hazırlanan shRNA çözeltilerinin 260 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen 260 nm'deki absorbans değerlerinden yararlanılarak standart eğri grafiği çizildi. Elde edilen grafikte yer alan değerlerin regresyon analizi yapılarak eğrinin kullanılabilirliği ve doğrusallığı saptandı. Oluşturulan shRNA standart eğrisi shRNA'nın miktar tayininde, formülasyonlardan shRNA'nın *in vitro* salım çalışmalarında kullanıldı.

5.2.2. shRNA İçeren Farmasötik Şekillerin Hazırlanması

5.2.2.1. Kitozan/shRNA Komplekslerinin Hazırlanması

Farklı molekül ağırlığına sahip kitozanların (Low kitozan; ≈ 70 kD., %75-85 DA, Sigma-Aldrich / Medium kitozan; ≈ 400 kD., %87 DA, Fluka ve High kitozan; ≈ 750 kD., %75-85DA, Sigma-Aldrich) %0.25 konsantrasyonda %1.0 asetik asit içerisindeki sulu çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan kitozan çözeltileri 0.22µm por çapına sahip filtreden geçirilerek steril edildi. Farklı yük oranlarındaki kompleks serileri (0.5/1, 1/1, 2/1; kitozan/shRNA) kitozan çözeltileri ile shRNA solüsyonunun uygun oranda karıştırılması ve ardışık olarak vortekslenmesiyle elde edildi. Kompleks serileri, kompleks oluşumunun tamamlanması ve stabilizasyonu için oda sıcaklığında 30-60 dakika süre ile bekletildi. Hazırlanan kompleks serilerinde amaca uygun teorik yük oranını ayarlamak için, shRNA oranı sabit tutularak kitozan oranı değiştirildi.

*DA; Deasetilasyon Derecesi

5.2.2.2. Protamin/shRNA Komplekslerinin Hazırlanması

Protamin/shRNA komplekslerinin hazırlanması öncesinde protamin'in PBS içerisinde 1.0 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanarak değişik konsantrasyonlarda SDS-PAGE'e uygulandı ve polimer molekül ağırlığı açısından standart protein marker ile değerlendirildi.

Protamin farklı çözücülerde (bidistile su, pH 7.4 PBS tamponu, fizyolojik tuzlu su, %5.0 glukoz çözeltisi ve pH 5.0 10mM sodyum asetat tamponu) 1 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanarak filtrasyon yöntemiyle steril edildi. Farklı yük oranlarında (0.1/1, 0.2/1, 0.3/1, 0.4/1, 0.5/1, 0.6/1, 0.7/1, 0.8/1, 0.9/1, 1/1 ve 2/1; protamin/shRNA) protamin/shRNA kompleks oluşumu araştırıldı. Bu amaçla belirtilen yük oranlarında protamin/shRNA kompleks serileri Yöntem 5.2.2.1.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kompleks serileri, kompleks oluşumunun tamamlanması ve stabilizasyonu için 30 ve 60 dakika süre ile oda temperaturünde bekletildi.

5.2.2.3. Kitozan/Protamin/shRNA Komplekslerinin Hazırlanması

Farklı yük oranlarında kitozan/protamin/shRNA (0.5/1/1, 1/1/1 ve 2/1/1) kompleks oluşumu araştırıldı. Bu amaçla belirtilen yük oranlarındaki kitozan/protamin/shRNA kompleksleri Yöntem 5.2.2.1. ve 5.2.2.2.'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Kompleks serileri, kompleks oluşumunun tamamlanması ve stabilizasyonu için 30 ve 60 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi.

5.2.2.4. shRNA İçeren Kitozan Nanopartiküllerin Hazırlanması

shRNA içeren kitozan nanopartiküllerin hazırlanmasında Calvo ve ark.'larının ^(29,59) kullandığı iyonotropik jelleşme yönteminin modifiye edilmiş şekline göre çalışıldı.

Bu amaçla, farklı molekül ağırlıklarına sahip kitozanların % 1.0'lik (a/h) asetik asit içerisinde % 0.25 (a/h) konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcıda 900-1000 devir/dakika hızda karıştırılan kitozanın asetik asitteki çözeltisine, belirli miktarlarda (25, 100 ve 250µg) shRNA eklenmiş eşit hacimdeki tripolifosfat (TPP) çözeltisi (%0.05), 20 cm yükseklikte sabitlenmiş bir kolon yardımı ile 10 damla/dakika hızda damlatılarak ilave edildi. Damlatma işlemi sonrasında 30 dakika süre ile karıştırma işlemine devam edildi. Oluşan nanopartiküller, +4°C, 16000 devir/dakika hızda 20 dakika santrifüj edilerek çöktüldü. Dış faz, verim ve enkapsülasyon etkinliğinin saptanması amacı ile spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemlerde kullanılmak üzere temiz bir tüpe alındı. Toplama işlemi sonrasında nanopartiküller, yıkama amacı ile en az 3 kez bidistile su ile süspende edildi ve yeniden +4°C, 16000 devir/dakika hızda 20 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Yıkama işlemini takiben -20°C' da dondurularak liyofilize edilen nanopartikül formülasyonları elenerek, tartıldı ve etiketli şişelere alınarak +4°C' da desikatörde muhafaza edildi. Kitozan nanopartikül formüllerine ilişkin formülasyon parametreleri **Tablo 5.2.1**'de verilmiştir.

Tablo 5.2.1. Kitozan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin formülasyon parametreleri.

Formülasyonlar	Kitozan (%)	TPP (%)	shRNA (µg)
L ₁	0.25	0.05	25
M ₁			
H ₁			
L ₂			100
M ₂			
H ₂			
L ₃			250
M ₃			
H ₃			

5.2.3. shRNA İçeren KomplekslerdeYapılan Kontroller

5.2.3.1. Kompleks Oluşumunun Saptanması

Yöntem 5.2.2.1., 5.2.2.2. ve 5.2.2.3.'de belirtildiği şekilde hazırlanan kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde kompleks oluşumu elektroforetik yöntem kullanılarak incelendi (Bkz: Yöntem 5.2.1.4.).

5.2.3.2. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri

Hazırlanan kompleksler, Jeol (Japonya) marka transsmission elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülendi. TEM incelemeleri için, % 0.2 Polivinil formal (Vinylec K) ile kaplanmış 100, 200 ve 300 mesh boyutlarındaki bakır (Cu⁺²) gridler kullanıldı. Polimer ile kaplanmış gridlerin üzerine, 10-20 µl hacimde incelenecek olan kompleks formülasyonunun pH 7.4 PBS tamponu içerisinde hazırlanan süspansiyonu damlatıldı. Oda temperaturünde yaklaşık olarak 5 dakika bekleme süresi (membrana tutunma süresi) sonunda süspansiyonun fazlası filtre kağıdı ile dikkatlice alındı. Gridler, oda temperaturünde kurutuldu ve negatif boyama tekniği

uygulandı. TEM incelemeleri, x30-50.000 büyütme aralığında ve 20kV artan voltaj koşullarında gerçekleştirildi.

5.2.3.3. Kompleks Boyutunun Tayini

Çalışmamız kapsamında hazırlanan kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde büyüklük analizi, Malvern Nano-ZS partikül ölçüm cihazında yapıldı. Bu amaçla, kompleks formülasyonları, pH 7.4 PBS tamponu içerisinde süspande edilerek ölçüldü. Her bir formülasyon için, n=3 olacak şekilde ölçüm alındı.

5.2.3.4. Yüzey Yük Tayini

Kompleks formülasyonlarında yüzey yük kontrolü çalışması, Malvern Nano-ZS marka boyut ve yüzey yükü ölçüm cihazında, pH 7.4 PBS tamponu içerisinde yapıldı. Her bir formülasyon için n=3 olacak şekilde ölçüm alındı.

5.2.3.5. Komplekslerin Serum Stabilitesi

Nanoplekslerin (komplekslerin) serum ve serum bileşenlerine karşı stabilitesi araştırıldı. Bu amaçla; hazırlanan kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA kompleksleri üzerine %10 oranında inaktive edilmemiş fetal bovin serum ilave edilerek karışım 24 saat süre ile 37°C'daki çalkalayıcı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ortamından 0, 15, 30, 45. dk ve 1, 2, 24, 48. ve 72. saatlerde alınan örnekler elektroforetik olarak incelendi.

5.2.3.6. Nükleaz Stabilitesi

Nanopleks formülasyonlarının, nükleaz (DNAase I) cinsi enzimlerin enzimatik aktivitesine karşı stabilitesi araştırıldı. Bu amaçla; kompleksler 1µg shRNA/1U DNAase I olacak şekilde nükleaz edilerek 37°C'daki çalkalayıcı su banyosunda 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 0., 15., 30., 45. dk ve 1, 2, 24., 48. ve 72. saatlerde inkübasyon ortamından alınan örneklerin üzerine 5 µl 0.5 M EDTA çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu ve elektroforetik olarak incelendi.

5.2.4. shRNA İçeren Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller

5.2.4.1. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri

shRNA içeren nanopartikül formülasyonları, Jeol (Japonya) marka transsmision elektron mikroskobu (TEM) ile görüntülendi. TEM incelemeleri için gridler Yöntem 5.2.3.2.'de belirtildiği şekilde hazırlandı ve çalışma x5000 büyütme aralığında ve 80kV artan voltaj koşullarında gerçekleştirildi.

5.2.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İncelemeleri

Formülleri **Tablo 5.2.1.**'de verilen nanopartikül formülasyonları, büyüklük ve yüzey özelliklerinin belirlenebilmesi amacı ile Jeol marka JSM-5910 LV model taramalı elektron mikroskobunda (SEM) incelendi. Bu amaçla, örnekler alüminyum grid üzerinde altın palladyum ile kaplandı. Kaplanan kitozan nanopartikül örneklerinde tarama işlemi, x100-65.000 büyütme aralığında ve 20kV artan voltaj koşullarında gerçekleştirildi.

5.2.4.3. Verim ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Saptanması

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının, verim ve % verim değerleri, liyofilizasyon işlemini takiben nanopartiküllerin elenip, tartılması ile elde edilen teorik ve pratik tartım sonuçlarından yararlanılarak hesaplandı. % enkapsülasyon etkinliği ise yöntem 5.2.2.4.'de belirtildiği şekilde santrifügasyon sonrası ayrılıp +4°C'da muhafaza edilen dış fazın 260 ve 280 nm dalga boylarındaki spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve yöntem 5.2.1.4.'de belirtildiği şekilde hazırlanan shRNA standart eğrisinden yararlanılarak saptandı.

5.2.4.4. Nanopartikül Boyutunun Tayini

shRNA içeren kitozan nanopartiküllerde büyüklük analizi, Malvern Nano-ZS partikül ölçüm cihazında yapıldı. Bu amaçla, nanopartikül formülasyonları, pH 7.4 PBS tamponu içerisinde süspande edilerek ölçüldü. Her bir formülasyon için, n=3 olacak şekilde ölçüm alındı.

5.2.4.5. Yüzey Yük Tayini

Nanopartikül formülasyonlarında yüzey yük kontrolü çalışması, Malvern Nano-ZS marka boyut ve yüzey yükü ölçüm cihazı kullanılarak, pH 7.4 PBS tamponu içerisinde gerçekleştirildi. Her bir formülasyon için n=3 olacak şekilde ölçüm alındı.

5.2.4.6. İn Vitro Stabilite Çalışmaları

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının in vitro stabilite çalışmaları +4°C ve 37°C'da gerçekleştirildi. Hassas terazi kullanılarak tartılan nanopartikül formülasyonları +4°C için nem almayacak şekilde desikatör içerisinde buzdolabına, 37°C için ise inkübatöre yerleştirildi. 1., 2. ve 3. aylarda alınan örneklerde büyüklük ve yüzey yükü ölçüm çalışmaları ile in vitro salım çalışmaları yapıldı.

5.2.4.7. İn Vitro Salım Çalışmaları

shRNA içeren kitozan nanopartiküllerden, shRNA'nın *in vitro* koşullarda salım çalışmaları, 37°C'daki çalkalayıcı su banyosu kullanılarak gerçekleştirildi. *İn vitro* salım çalışmaları için, hassas terazide tam olarak tartılan 20µg shRNA içeren nanopartikül formülasyonu, 2.0 ml steril pH 7.4 PBS tamponu ile süspande edilerek ağzı kapalı plastik numune şişelerine alındı ve 37°C'da çalkalayıcı su banyosunda salım bitene kadar kesintisiz olarak çalkalanmaya bırakıldı. *İn vitro* salıma bırakılan örneklerde, belirli zaman aralıklarında (1., 4., 8. saati takiben 24 saat ara ile) santrifügasyon ile nanopartiküller çöktürüldü ve üst faz (pH 7.4 PBS tamponu) alınarak yenisi ile değiştirildi. Santrifügasyon sonrası alınan üst fazda serbestleşen shRNA konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak tayin edildi. Ayrıca, shRNA yapısı üst faz örneklerinin agaroz jel elektroforezi yöntemine uygulanması ile elektroforetik olarak kontrol edildi.

5.2.4.8. Nanopartiküllerin Serum Stabilitesi

Nanopartiküllerin serum ve serum bileşenlerine karşı stabilitesi araştırıldı. Çalışmada; shRNA içeren kitozan nanopartikül formülasyonları, inaktive edilmemiş fetal bovin serum ile 10µg shRNA içeren nanopartikül/1.0 ml serum oranlarında

karıştırıldı ve 24 saat süre ile 37°C'deki çalkalayıcı su banyosunda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon ortamından 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde numuneler alındı. İşlem sonrası nanopartikül formülasyonları +4°C, 16.000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve pH 7.4 PBS tamponu ile en az 3 kez yıkandı. Daha sonra, serum uygulamasına bırakılmış nanopartiküller, 2 ml pH 7.4 PBS tamponu ilavesi ile *in vitro* hızlandırılmış salım işlemine tabi tutuldu. Hızlandırılmış salım işlemi sonrası shRNA konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak tayin edildi. Ayrıca shRNA yapısında meydana gelebilecek olası değişimler örneklerin agaroz jel elektroforezi yöntemine uygulanması ile elektroforetik olarak kontrol edildi.

5.2.4.9. Nükleaz Stabilitesi

Nanopartikül formülasyonlarının, nükleaz (DNAase I) cinsi enzimlerin enzimatik aktivitesine karşı stabilitesi araştırıldı. Bu amaçla, 1µg shRNA/1U DNAaz I olacak şekilde 10µg shRNA içeren kitozan nanopartikül formülasyonu üzerine 10 U DNAaz I ilave edilerek 37°C'daki çalkalayıcı su banyosunda 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde inkübasyon ortamından numuneler alındı ve üzerine 5.0µl 0.5M EDTA ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Nükleaz (DNAaz I) uygulaması sonrası nanopartikül formülasyonları, +4°C, 12000 devir/dakika hızda 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve pH 7.4 PBS tamponu ile süspande edilerek en az 3 kez yıkandı. Daha sonra nükleaz uygulamasına tabi tutulmuş nanopartikül formülasyonları hızlandırılmış *in vitro* shRNA salım çalışmasına alındı. İşlem sonrası shRNA konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak tayin edildi. Ayrıca shRNA yapısında meydana gelebilecek olası değişimler salım örneklerinin agaroz jel elektroforezi yöntemine uygulanması ile elektroforetik olarak kontrol edildi.

5.2.5. İn Vitro Transfeksiyon Çalışmaları

shRNA taşıyan farmasötik şekillerden olan kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA kompleks ve kitozan nanopartikül formülasyonlarının, *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında, HEK293, HeLa, ve MCF-7 hücre hatları kullanılmış, hücre hatlarının özelliklerine ilişkin bilgiler bölüm 5.1. Gereç kısmında 'Kullanılan Hücre Kültürleri' başlığı altında 5.1.4.'de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

5.2.5.1. Hücre Pasajı ve Hücre Kültürünün Devamlılığının Sürdürülmesi

Çalışmaları

In vitro transfeksiyon çalışmaları; T-25 cm² hücre kültürü şişeleri ile 24 ve/veya 96 kuyucuklu kültür kablari kullanilarak gerçekleştirildi. Hücre pasajlari ve hücre kültürünün devamlılığının sağlanması çalışmaları, % 10 fetal bovin serum, 100 mM L-glutamin ve 100 mM antibiyotik çözeltisi içeren 0.22 µm por çapına sahip filtre kullanilarak steril edilmiş RPMI, MEM ve/veya DMEM doku kültürü besiyeri kullanıldı. *In vitro* transfeksiyon çalışmalarının ilk aşamalarında, belirtilen doku kültürü besiyerleri, serum ilavesiz olarak kullanıldı. Hücre pasajlari ve deney grubundaki hücreler, % 5.0 CO₂, % 95 nem içeren 37°C'daki doku kültürü etüvünde inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında mikroskopik kontrolleri, hücre sayımı ve canlılık tayini yapıldı.

Hücre pasajlama işlemi, hücrelerin yoğunluğuna bağılı olarak 3-4 günde bir yapıldı. Hücre Pasajlama için besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücre tabakası steril PBS (pH 7.4) tamponu ile 2 kez yıkandı. Ardışık olarak hücre kültürü şişesi Tripsin:EDTA (%0.05:%0.05) çözeltisi ilave edilerek 37°C'de 2-5 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı ve hücre kültür şişesine tutunmuş haldeki hücrelerin tamamen kalkması sağlandı. Hücre tabakasının tamamen dağıldığı invert ışık mikroskobu ile gözlenerek onaylandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 5 ml taze besiyeri ilave edildi ve birkaç kez pipetaj yapılarak hücre kümelerinin ayrılması sağlandı. İstenilen sayıda hücre ekimi yapılan hücre kültürü şişeleri ve/veya hücre kültürü plaklari yeniden % 5 karbondioksit ve % 98 nem içeren 37°C'lik etüvde kaldırılarak inkübasyona devam edildi.

5.2.5.2. Kompleksler İle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları

Kitozan kompleks formülasyonlari ile *in vitro* transfeksiyon çalışlari, T-25 cm² hücre kültürü şişelerinde sağlıklı bir şekilde büyüme ve üreme profili gösteren, tek tabaka oluşturmuş hücre kültürleri kullanıldı. Tek tabaka oluşturmuş standart hücre pasajlarında, Tripan mavisi diskalifikasyonu yöntemi kullanilarak, % canlılık tayini ve hücre sayımı yapıldı. Tripan mavisi diskalifikasyonu yönteminde;

tripsinize edilen hücrelerin üzerine 5 ml besiyeri eklendi ve 1000 rpm’de 4 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve çökelti halindeki hücreler 1 ml besiyeri ilavesi ile süspande edildi. Steril bir ependorf içerisinde 100 µl hücre süspansiyonu, 400 µl besiyeri ve 500 µl % 0.4’’lük tripan mavisi çözeltisi karıştırıldı. Thoma laminının 16 büyük karelik alanının en üst ve en sağ çizgisi dışında kalan alan üzerindeki toplam ölü ve canlı hücre sayısı ters fazlı mikroskoptan gözlenerek sayıldı. Bu işlem Thoma laminının diğer 16 büyük karelik bölmesi için de tekrarlandı. Elde edilen sayım sonuçlarından ortalama hücre sayısı hesaplandı. Hücre sayısı hesaplanması için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \frac{\text{Ortalama hücre sayısı}}{10^{-4}} \times (\text{dölüsyon faktörü}=10)$$

İstenilen konsantrasyonda hücre sayısına ulaşmak için, besiyeri ile seyreltilen hücre süspansiyonlarından 6- kuyucuklu hücre kültürü plağına her bir kuyucuğa 2×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı.

Hücre pasajı sonrası, yaklaşık olarak %50-70 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında *in vitro* transfeksiyon çalışmasına başlandı. İlk aşamada, hücrelerin üzerindeki besiyerleri alındı ve kuyulara önceden belirlenen miktarlarda (1 µg shRNA nanopleks /kuyu olacak şekilde) kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA kompleks formülasyonları ilave edildi. Uygulamayı takiben hücrelerin üzerine kuyulara standart olarak konulması gereken toplam besiyeri miktarının $\frac{1}{4}$ ’ü oranında, serum içermeyen doku kültürü besiyeri eklendi ve kültür kapları doku kültürü etüvünde inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyon işleminden 4-6 saat sonra kuyulara, $\frac{3}{4}$ oranında taze serum içeren besiyeri ilave edildi ve kültür plakları yeniden doku kültürü etüvüne yerleştirildi.

İn vitro transfeksiyon sonrası belirli zaman aralıklarında (24, 48 ve 72. saatlerde) deney gruplarında hücreler lizis edilip plaklar -20°C ’daki derin dondurucuya kaldırıldı. Tranfeksiyon çalışmaları tamamlandıktan sonra hücre lizatlarında VEGF miktar tayini kit kullanılarak ELISA yöntemi ile yapıldı.

5.2.5.3. Nanopartiküller İle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları

Kitozan nanopartikül formülasyonları ile gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında da Yöntem 5.2.5.1.'de belirtildiği şekilde çalışıldı. Hücre kültürü plağı kuyularına 1 µg shRNA nanopartikül /kuyu olacak şekilde nanopartikül formülasyonları ilave edildi ve uygulamayı takiben hücrelerin üzerine kuyulara standart olarak konulması gereken toplam besiyeri miktarının ¼'ü oranında, serum içermeyen doku kültürü besiyeri eklendi. Transfeksiyon işleminden 4-6 saat sonra kuyulara, ¾ oranında taze serum içeren besiyeri ilave edildi ve kültür plakları yeniden doku kültürü etüvüne yerleştirildi. Nanopartikül formülasyonları ile gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında olduğu gibi belirli zaman aralıklarında (4. ve 8. günlerde) deney gruplarında hücreler lizis edilip hücre lizatlarında VEGF miktar tayini kit kullanılarak ELISA yöntemi ile yapıldı.

5.2.6. İn Vitro Gen İnhibisyonunun Tayini

Kompleks ve nanopartikül uygulanan hücrelerde *in vitro* VEGF gen inhibisyonu tayini kalitatif ve kantitatif olarak incelenmiştir.

5.2.6.1. Floresan Mikroskopu İncelemeleri

İn vitro gen inhibisyonunun tayini ve shRNA hücreye girişinin izlenmesinde shRNA vektör yapısında bulunan GFP seleksiyon marker geninden yararlanıldı. Tranfeksiyon çalışması sonrası sonlandırılan deney serilerinde lizis işlemi öncesi hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve kültür plağı kuyuları steril PBS ile yıkandı. Hücre kültürü plaklarında kuyulardaki hücreler floresan mikroskopu altında incelendi ve dijital kamera yardımıyla resim alındı.

5.2.6.2. VEGF'in ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi İle Tayini

İn vitro transfeksiyon çalışmaları sonrasında hücre lizatlarında VEGF tayini ELISA yöntemi ile ticari üretici protokolüne uygun olarak yapıldı. Kültür vasatında biriken VEGF proteini ve rekombinant insan VEGF165 protein standardın dilüsyonları katı faz sandviç ELISA yöntemi kullanılarak analiz edildi. Kültür süpernatantı (insan VEGF antijeni), insan VEGF165'e spesifik poliklonal antikor ile

kaplı kuyularda inkübe edildi. Yıkamadan sonra, VEGF'e spesifik biotinlenmiş monoklonal antikor eklendi. İnkübasyondan sonra streptavidin-peroksidaz enzimi ilave edildi. Üçüncü inkübasyondan ve tüm bağlanmayan enzim uzaklaştırılıp yıkandıktan sonra, enzime bağlanarak renk oluşturan substrat solüsyonu eklendi. Bu renkli ürünün yoğunluğu, orjinal numunede var olan VEGF konsantrasyonuna orantılanarak elde edildi. Spektrofotometrik yöntem ile 450nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. VEGF miktar tayini, kit içerisindeki 0-1500 pg/ml arasında değişen VEGF standartları kullanılarak oluşturulan VEGF standart eğrisinden yararlanılarak belirlendi. Her bir örnek için n=3 olacak şekilde çalışıldı ve standart sapmaları ($\pm$) hesaplandı.

5.2.7. Taşıyıcı Sistemlerin İn Vitro Sitotoksitesisi

shRNA taşıyıcı sistemlerin (Kitozan/shRNA, protamin/shRNA, kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ve shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları) in vitro sitotoksitesisi MTT yöntemi kullanılarak araştırıldı⁽¹⁶⁵⁾.

Bir tetrazolyum tuzu olan MTT {3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür} analizini hücre proliferasyonunu ,canlılığı ve sitotoksitesiyi ölçmekte kullanılır. Yöntem mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolyum tuzlarının indirgenmesine dayanan ,hücre büyümesi ve ksenobiyotik sitotoksitesiyi yansıtan bir yöntemdir⁽⁶⁶⁾.

5.2.8. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Tez kapsamında elde edilen in vitro çalışmalara ilişkin sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizinde, Mann Whitney Rank Sum Test ve Student's t-Test kullanıldı, p<0.05 anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. shRNA İle İlgili Çalışmalara İlişkin Bulgular

6.1.1. shRNA İzolasyonuna İlişkin Bulgular

Tez çalışmasında kullanılan ve karakteristik özellikleri, bölüm 5.1. Gereç kısmında ‘Plazmid siRNA (Short Hairpin) Yapısı’ başlığı altında 5.1.3’de ayrıntılı bir şekilde verilen psiRNA-mVEGF plazmidinin *Escherichia coli* GT116 konak bakterisine transformasyonu yöntem 5.2.1.2. ve izolasyonu yöntem 5.2.1.3.’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

6.1.2. shRNA’nın Kontrolüne İlişkin Bulgular

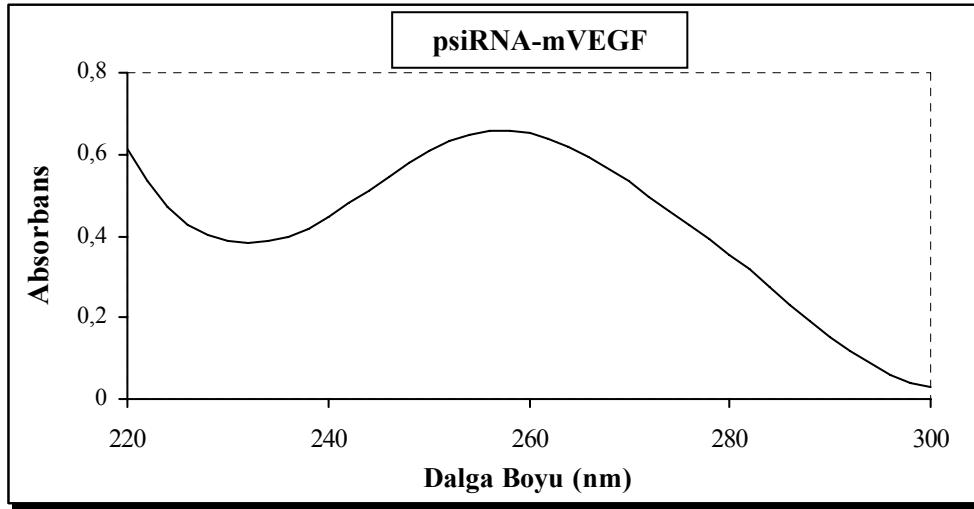
İzole edilen plazmid shRNA’da Yöntem 5.2.1.4.’de belirtilen spektrofotometrik ve elektrofotometrik kontroller yapılmış ve yapılan kontrollere ilişkin sonuçlar aşağıda verilmiştir.

6.1.2.1. shRNA’nın Spektrofotometrik Kontrolüne İlişkin Bulgular

İzole edilen shRNA’nın spektrofotometrik kontrolü yöntem 5.2.1.4.’de belirtildiği şekilde yapıldı.

shRNA miktar tayini için; 1/100 (shRNA/TE tamponu) oranında steril pH 8.0 TE tamponunda seyreltilerek hazırlanan örneklerin, spektrofotometrik olarak OD 260 ve 280nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü. OD 260nm dalga boyundaki absorbans değeri yöntem 5.2.1.4.’de verilen formülde yerine konularak izole edilen shRNA miktarı hesaplandı.

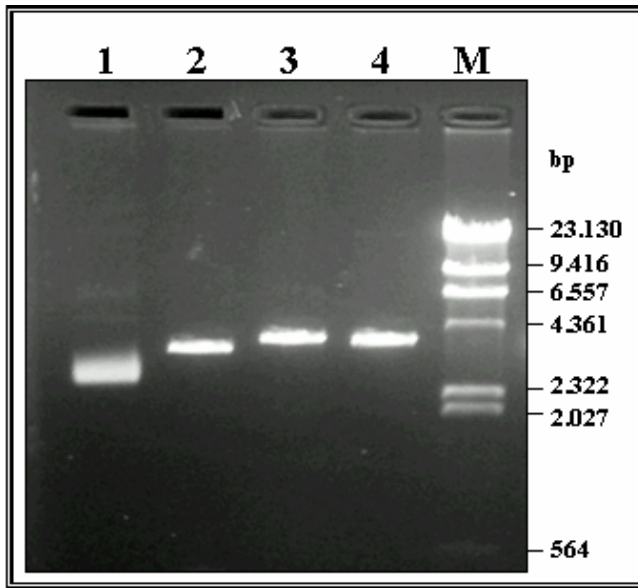
İzole edilen shRNA örneklerinde saflık derecesinin yani A_{260}/A_{280} oranının moleküler ve gen aktarımı çalışmalarına uygun olarak 1.80-1.92 arasında değiştiği bulundu ($A_{260}=0.732$, $A_{280}=0.399$, $A_{260/280}=1.834$). İzole edilen shRNA’nın, 220-300 nm dalga boyları arasındaki spektrofotometrik ölçümü sonucu elde edilen UV spektrumu Şekil 6.1.1.’de verilmiştir.



Şekil 6.1.1. psiRNA-mVEGF plazmidine ait UV spektrumu.

6.1.2.2. shRNA'nın Elektroforetik Kontrolüne İlişkin Bulgular

İzole edilen shRNA; miktarının, saflık derecesinin, içerdiği yapısal formların ve restriksiyon enzim haritasının doğruluğu agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak Yöntem 5.2.1.4.'de belirtildiği şekilde incelendi. shRNA'nın izolasyon sonrası, elektroforetik incelemelerine ilişkin agaroz jel fotoğrafları **Resim 6.1.1.** ve **6.1.2.**'de verilmiştir.



M. Marker (λ DNA/Hind III)

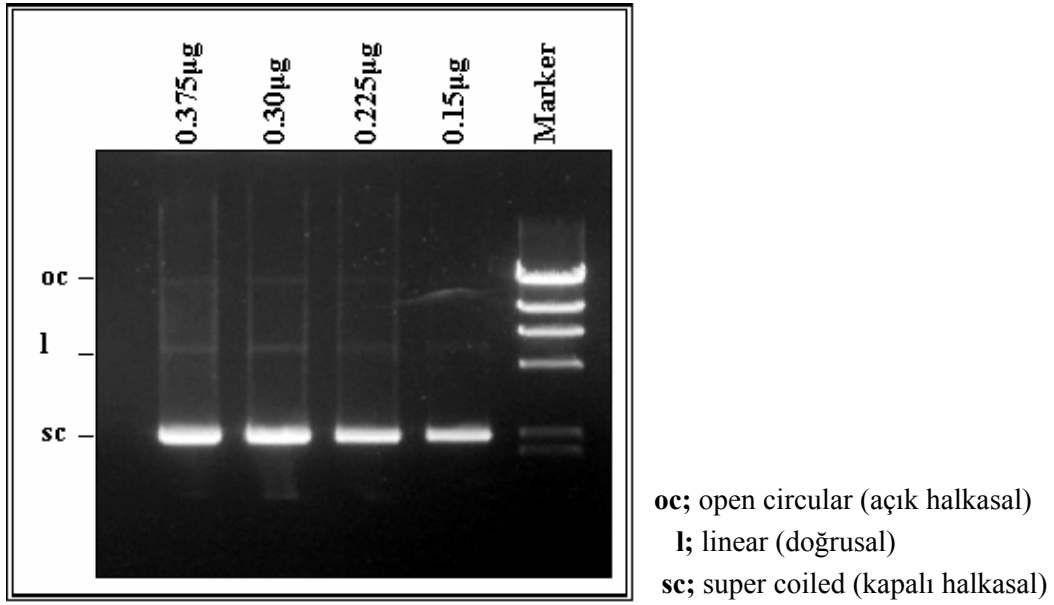
1. psiRNA-mVEGF plazmidi izolasyon

2. psiRNA+XbaI+ClaI kesim sonucu

3. psiRNA+ XbaI kesim sonucu

4. psiRNA+ ClaI kesim sonucu

Resim 6.1.1. psiRNA-mVEGF plazmidinin agaroz jel fotoğrafı.



Resim 6.1.2. Farklı konsantrasyonlardaki psiRNA-mVEGF plazmidine ait agaroz jel fotoğrafı.

Agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre; kullanılan yöntem ile yaklaşık %95-100 oranında kapalı halkasal formda shRNA izole edilmiştir (**Resim 6.1.1. ve 6.1.2.**). Agaroz jel elektroforezi çalışması sonuçlarına göre, psiRNA-mVEGF plazmidini restriksiyon enzim haritasında yer alan XbaI ve ClaI restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilebilirliği ve 3589 baz çifti uzunluğunda bir DNA molekülü olduğu doğrulanmıştır.

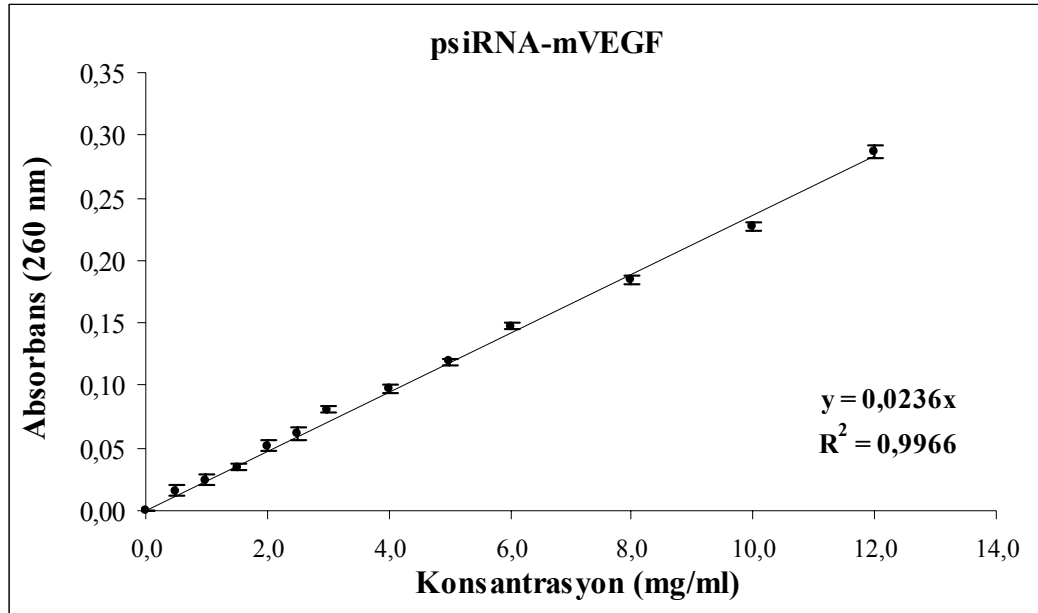
6.1.2.3. shRNA'nın Standart Eğrisinin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

shRNA standart eğrisi, 0-12 µg/ml konsantrasyon aralığında n=3 olacak şekilde yöntem 5.2.1.4.'de belirtildiği şekilde çalışılarak hazırlandı. 0-12µg/ml konsantrasyon aralığında n=3 olacak şekilde spektrofotometrik yöntem ile çalışılarak hazırlanan shRNA standart eğrisinin; doğru denkleminin $y = 0.0236x$ ve $R^2 = 0.9966$ olduğu saptandı ve tez çalışması kapsamındaki çalışmalarda kullanılabileceğine karar verildi.

shRNA standart eğrisine ait 260nm dalga boyundaki absorbans değerleri **Tablo 6.1.1.**'de ve konsantrasyon değerlerine bağlı absorbans değişim grafiği **Şekil 6.1.2.**'de verilmiştir.

Tablo 6.1.1. shRNA standart eğri çizimine ilişkin değerler.

shRNA Konsantrasyonu (µg/ml)	Absorbans (OD 260nm)
0,5	0.016 ± 0.004
1,0	0.024 ± 0.004
1,5	0.035 ± 0.003
2,0	0.052 ± 0.003
2,5	0.062 ± 0.005
3,0	0.081 ± 0.003
4,0	0.098 ± 0.003
5,0	0.119 ± 0.002
6,0	0.147 ± 0.002
8,0	0.184 ± 0.003
10,0	0.227 ± 0.003
12,0	0.287 ± 0.004



Şekil 6.1.2. psiRNA-mVEGF plazmid vektörüne ait standart eğri.

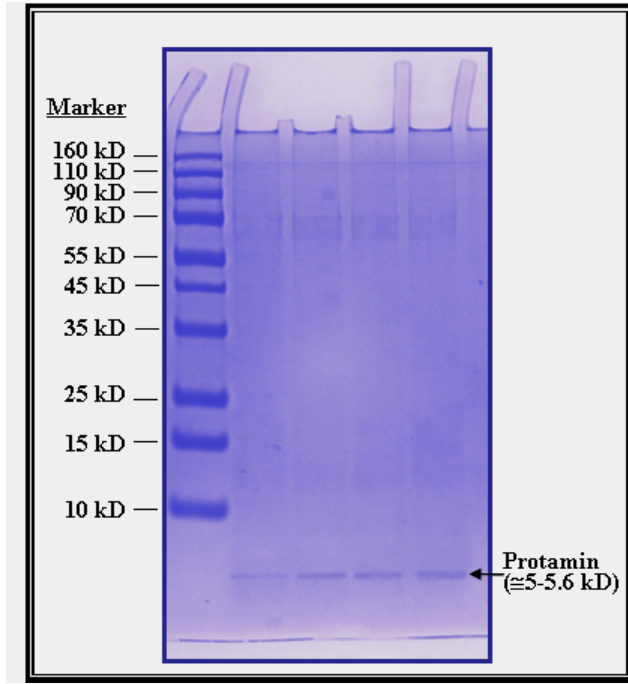
6.2. shRNA İçeren Farmasötik Şekillerin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

6.2.1. Kitozan/shRNA Komplekslerinin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

Kitozan/shRNA kompleksleri Yöntem 5.2.2.1.'de belirtildiği şekilde 0.5/1, 1/1 ve 2/1 kompleks oranlarında hazırlanmıştır.

6.2.2. Protamin/shRNA Komplekslerinin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

Protamin'in protamin/shRNA komplekslerinin hazırlanması öncesinde molekül ağırlığı açısından incelenmesi amacı ile uygulandığı %12 Akrilamid-N,N'-metilen bisakrilamid SDS-PAGE'e ilişkin jel fotoğrafı **Resim 6.2.1.**'de verilmiştir.



Resim 6.2.1. Protamin'in SDS-PAGE görüntüsü.

Protamin, **Resim 6.2.1.**'de de görüldüğü gibi literatür bilgileri ile de uyumlu olacak şekilde yaklaşık 5-5.6 kD ağırlığında bir protein molekülüdür.

Protamin/shRNA kompleksleri Yöntem 5.2.2.2.'de belirtildiği şekilde 0.1/1- 2/1 (protamin/shRNA) aralığında olmak üzere farklı kompleks oranlarında hazırlanmıştır.

6.2.3. Kitozan/Protamin/shRNA Komplekslerinin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

Kitozan/protamin/shRNA kompleksleri 0.5/1/1, 1/1/1 ve 2/1/1 olmak üzere üç farklı kompleks oranında Yöntem 5.2.2.3.'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

6.2.4. shRNA İçeren Kitozan Nanopartiküllerin Hazırlanmasına İlişkin Bulgular

shRNA içeren kitozan nanopartiküller, yöntem 5.2.2.4.'de belirtildiği şekilde hazırlandı ve formülasyon parametreleri **Tablo 5.2.1.**'de verildi.

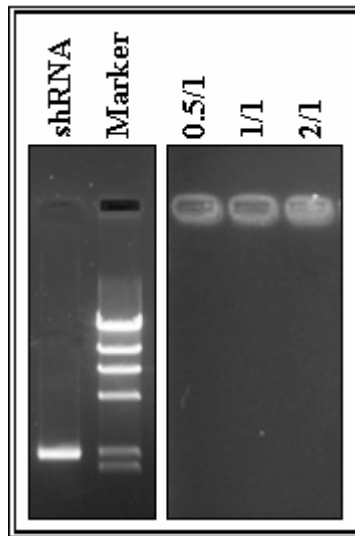
6.3. shRNA İçeren Komplekslerde Yapılan Kontrollere İlişkin Bulgular

6.3.1. Kompleks Oluşumunun Saptanması

Hazırlanan kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde, kompleks oluşum süreci ve kompleks oluşumunun fiziksel kontrolü elektroforetik yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

6.3.1.1. Kitozan/shRNA Kompleks Oluşumuna İlişkin Bulgular

0.5/1, 1/1 ve 2/1 kompleks oranlarında hazırlanan kitozan/shRNA komplekslerinin elektroforetik yöntem ile incelenmesine ilişkin agaroz jel fotoğrafı **Resim 6.3.1.**'de verilmiştir.



Resim 6.3.1. Kitozan/shRNA komplekslerine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

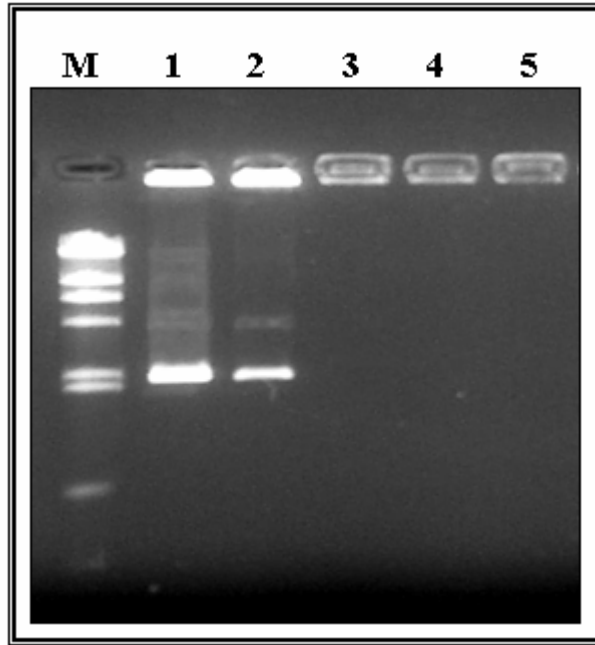
Farklı moleköl ağırlığına sahip kitozanlar ile 0.5/1, 1/1 ve 2/1 kompleks oranlarında hazırlanan kitozan/shRNA kompleksleri agaroz jel elektroforezi yöntemi ile değeriendirildi. **Resim 6.3.1.**'de de görüldüğü gibi pozitif yüklü kitozan ile negatif yüklü DNA ile arasındaki elektostatik etkileşim sonucunda denenen yük oranlarında tam kompleks oluşumu gözlenmiştir. Jel elektroforezi analizi sonucunda kısmi kompleks oluşumu göstergesi olarak kabul edilen serbest shRNA bandına rastlanmamıştır.

Kitozan/shRNA komplekslerinin oluşumunda, katyonik yapıda bir polimer olan kitozanın aniyonik yapıdaki shRNA ile elektostatik etkileşimi sonucunda moleküllerin polaritesi değışmekte ve buna bağılı olarak net yük nötrleşmektedir. Moleküllerin polaritesinde meydana gelen bu değışim nedeni ile elektroforez sırasında elektriksel alanda herhangi bir hareket söz konusu olmamakta ve jele uygulanan kitozan/shRNA kompleksleri jelin yükleme ceplerinde kalmaktadırlar. Elde edilen sonuçlara göre, shRNA'nın DNA molekölüne spesifik floresan bir boya olan etidyum bromür ile bağlanma eğilimi, kompleks yük oranı ile doğru orantılı olarak artmaktadır ve jel elektroforezi sonrası UV transillüminatörde jellerin incelenmesi sırasında daha yüksek yoğunlukta floresan göstermeleri ile de tesbit edilebilmektedir.

6.3.1.2. Protamin/shRNA Kompleks Oluşumuna İlişkin Bulgular

0.1/1 - 2/1; (protamin/shRNA) protamin/shRNA komplekslerinin elektroforetik yöntem ile incelenmesine ilişkin agaroz jel fotoğrafları **Resim 6.3.2., 6.3.3., 6.3.4., 6.3.5. ve 6.3.6.**'da verilmiştir.

Resim 6.3.2.'de farklı protamin/shRNA ağırlık oranlarında kompleks oluşumuna ilişkin agaroz jel fotoğrafı verilmiştir. Jel fotoğrafında da görüldüğü gibi, 0.1/1.0 ve 0.25/1.0 kompleks oranlarında kısmi kompleks oluşumu meydana gelmiş ve jelde serbest shRNA gözlenmiştir. Serbest shRNA miktarı 0.1/1.0 kompleks oranında 0.25/1.0 kompleks oranına kıyasla daha fazladır. 0.50/1.0 kompleks oranından itibaren ise jelde serbest shRNA gözlenmemiş ve kullanılan 0.50/1.0, 1.0/1.0, 2.0/1.0 oranlarında tam kompleks oluşumu meydana gelmiştir (**Resim 6.3.2.**).



M. Marker

1. 0.10/1.0 (protamin/shRNA)

2. 0.25/1.0 (protamin/shRNA)

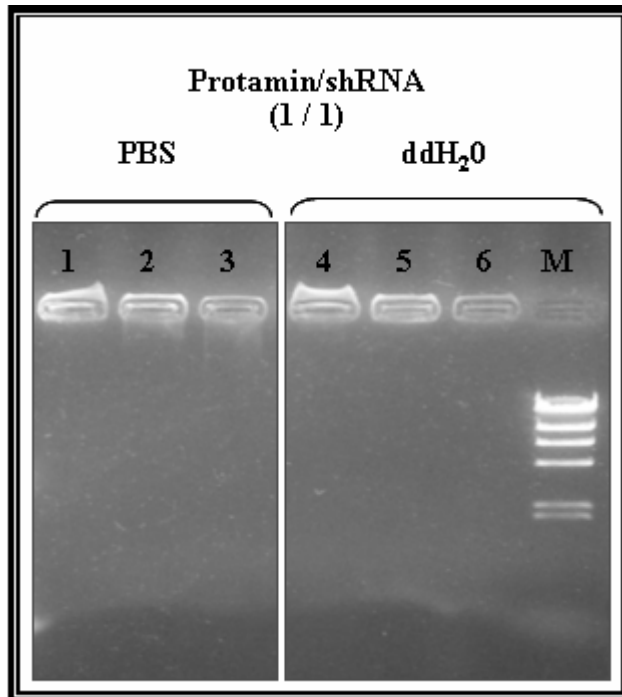
3. 0.50/1.0 (protamin/shRNA)

4. 1.0/1.0 (protamin/shRNA)

5. 2.0/1.0 (protamin/shRNA)

Resim 6.3.2. Farklı yük oranlarında protamin/shRNA kompleks oluşumu.

Farklı çözücülerin protamin/shRNA kompleks oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi amacı ile protamin ddH₂O ve PBS içerisinde çözündürülerek kompleksler hazırlanmıştır.



1. 2.0/1.0 (protamin/shRNA)

2. 1.0/1.0 (protamin/shRNA)

3. 0.5/1.0 (protamin/shRNA)

4. 2.0/1.0 (protamin/shRNA)

5. 1.0/1.0 (protamin/shRNA)

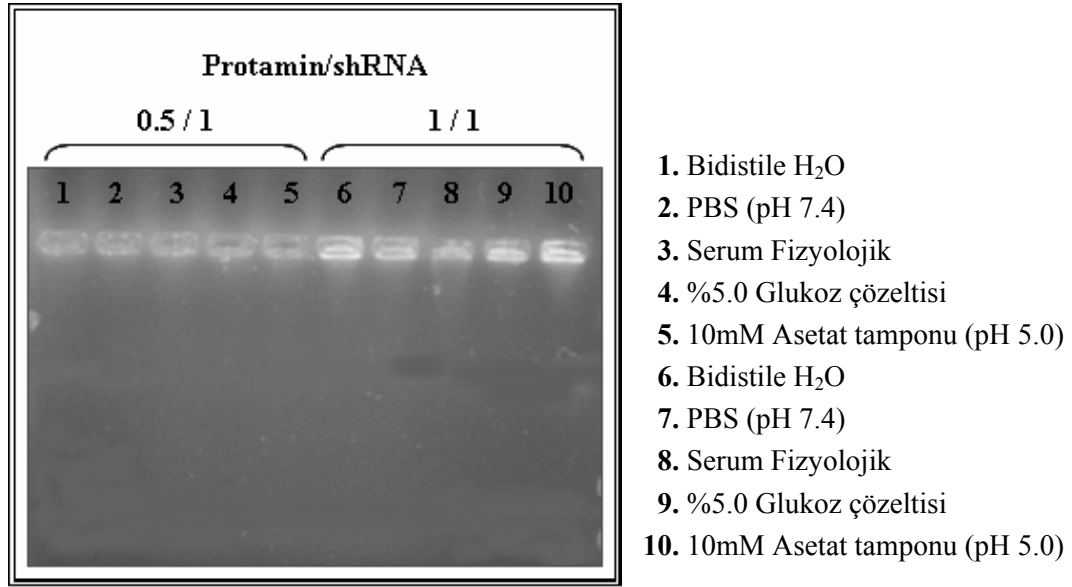
6. 0.5/1.0 (protamin/shRNA)

M. Marker

Resim 6.3.3. 1/1 protamin/shRNA oranında su ve PBS kullanılarak hazırlanmış kompleksler.

Çözücü olarak ddH₂O ve PBS kullanılarak hazırlanan komplekslere ilişkin agaroz jel fotoğrafı **Resim 6.3.3.**'de verilmiştir.

Ardışık olarak tam kompleks oluşumunun gözleendiği 0.5/1.0 ve 1.0/1.0 oranlarında protamin/shRNA kompleksleri, ddH₂O ve PBS tamponu yanı sıra çözücü olarak serum fizyolojik, %5.0 glukoz çözeltisi ve 10mM Asetat tamponu kullanılarak da hazırlanmıştır. Farklı çözücülerin protamin/shRNA komplekslerinin oluşumuna etkisinin incelendiği agaroz jel fotoğrafı **Resim 6.3.4.**'de verilmiştir.



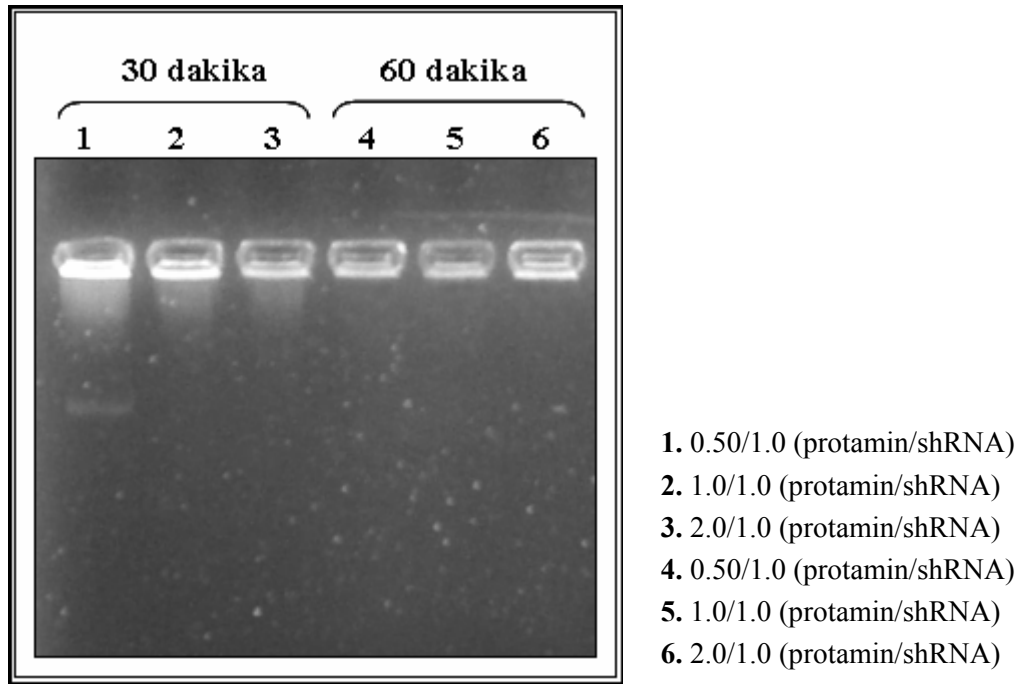
Resim 6.3.4. Protamin/shRNA komplekslerinin oluşumuna farklı çözücülerin etkisi.

Farklı çözücülerin protamin/shRNA kompleks oluşumu üzerinde negatif yönde bir etkisi gözlenmemiştir. Yalnızca, 1.0/1.0 oranında serum fizyolojik ile hazırlanan komplekslerde etidyum bromür bağlama spesifitesinde bir düşme gözlenmiştir.

Tez çalışmamız kapsamında in vitro transfeksiyon çalışmaları da düşünülerek fizyolojik ortama en uygun çözücünün PBS olduğuna karar verilmiş ve bundan sonraki bütün protamin/shRNA komplekslerinin hazırlanmasında çözücü olarak PBS kullanılmıştır.

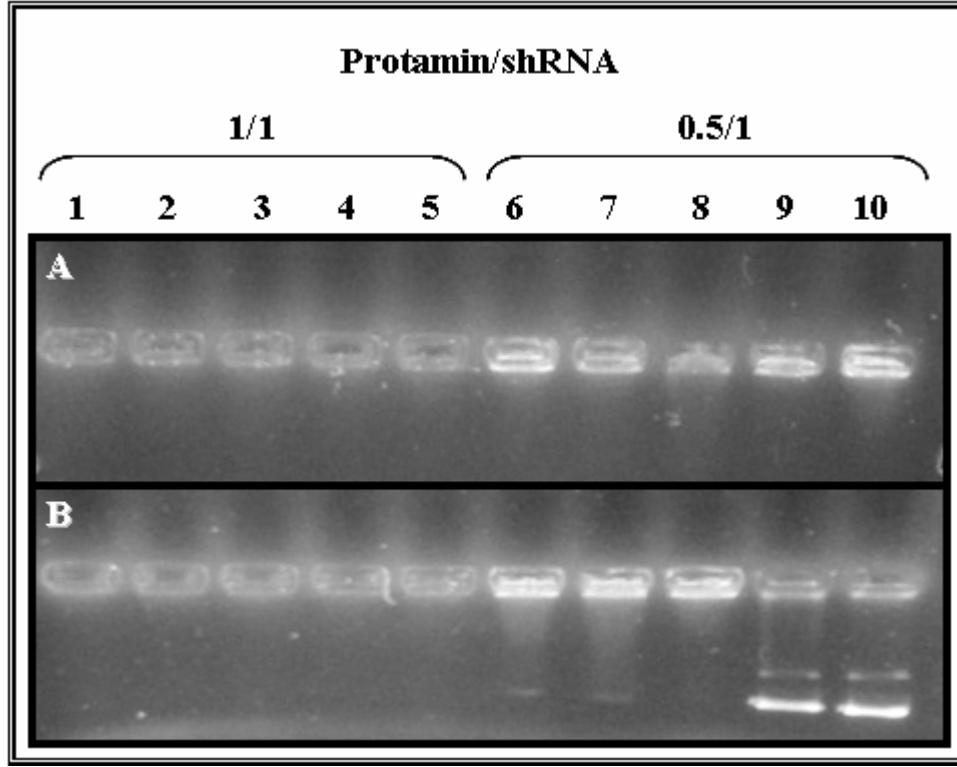
Kompleks oluşum sresinin etkisinin incelendiği agaroz jel fotoğrafında (**Resim 6.3.5.**); zamana bağlı olarak kompleks oluşumunun daha stabil bir şekilde meydana geldiği, kompleks oluşum süresi olarak 30 dakikanın denendiği örneklerde kullanılan oranlarda kısmi kompleks oluşumunun (zellikle 0.5/1, protamin/shRNA) meydana geldiği saptanmıştır. Kompleks oluşum süresi arttırıldığında ise kullanılan bütün oranlarda tam kompleks oluşumu gözlenmiştir (**Resim 6.3.5.**).

Protamin/shRNA kompleks oluşumunda zaman etkili bir faktördür. Tez alışmamızda zamana bağlı kompleks oluşumu (30, 60 ve 120 dakika) optimize edilmiştir ve protamin/shRNA komplekslerinde kompleks oluşum süresi olarak 60 dakika kullanılmıştır.



Resim 6.3.5. Protamin/shRNA kompleks oluşumunun zamana bağlı değişimi.

Liyofilizasyonun etkisinin araştırılması amacı ile farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan protamin/shRNA kompleksleri liyofilizasyon öncesi ve sonrası agaroz jel elektroforezi yöntemi ile değerlendirildi. Komplekslerde liyofilizasyon sürecinin etkisine ilişkin jel fotoğrafı **Resim 6.3.6.**'da verilmiştir.

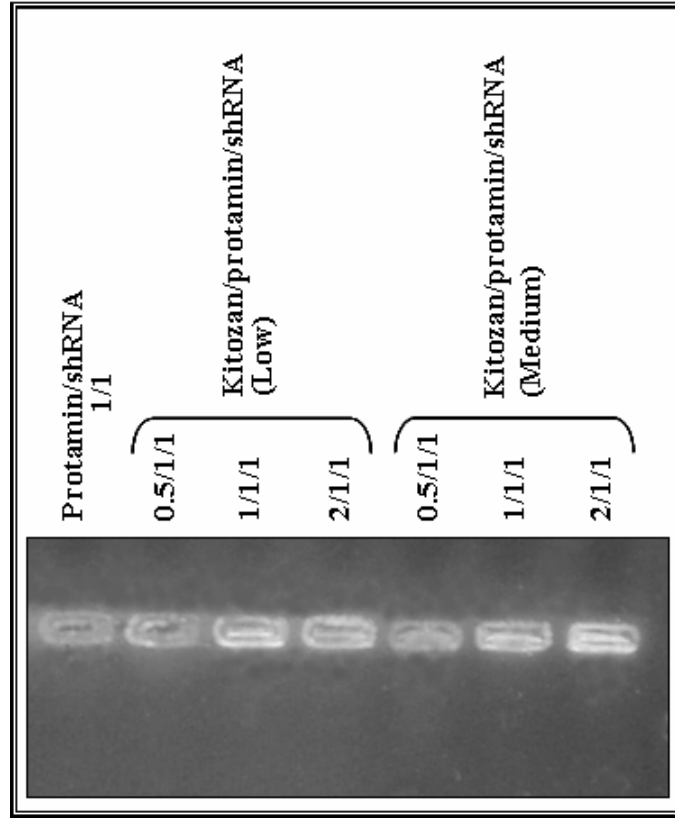


Resim 6.3.6. Farklı çözücülerde 1/1 ve 0.5/1 ağırlık oranında hazırlanmış protamin/shRNA komplekslerinin liyofilizasyon öncesi ve sonrası elektroforetik analizine ilişkin agaroz jel fotoğrafı [(A, Liyofilizasyon öncesi; B, Liyofilizasyon sonrası; 1. Bidistile H₂O, 2. PBS (pH 7.4), 3. Serum Fizyolojik, 4. %5.0 Glukoz çözeltisi, 5. 10mM Asetat tamponu (pH 5.0), 6. Bidistile H₂O, 7. PBS (pH 7.4), 8. Serum Fizyolojik, 9. %5.0 Glukoz çözeltisi, 10. 10mM Asetat tamponu (pH 5.0)].

Resim 6.3.6.'da da görüldüğü gibi liyofilizasyon sonrasında 0.5/1.0 oranındaki protamin/shRNA komplekslerinde açılma meydana gelmiş ve jelde serbest shRNA ile kısmi kompleks oluşumu gözlenmiştir. 1.0/1.0 oranında hazırlanan komplekslerde ise bir değişme saptanmamıştır. Çözücülerin liyofilizasyon sürecine etkisine ilişkin olarak; 0.5/1.0 oranında serum fizyolojik ile hazırlanan komplekslerde açılma diğer çözücülere kıyasla daha düşük düzeyde meydana gelmiştir.

6.3.1.3. Kitozan/Protamin/shRNA Kompleks Oluşumuna İlişkin Bulgular

0.5/1/1, 1/1/1 ve 2/1/1, yük oranlarında hazırlanan kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde, kompleks oluşumu elektroforetik yöntem ile incelenmiş ve agaroz jel fotoğrafı **Resim 6.3.7.**'de verilmiştir.

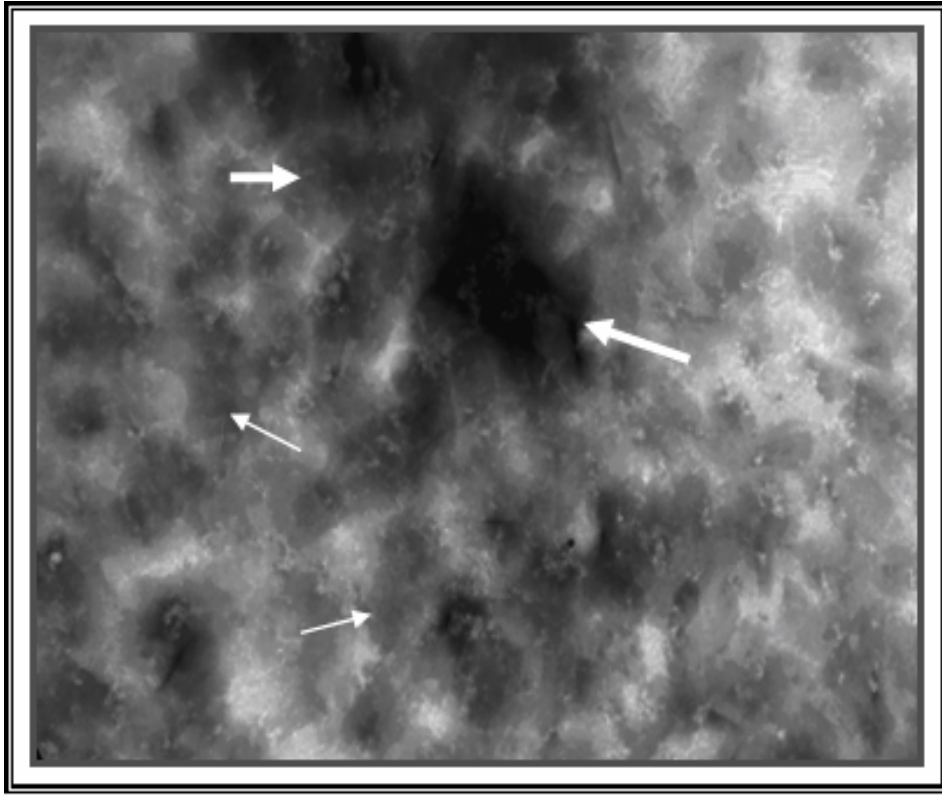


Resim 6.3.7. Kitozan/protamin/shRNA komplekslerinin elektroforetik analizine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

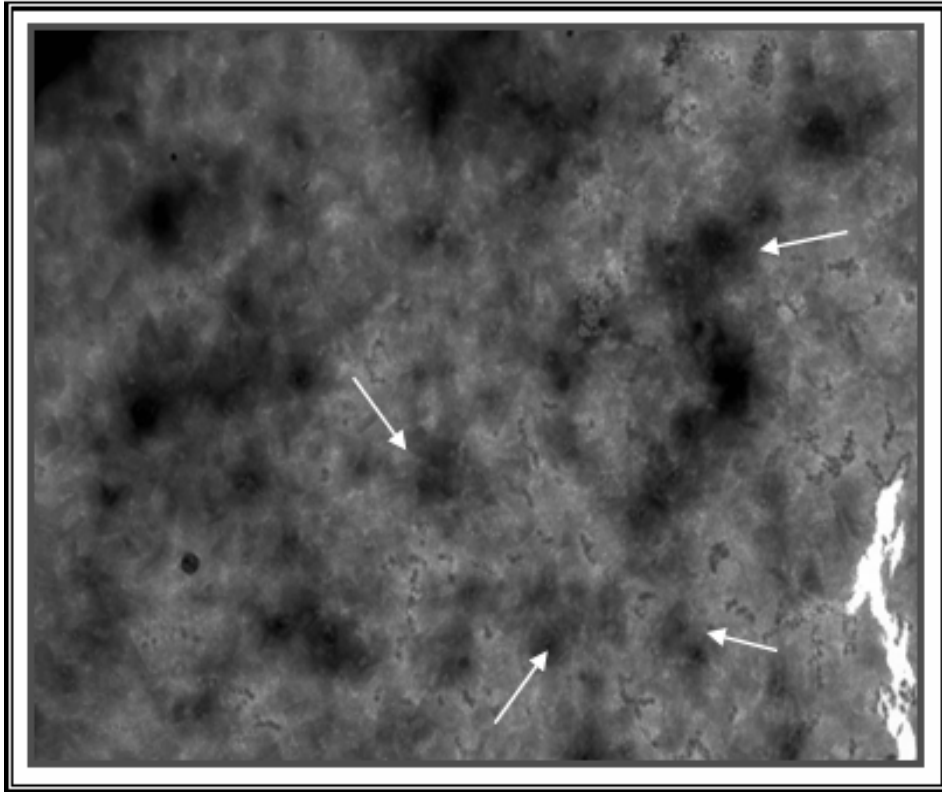
Farklı molekül ağırlığına sahip kitozan kullanılarak hazırlanan kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde **Resim 6.3.7.**'de de görüldüğü gibi kompleks oluşumu ve etidyum bromür bağlama spesifitesi kitozan oranındaki artış ile doğru orantılı olacak şekilde artmıştır. Elektroforetik yöntem ile farklı molekül ağırlığına sahip kitozan kullanılarak hazırlanan kompleksler arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Protamin/shRNA kompleks yapısına kitozan ilave edilmesi sonucunda daha stabil kompleksler elde edilmiştir.

6.3.2. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemelerine İlişkin Bulgular

Protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde kompleks oluşumu ve komplekslerin morfolojik özelliklerinin belirlemesi amacıyla yöntem 5.2.3.2.'de belirtildiği şekilde negatif boyama yöntemi ile TEM incelemesi gerçekleştirildi. TEM incelemesine ilişkin elektron mikroskobu mikroğrafları **Resim 6.3.8.** ve **6.3.9.**'da verilmiştir.



Resim 6.3.8. Protamin/shRNA komplekslerine ait TEM görüntüsü.



Resim 6.3.9. Kitozan/protamin/shRNA komplekslerine ait TEM görüntüsü.

80kV artan voltaj ve x5000 büyütme oranında gerçekleştirilen transmission elektron mikroskobu incelemelerinde, protamin/shRNA kompleksleri **Resim 6.3.8'**de oklar ile gösterildiği gibi heterojen yoğun alanlar şeklinde izlenmiştir. Buna karşılık kitozan/protamin/shRNA komplekslerinin protamin/shRNA komplekslerine kıyasla daha homojen bir dağılım sergilediği gözlenmiştir (**Resim 6.3.9.**).

6.3.3. Büyüklük Tayinine İlişkin Bulgular

Tez çalışması kapsamında hazırlanan kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde partikül büyüklüğü tayini yöntem 5.2.3.3.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Komplekslere ait partikül ölçüm sonuçları **Tablo 6.3.1.**'de verilmiştir.

Tablo 6.3.1.'de de görüldüğü gibi farklı molekül ağırlıklarına sahip kitozan ve protamin ile hazırlanan komplekslerde partikül büyüklüğü, kitozan/shRNA komplekslerinde 236.80 ± 10.15 - 365.77 ± 10.12 nm, protamin/shRNA komplekslerinde 221.15 ± 5.26 - 293.35 ± 12.22 nm ve kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde ise 287.52 ± 9.51 - 401.28 ± 14.56 nm arasında değişmektedir.

Kullanılan polimerler ve yöntem ile özellikle in vitro transfeksiyon çalışmalarında kullanıma uygun istenilen boyutta kompleksler elde edilmiştir.

6.3.4. Yüzey Yükü Tayinine İlişkin Bulgular

Kompleks formülasyonlarında yüzey yükü tayini yöntem 5.2.3.4.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Komplekslere ait yüzey yükü ölçüm sonuçları, Bulgular 6.3.3.'de yer alan **Tablo 6.3.1.**'de verilmiştir.

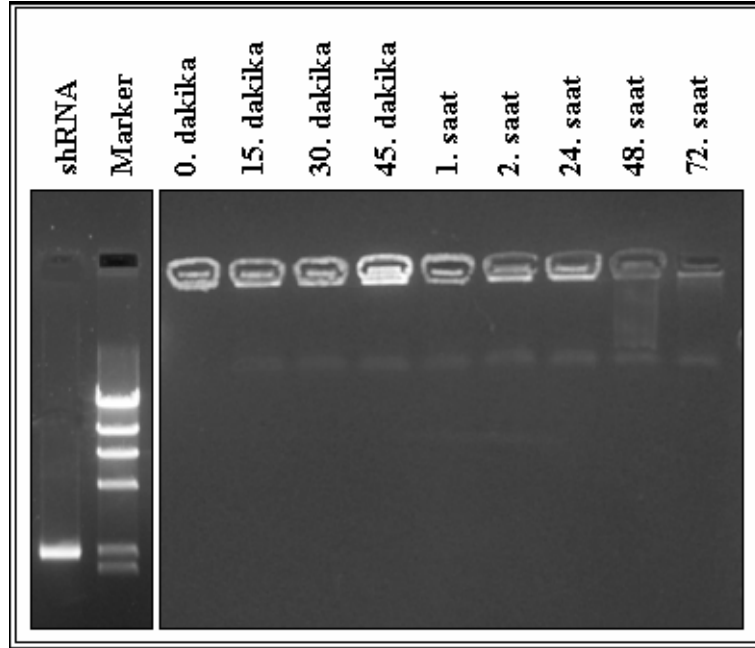
Yüzey yükü, kitozan/shRNA komplekslerinde 8.32 ± 2.14 - 28.11 ± 3.76 mV, protamin/shRNA komplekslerinde -12.51 ± 5.21 - 13.18 ± 2.56 mV ve kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde ise 8.71 ± 1.65 - 21.22 ± 3.28 mV arasında değişmektedir.

Tablo 6.3.1. Komplekslere ait partikül ve yüzey yükü ölçüm sonuçları.

Formülasyonlar	Partikül Büyüklüğü (nm $\pm$ SD)	Yüzey Yükü (mV $\pm$ SD)
Kitozan/shRNA		
<i>Düşük mwt. (70 kD)</i> 0.5/1	236.80 $\pm$ 10.15	8.32 $\pm$ 2.14
1/1	293.22 $\pm$ 11.24	15.45 $\pm$ 5.75
2/1	341.65 $\pm$ 10.05	23.71 $\pm$ 7.61
<i>Orta mwt. (400 kD)</i> 0.5/1	245.41 $\pm$ 11.50	9.41 $\pm$ 3.45
1/1	311.15 $\pm$ 12.16	17.21 $\pm$ 2.77
2/1	365.77 $\pm$ 10.12	28.11 $\pm$ 3.76
<i>Yüksek mwt. (750 kD)</i> 0.5/1	248.17 $\pm$ 10.15	9.11 $\pm$ 2.15
1/1	312.14 $\pm$ 11.45	18.17 $\pm$ 1.65
2/1	365.17 $\pm$ 12.51	28.05 $\pm$ 2.76
Protamin/shRNA		
0.10/1	221.15 $\pm$ 5.26	-12.51 $\pm$ 5.21
0.25/1	226.14 $\pm$ 6.55	-7.54 $\pm$ 3.18
0.50/1	255.05 $\pm$ 8.71	4.14 $\pm$ 1.42
1/1	274.16 $\pm$ 10.23	9.56 $\pm$ 3.15
2/1	293.35 $\pm$ 12.22	13.18 $\pm$ 2.56
Kitozan/protamin/shRNA		
<i>Düşük mwt. (70 kD)</i> 0.5/1/1	287.52 $\pm$ 9.51	8.71 $\pm$ 1.65
1/1/1	326.76 $\pm$ 10.10	13.22 $\pm$ 5.14
2/1/1	355.24 $\pm$ 12.41	18.52 $\pm$ 4.32
<i>Orta mwt. (400 kD)</i> 0.5/1/1	311.41 $\pm$ 14.32	10.12 $\pm$ 4.23
1/1/1	347.26 $\pm$ 11.25	16.21 $\pm$ 5.61
2/1/1	401.28 $\pm$ 14.56	21.22 $\pm$ 3.28
<i>Yüksek mwt. (750 kD)</i> 0.5/1/1	315.41 $\pm$ 12.25	11.25 $\pm$ 5.55
1/1/1	345.26 $\pm$ 10.51	14.11 $\pm$ 4.21
2/1/1	400.24 $\pm$ 12.44	20.12 $\pm$ 4.25

6.3.5. Serum Stabilitesine İlişkin Bulgular

Hazırlanan kompleks formülasyonlarının in vitro transfeksiyon çalışmaları öncesi serum komponentlerine karşı stabilitesi yöntem 5.2.3.5.'de belirtildiği şekilde araştırıldı ve elektroforetik yöntem ile kontrol edildi. Komplekslerin 0-72 saat süresince serum stabilitesine ilişkin agaroz jel fotoğrafı **Resim 6.3.10.**'da verilmiştir.

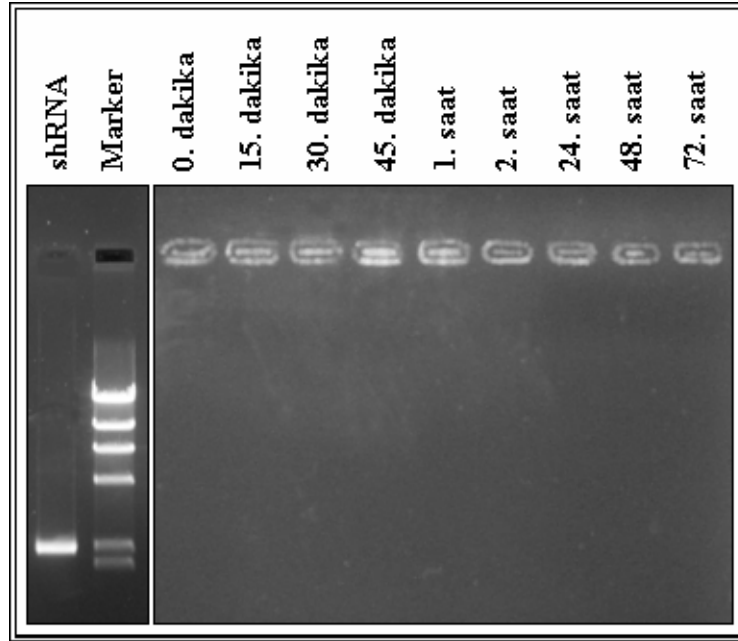


Resim 6.3.10. 1/1 ağırlık oranındaki protamin/shRNA komplekslerinin serum stabilitesine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

Protamin/shRNA (1/1, a/a) komplekslerinde, kompleks yapısı serum varlığında 24 saat süresince stabil kalmış, 48. saatte kompleks yapısında kısmi açılmayı takiben 72. saatte degradasyon gözlenmiştir (**Resim 6.3.10.**). Protamin, shRNA'yı serum ve serum komponentlerinin enzimatik etkisine karşı başarılı bir şekilde korumuştur.

6.3.6. Nükleaz Stabilitesine İlişkin Bulgular

Kompleks formülasyonlarının in vitro transfeksiyon çalışmaları öncesi serum komponentlerine karşı stabilitesinin araştırılmasına paralel olarak nükleaz cinsi (DNAaz I) enzimlere karşı stabilitesi de araştırıldı. Nükleaz stabilitesi çalışması yöntem 5.2.3.6.'da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi ve elektroforetik yöntem ile kontrol edildi. Komplekslerin nükleaz stabilitesine ilişkin agaroz jel fotoğrafı **Resim 6.3.11.**'de verilmiştir.



Resim 6.3.11. 1/1 (a/a) oranındaki protamin/shRNA komplekslerinin DNAaz I stabilitesine ilişkin agaroz jel fotoğrafı.

Protamin/shRNA (1/1, a/a) komplekslerinde, nükleaz muamelesi sonrası kompleks yapısı 72 saat süresince stabil kalmıştır (**Resim 6.3.11.**). Protamin, shRNA'yı nükleaz cinsi enzimlere karşı başarılı bir şekilde korumuştur.

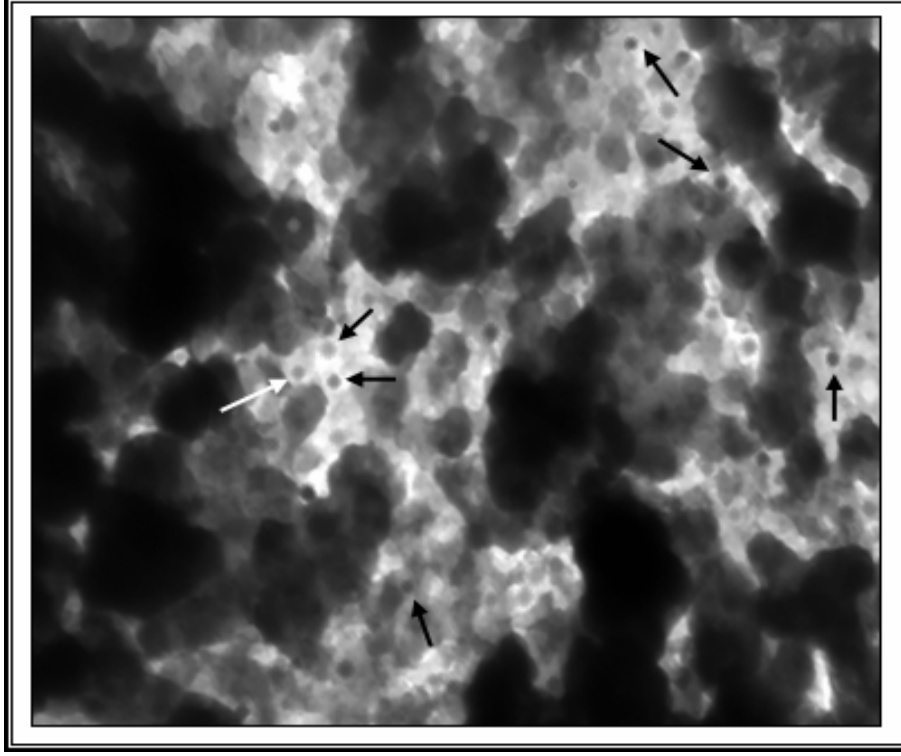
Serbest shRNA'nın nükleaz ile muamelesi sonrasında ise belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde 0. dakikadan itibaren shRNA'nın tamamen degrades olduğu gözlemlendi.

6.4. shRNA İçeren Nanopartiküllerde Yapılan Kontrollere İlişkin Bulgular

6.4.1. Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yöntem 5.2.4.1.'de belirtildiği şekilde negatif boyama yöntemi ile 80 kV artan voltaj ve x5000 büyütme oranında TEM

incelemeleri yapıldı. TEM incelemesine ilişkin elektron mikroskobu mikroğrafi **Resim 6.4.1.**'de verilmiştir.

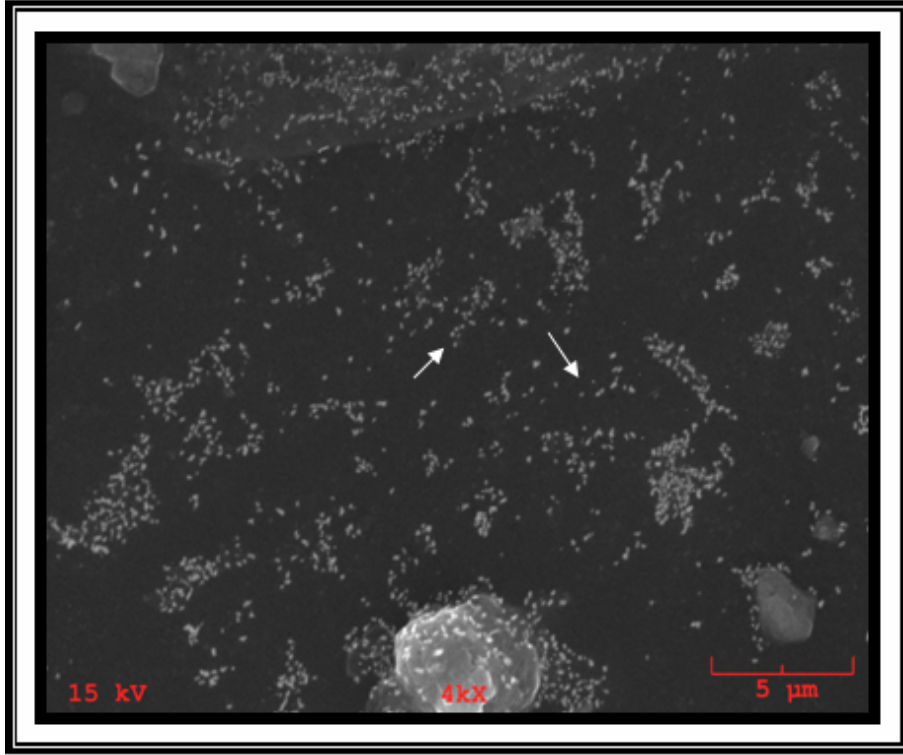


Resim 6.4.1. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerine ait TEM görüntüsü.

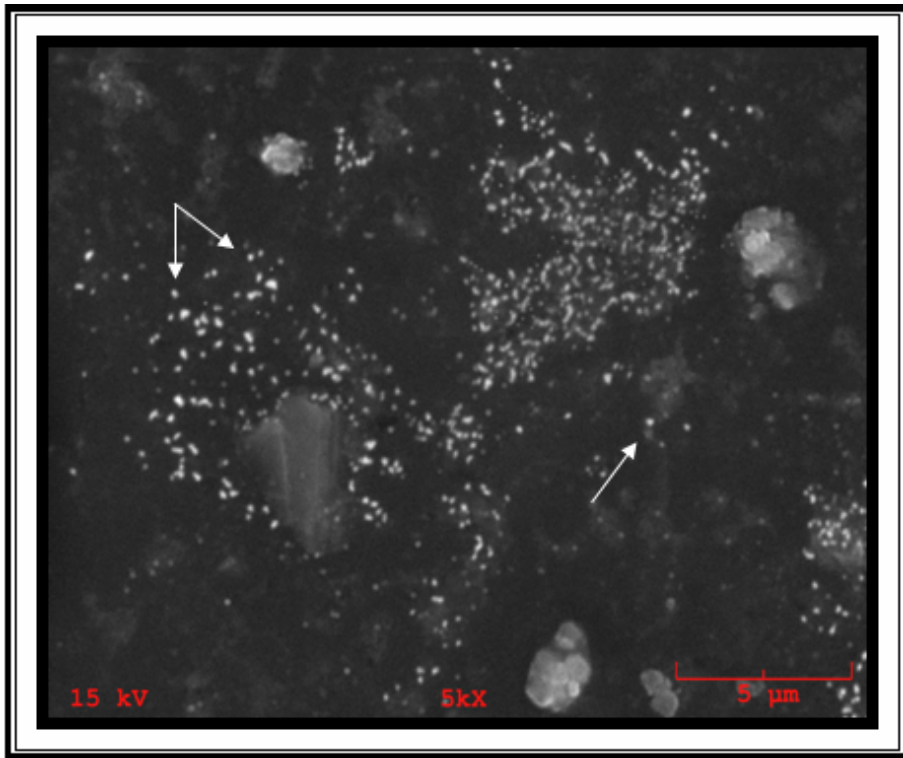
Kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının transmission elektron mikroskobu incelemelerinde, nanopartiküller kullanılan negatif boyama tekniği ve yoğunluğa bağlı olarak gri-siyah renkte gözlenmiştir. Preparatta nanopartiküllerin yoğun ve agregat halinde yer aldığı bölgeler koyu siyah renkte, daha az yoğunluktaki bölgeler ise gri tonlarında bir görüntü sergilemiştir (**Resim 6.4.1.**). **Resim 6.4.1.**'deki oklar, az yoğun bölgelerdeki tek nanopartikülleri göstermektedir.

6.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) İncelemelerine İlişkin Bulgular

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemeleri yöntem 5.2.4.2.'de belirtildiği şekilde yapıldı. SEM incelemelerine ilişkin elektron mikroskobu mikroğrafları **Resim 6.4.2.**, **6.4.3.** ve **6.4.4.**'de verilmiştir.

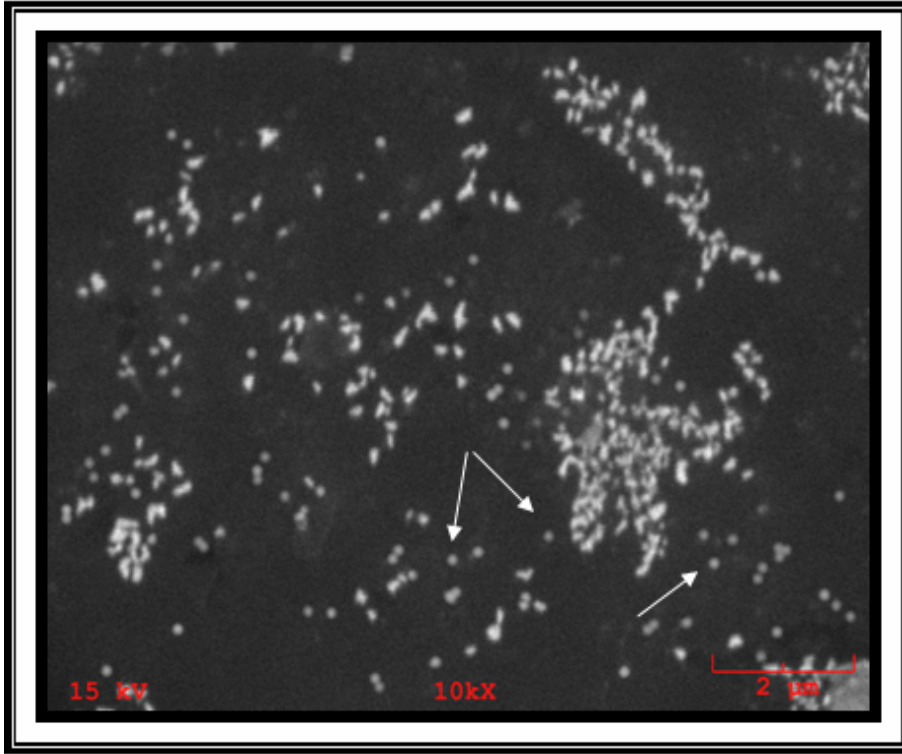


Resim 6.4.2. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerine ait SEM görüntüsü (4kX).



Resim 6.4.3. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerine ait SEM görüntüsü (5kX).

Nanopartikül formülasyonlarının, scanning elektron mikroskobu (SEM) incelemeleri sonuçlarına göre; çalışılan yöntem ile istenilen özelliklerde, küresel kitozan nanopartiküller elde edilmiştir (**Resim 6.4.2., 6.4.3. ve 6.4.4.**). Ayrıca, kitozan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin SEM boyut analizi sonuçlarının da (yaklaşık olarak 200-500 nm büyüklüğünde), partikül boyut ölçüm cihazı ölçüm değerleri ile uyumluluk gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte, nanopartikül büyüklüğüne bağlı olarak partiküllerin agregat oluşturma eğilimi nedeni ile SEM incelemelerinde istenildiği gibi homojen bir görüntü alınamamış ve yüzey özellikleri de tam olarak aydınlatılamamıştır.



Resim 6.4.4. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerine ait SEM görüntüsü (10kX).

6.4.3. Verim ve Enkapsülasyon Etkinliğinin Saptanmasına İlişkin Bulgular

Kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarında, verim ve shRNA enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi çalışmaları, yöntem 5.2.4.3.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin elde edilen, % verim ve % enkapsülasyon etkinliği değerleri, **Tablo 6.4.1.**'de verilmiştir.

Kitozan nanopartikül formülasyonlarında, verim ve % verimin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda **Tablo 6.4.1.**'de görüldüğü gibi; formülasyon veriminin, 92.2 ± 1.0 ile 97.8 ± 1.0 (L formülasyonlarında; $93.3 - 96.5$, M formülasyonlarında; $93.3 - 97.8$, ve H formülasyonlarında ise $92.2 - 92.8$) değerleri arasında değiştiği saptandı. Elde edilen veriler, tez kapsamında kullanılan yöntem ile başarılı ve verimli bir şekilde nanopartikül formülasyonlarının hazırlanabildiği göstermektedir.

Tablo 6.4.1. Kitozan nanopartikül formülasyonlarına ait verim ve enkapsülasyon etkinliği Değerleri

Formülasyonlar	Verim (%)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
L₁	93.3 ± 2.4	98.2 ± 1.5
M₁	93.3 ± 0.7	89.9 ± 1.5
H₁	92.2 ± 1.0	91.7 ± 1.2
L₂	95.5 ± 1.2	89.7 ± 1.0
M₂	95.0 ± 1.7	94.6 ± 1.5
H₂	92.8 ± 1.0	94.2 ± 1.0
L₃	96.5 ± 1.4	98.6 ± 1.6
M₃	97.8 ± 1.0	95.7 ± 1.2

Kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarında, shRNA'nın % enkapsülasyon etkinliğinin belirlenebilmesi amacı ile gerçekleştirilen çalışmalarda % enkapsülasyon etkinliğinin, 89.7 ± 1.0 ile 98.6 ± 1.6 (L formülasyonlarında; $89.7 - 98.6$, M formülasyonlarında; $89.9 - 95.7$ ve H formülasyonlarında ise $91.7 - 94.2$) değerleri arasında değiştiği saptandı.

Sonuç olarak, tez kapsamında kullanılan yöntem ile istenilen derecede yüksek verim ve enkapsülasyon etkinliği değerlerine sahip kitozan ve pDNA içeren kitozan nanopartiküller elde edildi. Elde edilen sonuçların, yöntem 5.2.8'de belirtildiği şekilde yapılan istatistiksel değerlendirmesi anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

6.4.4. Büyüklük Tayinine İlişkin Bulgular

Nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu saptanması işlemi yöntem 5.2.4.4.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin partikül boyutu ölçüm sonuçları **Tablo 6.4.2.**'de verilmiştir.

Tablo 6.4.2. Nanopartikül formülasyonlarına ait boyut ve yüzey yükü ölçüm sonuçları.

Formülasyonlar	Partikül Büyüklüğü (nm $\pm$ SD)	Yüzey Yükü (mV $\pm$ SD)
L ₁	209.05 $\pm$ 10.71	16.57 $\pm$ 1.4
M ₁	218.87 $\pm$ 11.35	21.10 $\pm$ 1.5
H ₁	236.51 $\pm$ 14.10	20.79 $\pm$ 1.1
L ₂	247.24 $\pm$ 15.65	10.45 $\pm$ 1.7
M ₂	255.78 $\pm$ 11.35	9.68 $\pm$ 1.0
H ₂	272.85 $\pm$ 12.45	8.15 $\pm$ 1.2
L ₃	289.51 $\pm$ 12.65	8.14 $\pm$ 1.0
M ₃	315.60 $\pm$ 10.55	9.11 $\pm$ 1.2

Yapılan ölçümlerde, shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutunun, 209.05 $\pm$ 10.71 nm ile 315.60 $\pm$ 10.55 nm arasında değiştiği saptandı. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında, partikül boyutu üzerinde kullanılan farklı kitozanların molekül ağırlığı ile ilave edilen shRNA miktarının etkili parametreler olduğu belirlendi. Kitozan nanopartikül formülasyonlarında partikül boyutu, kitozan molekül ağırlığı ve ilave edilen shRNA miktarı ile doğru orantılı olarak değişmektedir. (L formülasyonlarında; 209.05 – 289.51 nm, M formülasyonlarında; 218.87 – 315.60 nm ve H formülasyonlarında; 236.51 – 272.85 nm). Partikül boyutu ölçüm sonuçlarının, yöntem 5.2.7.'e göre yapılan istatistiksel analizi anlamlı bulunmuştur (p<0.05).

6.4.5. Yüzey Yük Tayinine İlişkin Bulgular

Kitozan nanopartikül formülasyonlarında, yüzey yük (zeta potansiyel) kontrolü ve ölçümü çalışmaları, yöntem 5.2.4.5.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. shRNA içeren kitozan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin, partikül net yüzey yükü ölçüm sonuçlarına ilişkin değerler Bulgular 6.4.4.'de yer alan **Tablo 6.4.2.**'de verilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarında yüzeyel yük ölçümleri, üç farklı molekül ağırlığındaki kitozan tiplerinde yapıldı. Kullanılan yöntem ile hazırlanan, shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının tamamında, yüzey yük değerlerinin pozitif (+) değer aralığında 8.14 ± 1.0 mV ile 24.01 ± 1.2 mV arasında değiştiği saptandı.

6.4.6. İn Vitro Stabilite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

İn vitro stabilitenin incelenmesi amacı ile yöntem 5.2.4.6.'da belirtildiği şekilde $+4^{\circ}\text{C}$ ve 37°C 'da bekletilen nanopartikül formülasyonlarında partikül büyüklüğü ve yüzey yükünün belirlenmesi çalışmaları yöntem 5.2.4.4. ve 5.2.4.5'e göre yapıldı. 3.ay sonrası partikül büyüklüğü ve yüzey yükü ölçüm değerleri **Tablo 6.4.3.**'de verilmiştir.

Tablo 6.4.3. 3.ay in vitro stabilite çalışması sonuçları.

	Partikül Büyüklüğü (nm $\pm$ SD)		
KOD	Başlangıç	$+4^{\circ}\text{C}$	37°
L₁	209.05 ± 10.71	210.11 ± 12.15	214.12 ± 10.45
M₁	218.87 ± 11.35	214.52 ± 10.24	218.57 ± 12.30
H₁	236.51 ± 14.10	231.54 ± 12.35	235.61 ± 14.10
L₂	247.24 ± 15.65	248.61 ± 12.10	250.16 ± 10.31
M₂	255.78 ± 11.35	250.20 ± 14.75	247.18 ± 12.75
H₂	272.85 ± 12.45	269.71 ± 10.15	270.11 ± 14.52
L₃	289.51 ± 12.65	290.18 ± 12.55	287.25 ± 11.15
M₃	315.60 ± 10.55	311.66 ± 14.50	308.58 ± 12.95
	Partikül Yüzey Yükü (mV $\pm$ SD)		
L₁	16.57 ± 1.4	18.22 ± 1.2	17.15 ± 1.0
M₁	21.10 ± 1.5	20.15 ± 1.7	19.54 ± 1.1
H₁	20.79 ± 1.1	21.10 ± 1.2	20.52 ± 1.1
L₂	10.45 ± 1.7	11.20 ± 1.5	10.45 ± 1.2
M₂	9.68 ± 1.0	10.05 ± 1.4	9.30 ± 1.0
H₂	8.15 ± 1.2	9.50 ± 1.1	9.10 ± 1.1
L₃	8.14 ± 1.0	8.66 ± 1.4	9.05 ± 1.2
M₃	9.11 ± 1.2	10.30 ± 1.7	10.00 ± 1.5

Nanopartikül formülasyonlarının in vitro stabilitesinin incelenmesi çalışmalarında; 3. ay sonunda partikül büyüklüğü ve yüzey yükü ölçüm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümlerde; +4°C’da bekletilen örneklerde partikül boyutunun, 210.11 ± 12.51 nm ile 311.66 ± 14.50 nm, 37°C’da bekletilen örneklerde ise 214.12 ± 10.45 nm ile 308.58 ± 12.95 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Nanopartikül formülasyonlarında yüzeyel yük ölçümleri ise +4°C’da bekletilen örneklerde 8.66 ± 1.4 mV ile 21.10 ± 1.2 mV, 37°C’da bekletilen örneklerde ise 9.05 ± 1.2 mV ile 20.52 ± 1.1 mV olarak elde edilmiştir.

3.ay in vitro stabilite çalışması sonrası elde edilen partikül boyutu ve yüzey yükü ölçüm değerlerinin başlangıç değerleri ile anlamlı bir farklılık göstermediği yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu saptanmıştır ($p>0.05$).

İn vitro stabilite çalışması yapılan nanopartikül formülasyonlarında ayrıca 1., 2. ve 3. aylarda in vitro salım çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

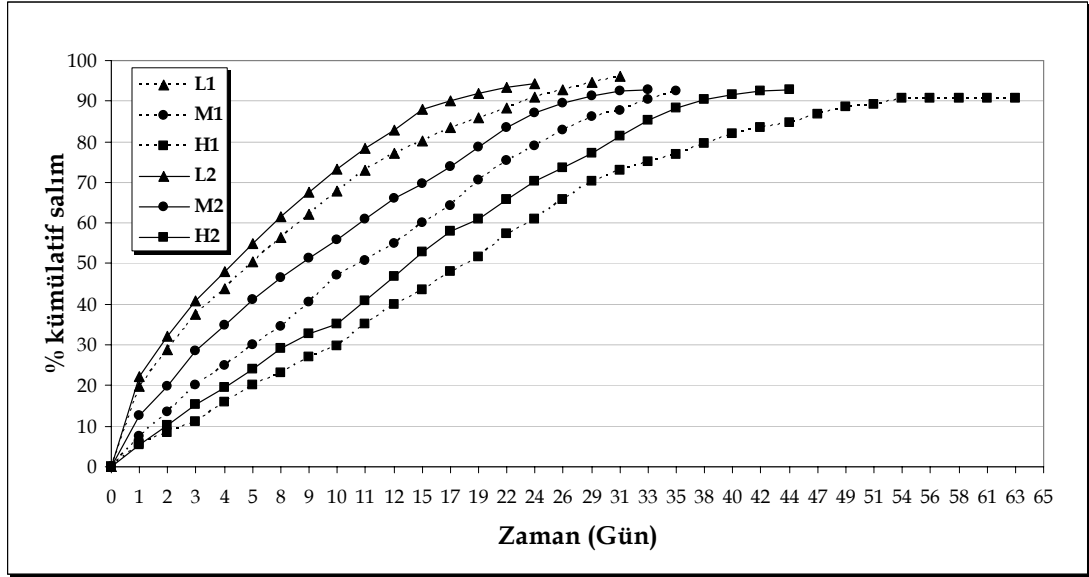
6.4.7. İn Vitro Salım Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Tez kapsamında hazırlanan shRNA içeren kitozan nanopartikül formülasyonlarından shRNA’nın in vitro salım çalışmaları, yöntem 5.2.4.7.’da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. İn vitro salım çalışması sonrası serbestleşen shRNA, yöntem 5.2.1.4.’de belirtildiği şekilde spektrofotometrik ve elektroforetik olarak incelendi.

Formülasyon sonrası başlangıç ve in vitro stabilite çalışmalarına (+4°C ve 37°C’da 1., 2. ve 3. ay) ilişkin in vitro shRNA salım profilleri, **Şekil 6.4.1., 6.4.2., 6.4.3., 6.4.4., 6.4.5., 6.4.6. ve Şekil 6.4.7.’**de verilmiştir.

Şekil 6.4.1.’de de görüldüğü gibi hazırlanan nanopartikül formülasyonları ile 2 ay süresince kontrollü bir salım profili elde edilmiştir. Formülasyonlardan shRNA’nın in vitro salımında kullanılan kitozanın molekül ağırlığı etkili bir parametredir. Düşük molekül ağırlıklı kitozan (70 kD) kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan shRNA’nın salımı orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitozan (400

kD ve 750kD) kullanılarak hazırlanan formülasyonlara kıyasla daha hızlı ve kısa sürede gerçekleşmektedir. Düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılan L_1 ve L_2 formülasyonlarında salım 25-30, orta molekül ağırlıklı kitozan kullanılan M_1 ve M_2 formülasyonlarında salım 35-40 ve yüksek molekül ağırlıklı kitozan kullanılan H_1 ve H_2 formülasyonlarında ise 50-65 gün arasında tamamlanmaktadır.

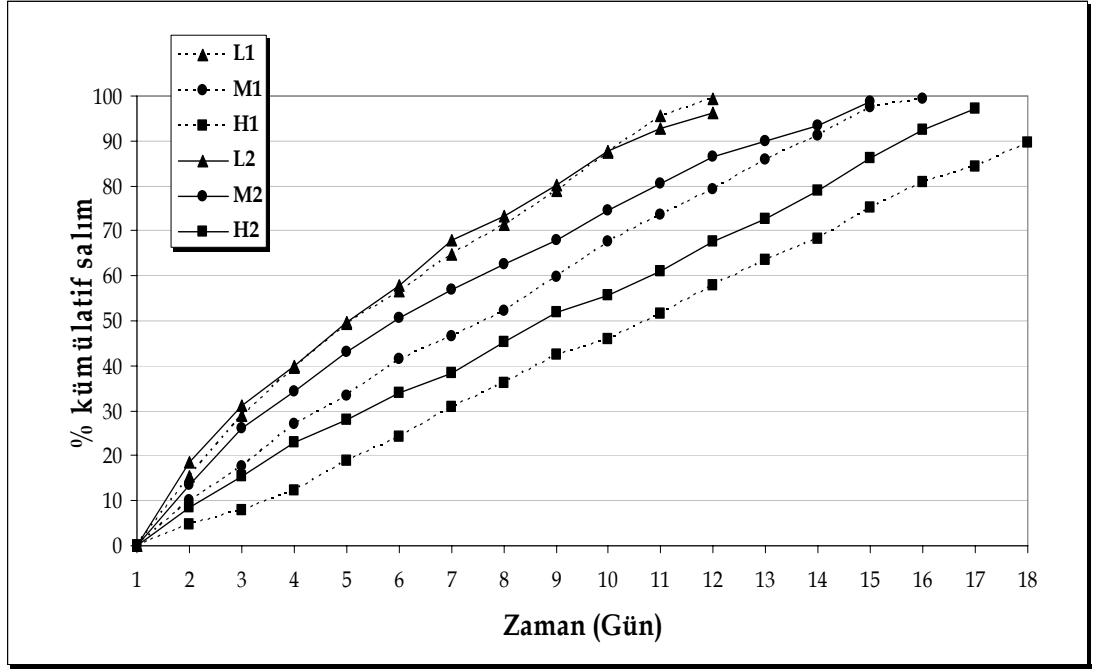


Şekil 6.4.1. Kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarından shRNA'nın in vitro salım profili.

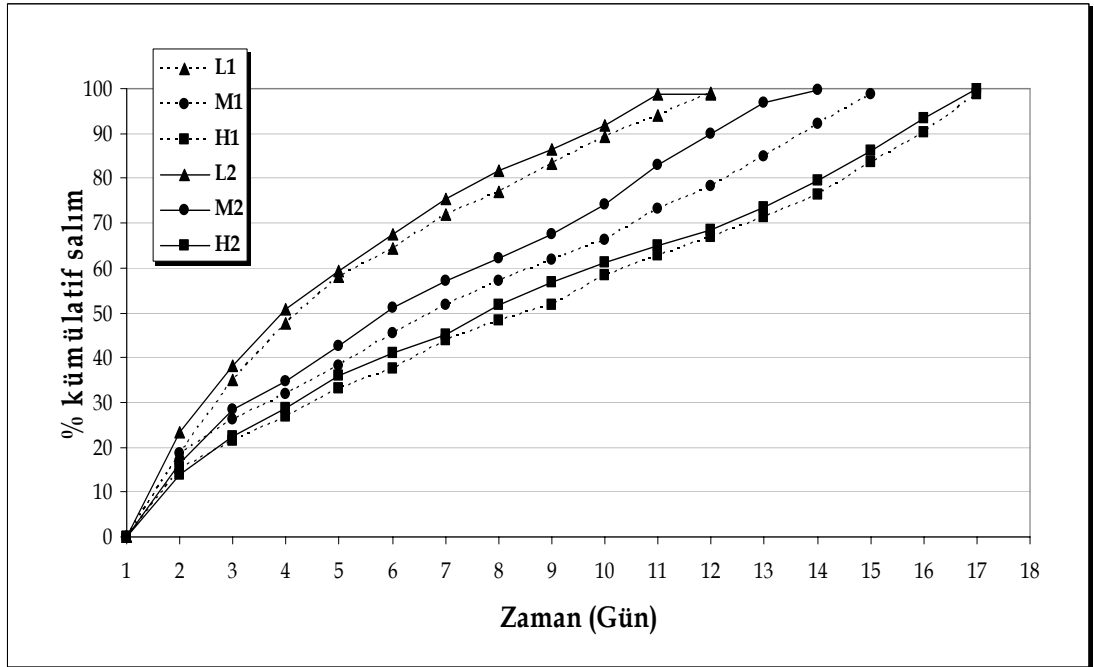
Nanopartiküllerden shRNA salımında kitozanın molekül ağırlığı kadar ilave edilen shRNA miktarı da önemli bir parametredir. shRNA salımı formülasyonda kullanılan shRNA miktarı ile doğru orantılı olacak şekilde artmaktadır.

İn vitro salım profilinde, ilk günlerde bir patlama etkisi (burst-effect) gözlenmiştir (%10-20). Nanopartiküllerden shRNA salımı uzun süreli ve kontrollü bir şekilde devam etmiştir.

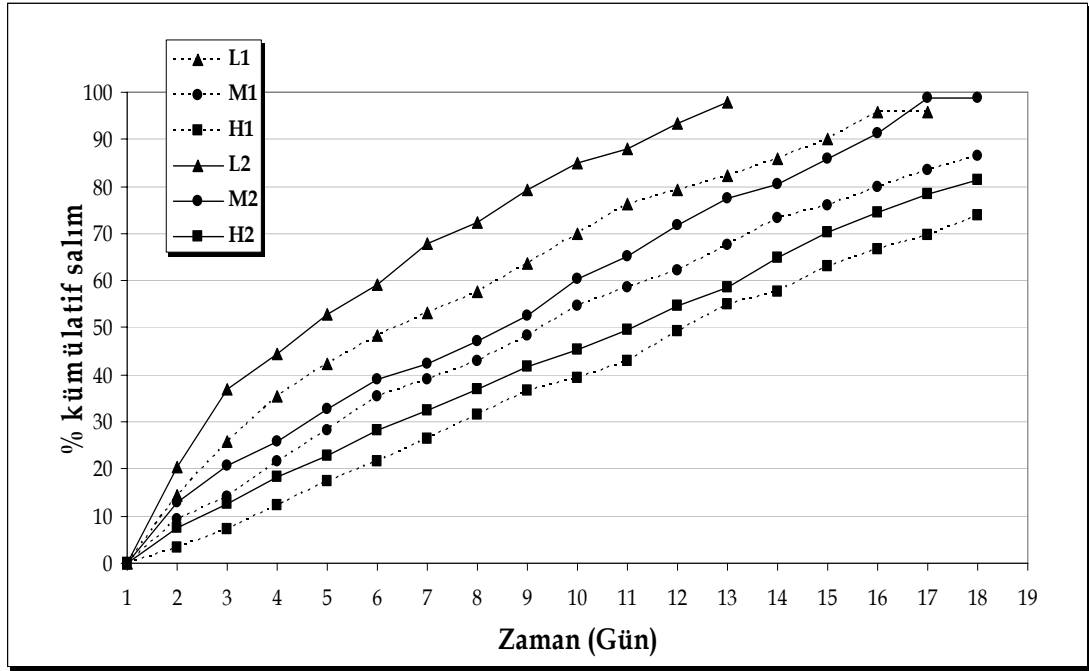
Şekil 6.4.2., 6.4.4. ve 6.4.6.'da +4°C'da, Şekil 6.4.3., 6.4.5. ve 6.4.7.'de ise 37°C'de gerçekleştirilen in vitro stabilite çalışmalarına ait 1., 2. ve 3. ay in vitro shRNA salım profilleri verilmiştir.



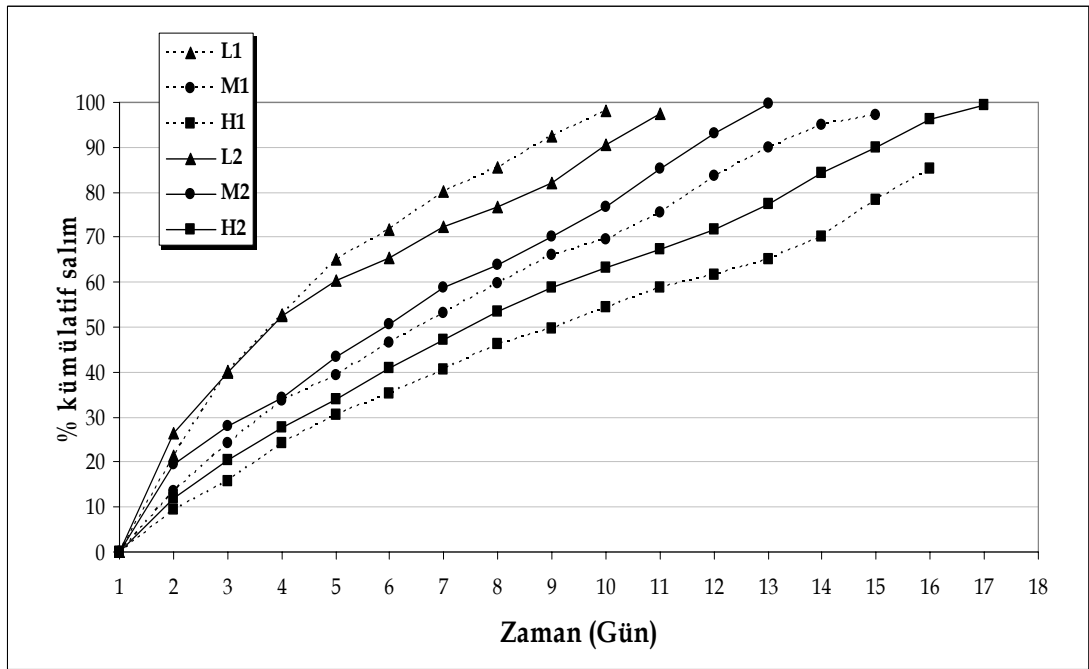
Şekil 6.4.2. +4°C’da gerçekleştirilen stabilite çalışması 1. ay sonu shRNA salım profili.



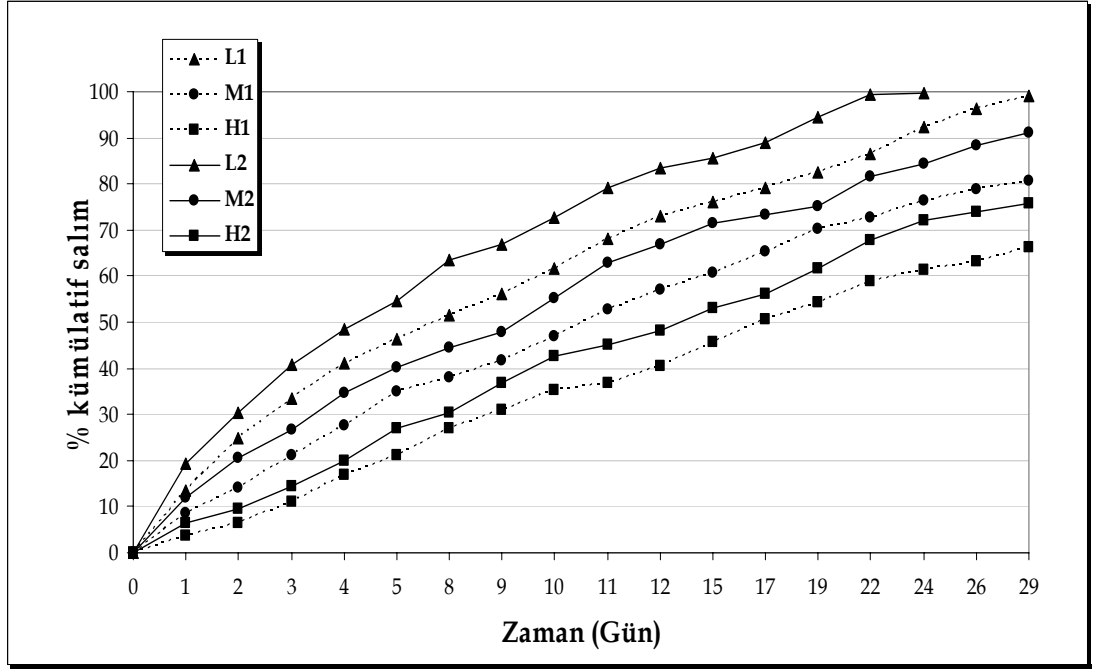
Şekil 6.4.3. 37°C’da gerçekleştirilen stabilite çalışması 1. ay sonu shRNA salım profili.



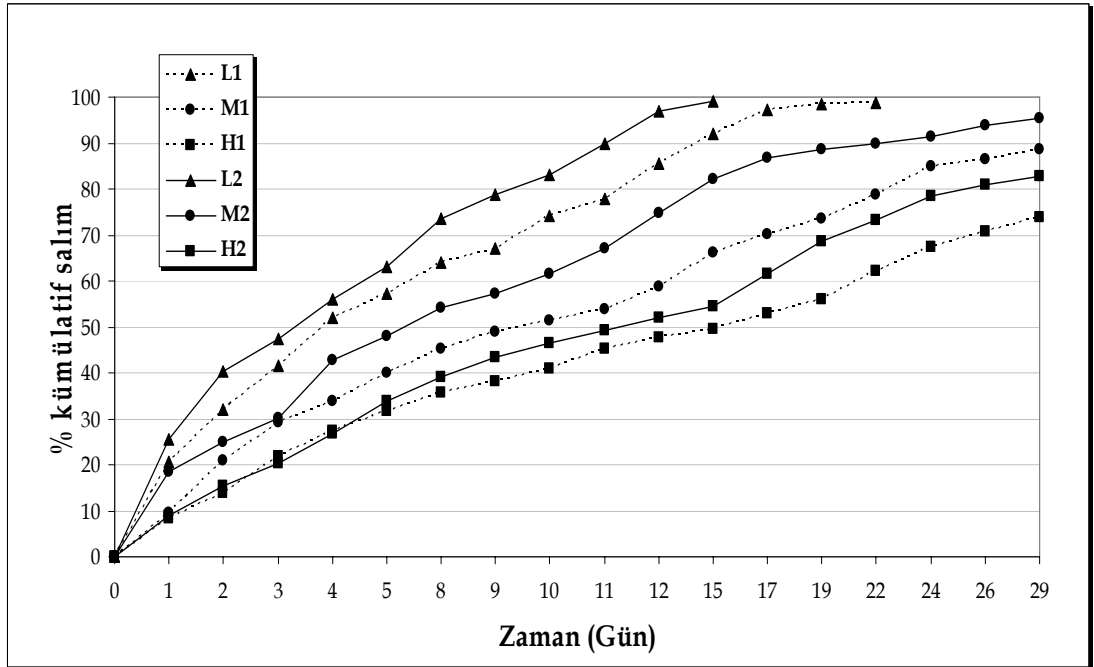
Şekil 6.4.4. +4°C’da gerçekleştirilen stabilite çalışması 2. ay sonu shRNA salım profili.



Şekil 6.4.5. 37°C’da gerçekleştirilen stabilite çalışması 2. ay sonu shRNA salım profili.

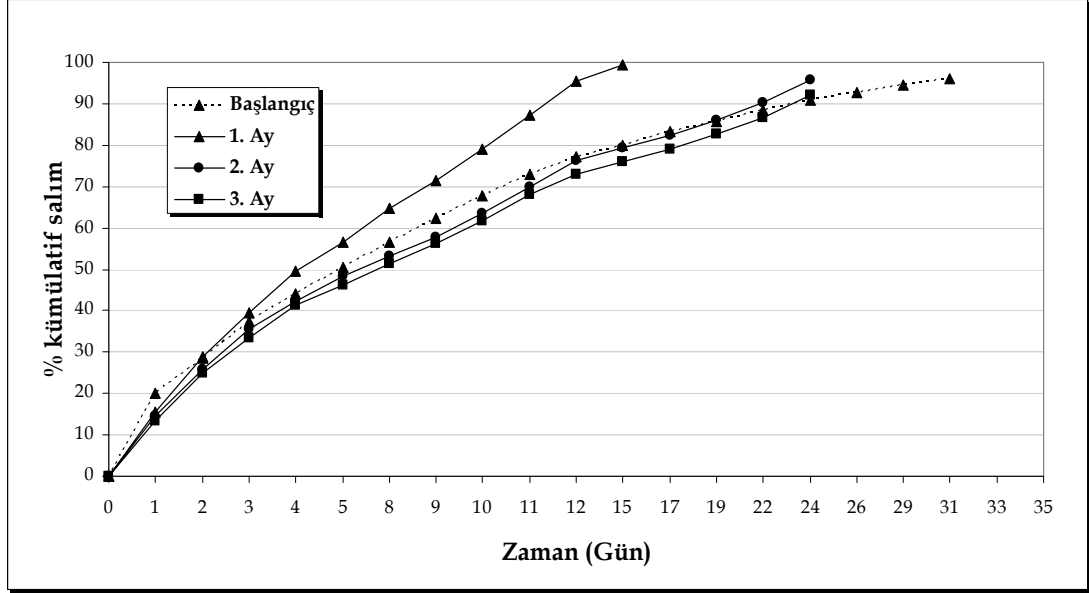


Şekil 6.4.6. +4°C’da gerçekleştirilen stabilite çalışması 3. ay sonu shRNA salım profili.

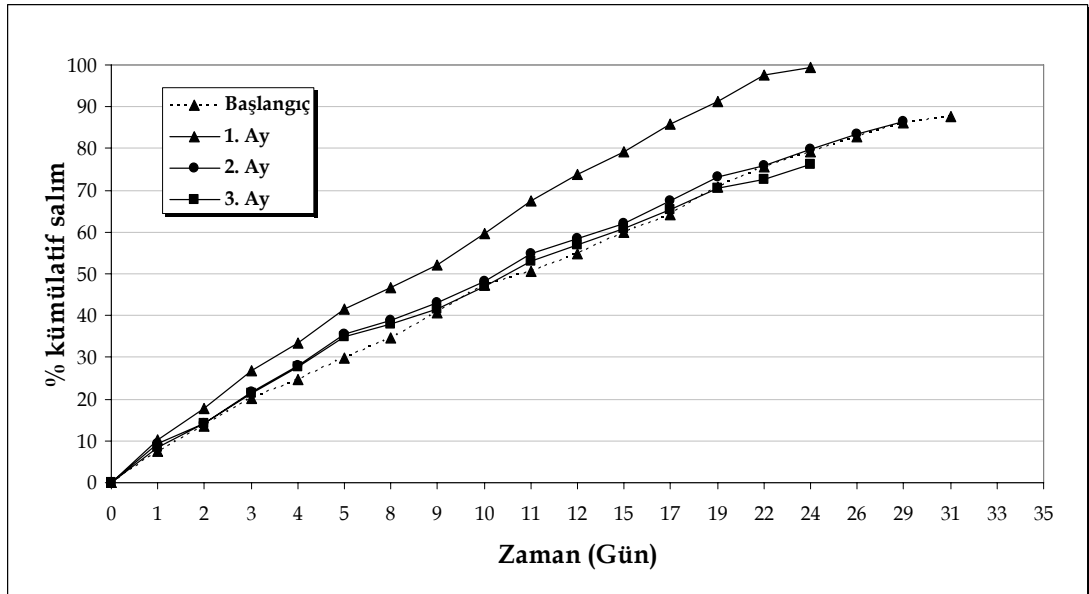


Şekil 6.4.7. 37°C’da gerçekleştirilen stabilite çalışması 3. ay sonu shRNA salım profili.

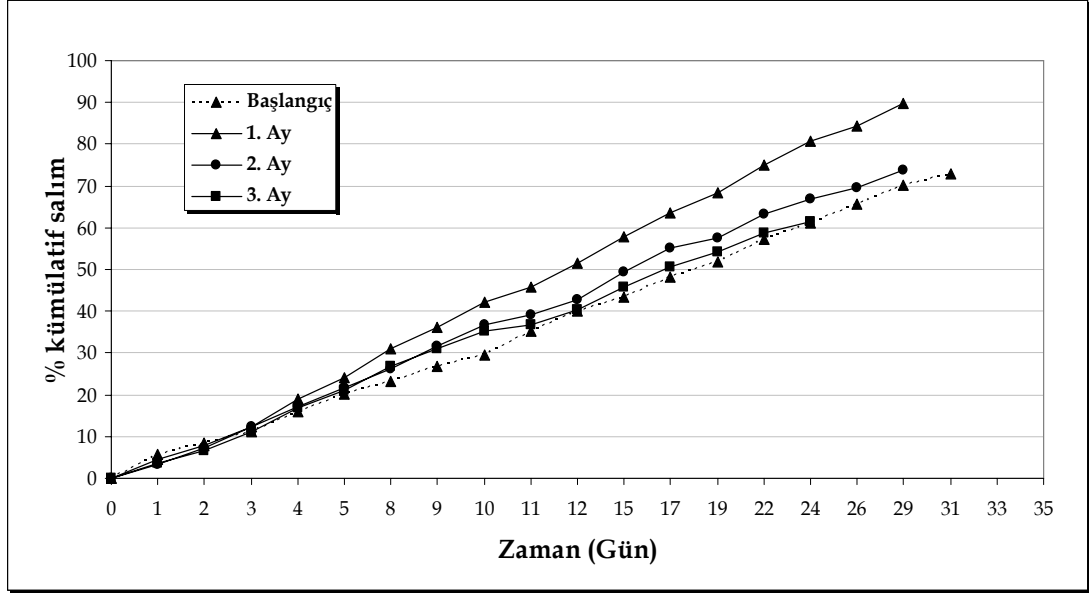
Şekil 6.4.8., 6.4.9., 6.4.10., 6.4.11., 6.4.12. ve 6.4.13.' de +4°C'da gerçekleştirilen stabilite çalışmasına ilişkin in vitro salım profilleri verilmiştir.



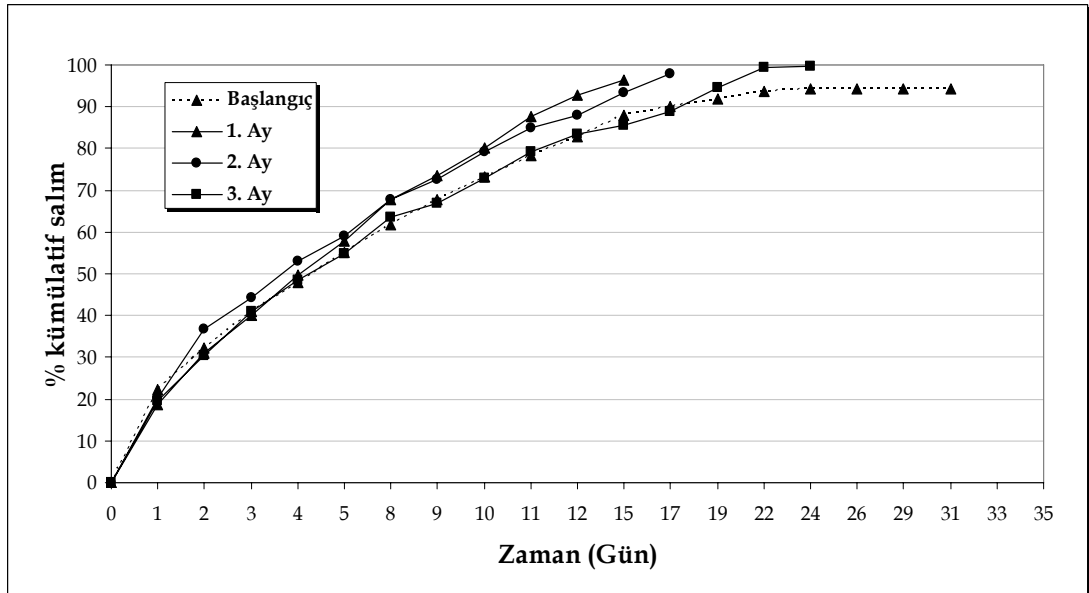
Şekil 6.4.8. L₁ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).



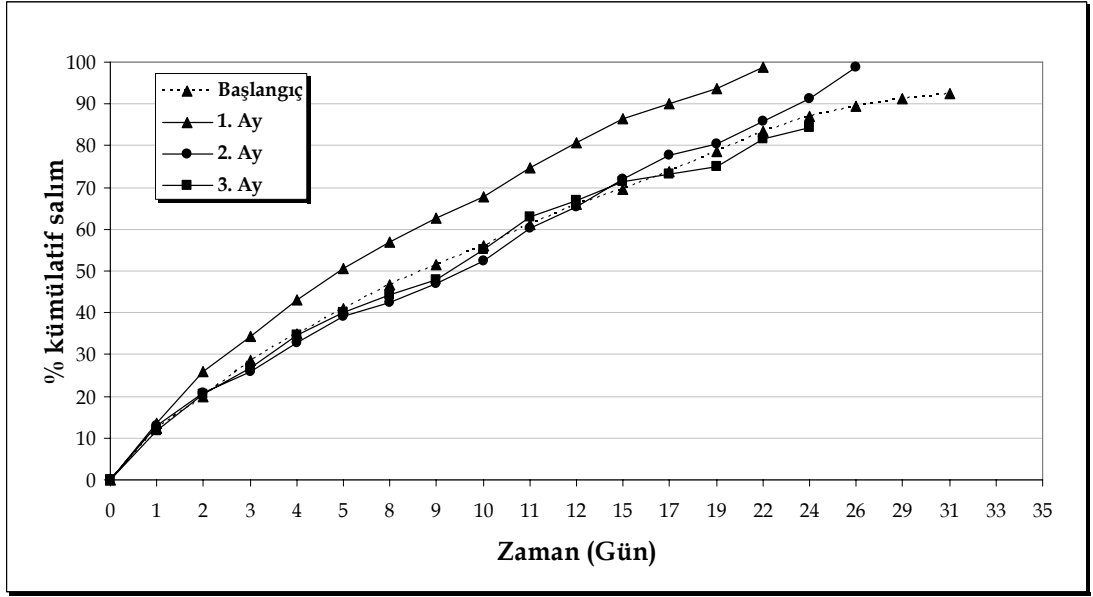
Şekil 6.4.9. M₁ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).



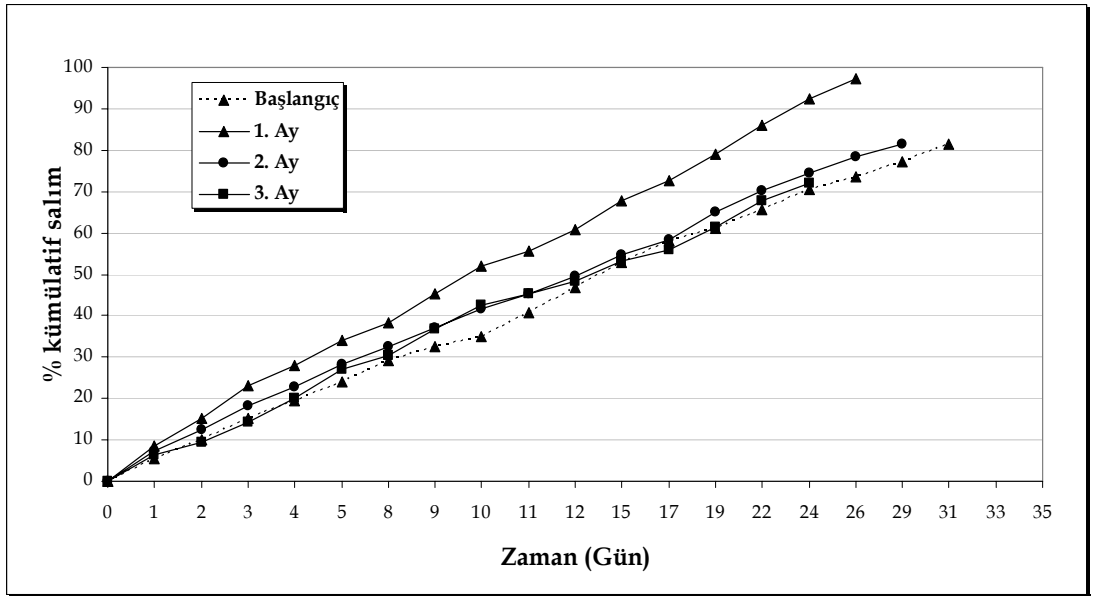
Şekil 6.4.10. H₁ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).



Şekil 6.4.11. L₂ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

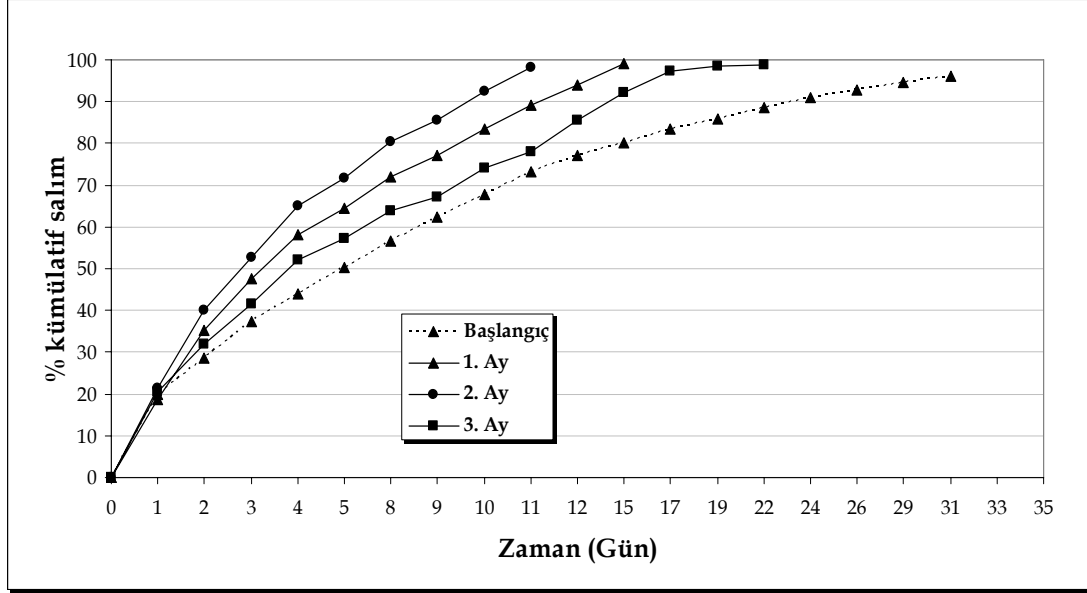


Şekil 6.4.12. M₂ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

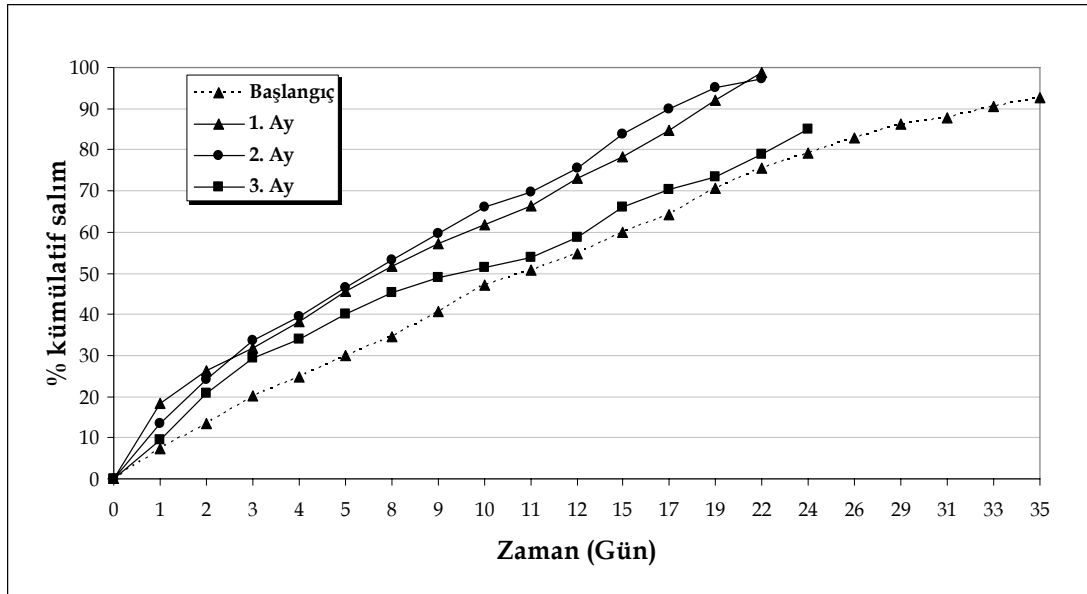


Şekil 6.4.13. H₂ formülasyonundan in vitro salım profili (+4°C).

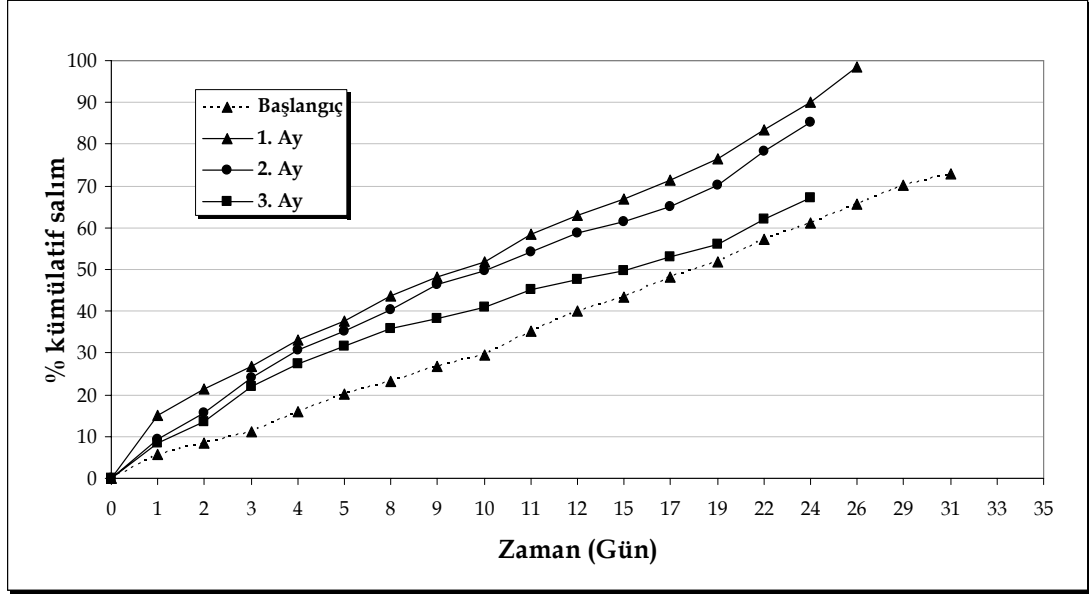
Şekil 6.4.14., 6.4.15., 6.4.16., 6.4.17., 6.4.18. ve 6.4.19.' de 37°C'da gerçekleştirilen stabilite çalışmasına ilişkin in vitro salım profilleri verilmiştir.



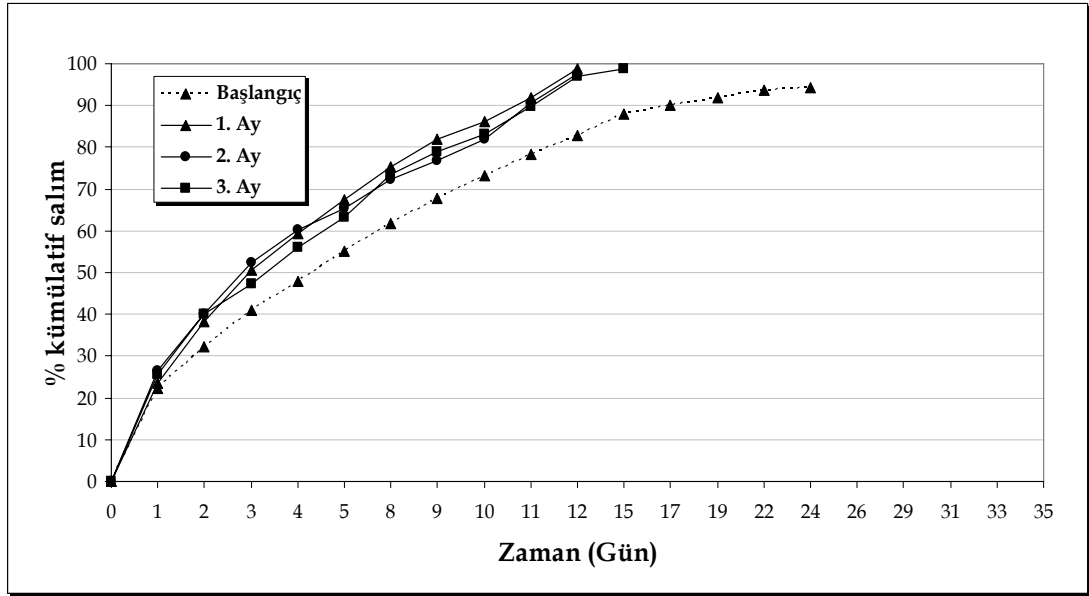
Şekil 6.4.14. L₁ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).



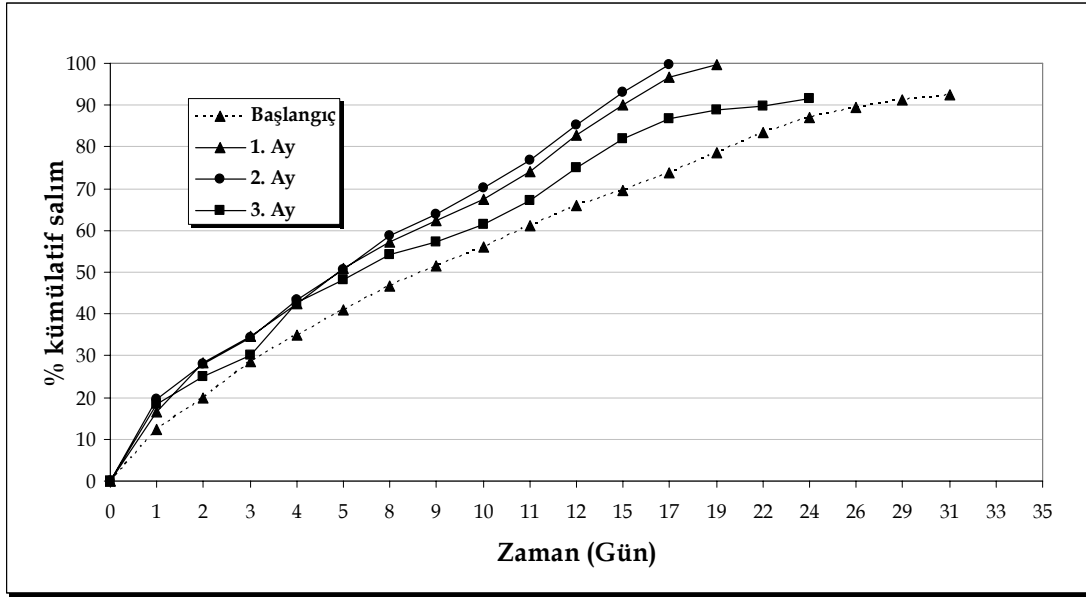
Şekil 6.4.15. M₁ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).



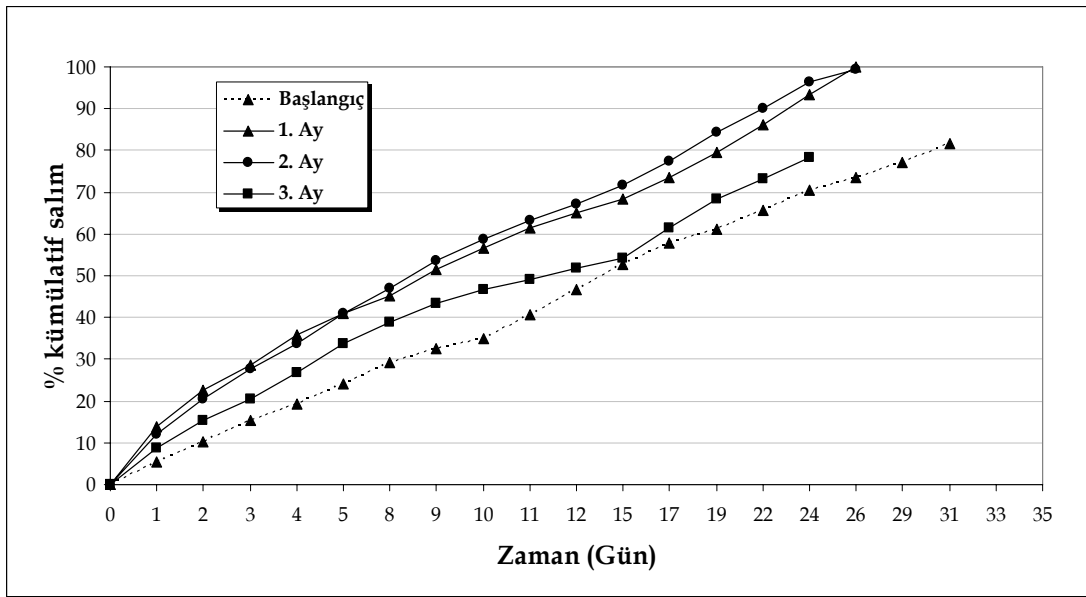
Şekil 6.4.16. H₁ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).



Şekil 6.4.17. L₂ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).



Şekil 6.4.18. M₂ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).

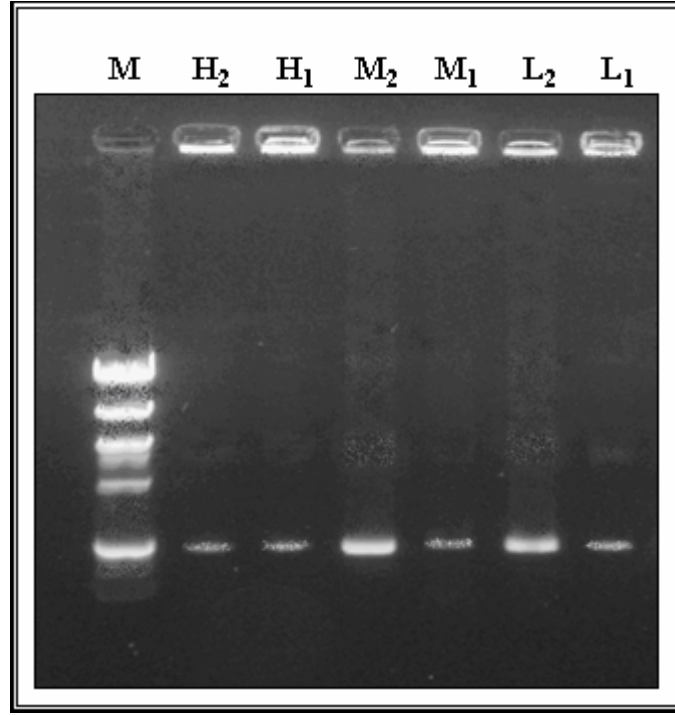


Şekil 6.4.19. H₂ formülasyonundan in vitro salım profili (37°C).

İn vitro stabilite ve in vitro salım çalışmaları sonucunda +4°C'da 3 ay süre ile bekletilen nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, yüzey yük değerleri ve in vitro salım profillerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır ($p>0.05$). Nanopartikül formülasyonları +4°C'da stabildir. 37°C'da bekletilen formülasyonlarda ise partikül boyutu ve yüzey yük değerleri anlamlı düzeyde

değişmemiştir ($p>0.05$). Ancak formülasyonların *in vitro* salım profillerinde salımı hızlandırıcı yönde bir artış söz konusudur.. Salım hızı artmış ve buna bağlı olarak salım süresi kısalmıştır ($p<0.05$).

Kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarından shRNA'nın, *in vitro* salım çalışmalarında yöntem 5.2.1.4.'de belirtildiği şekilde spektrofotometrik olarak incelenen ve serbestleşen shRNA miktarı tayin edilen örnekler, aynı zamanda elektroforetik olarak da incelendi. Serbestleşen shRNA'nın elektroforetik olarak incelenmesine ilişkin agaroz jel fotoğrafı, **Resim 6.4.5.**'de verilmiştir.



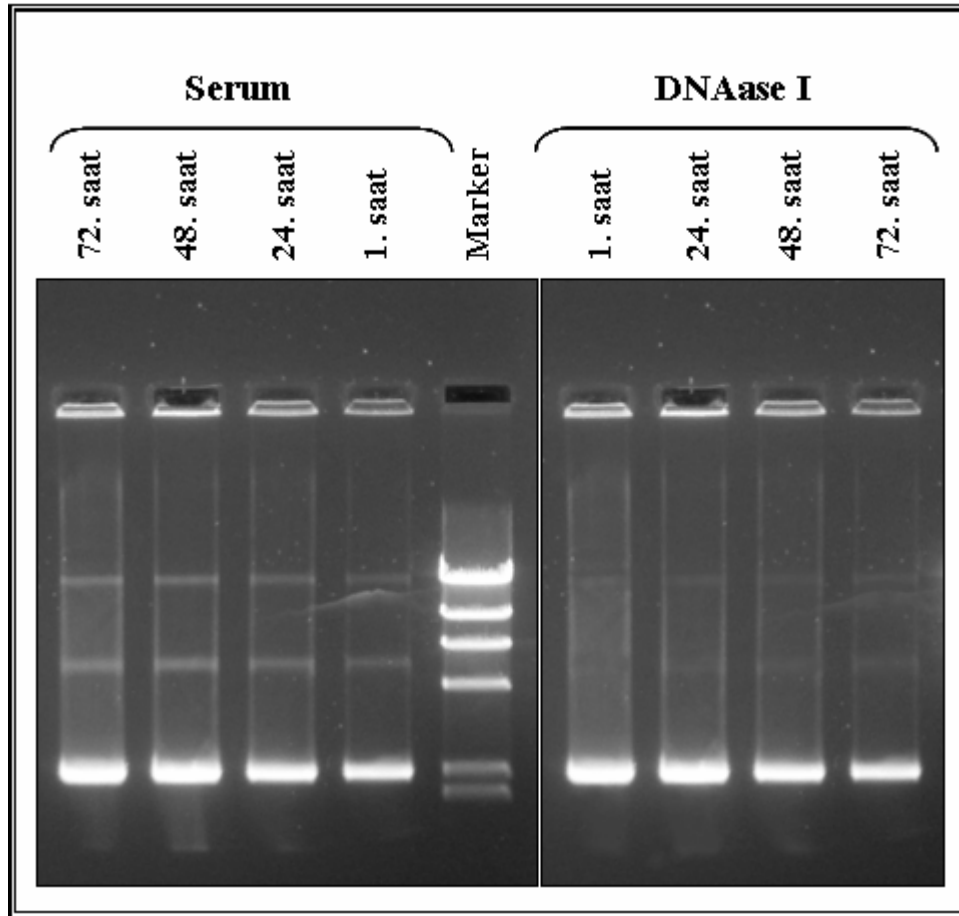
Resim 6.4.5. Nanopartikül formülasyonlarından serbestleşen shRNA'ya ait agaroz jel resmi.

Yöntem 5.2.3.1.'de belirtildiği şekilde agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılarak incelenen *in vitro* serbestleşen shRNA örneklerinde; kitozan nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması, santrifüjasyon, liyofilizasyon ve *in vitro* salım çalışmaları sonrasında, formülasyona ilave edilen shRNA'da yapısal form olarak herhangi bir değişimin meydana gelmediği saptandı. *In vitro* salım çalışmalarında serbestleşen shRNA'nın, yapısal olarak başlangıçtaki (shRNA izolasyonu sonrası) % 100 kapalı halkasal (süper sarmal) formunu muhafaza ettiği ve

in vitro salım çalışmaları esnasında serbestleşen shRNA'da, kompleks oluşumunun söz konusu olmadığı tesbit edildi.

6.4.8. Serum Stabilitesi Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının serum, stabilitesi çalışmaları yöntem 5.2.4.8.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Serum uygulamasından sonra, steril pH 7.4 PBS tamponu ile yıkanan ve santrifüj edilerek çöktürülen nanopartiküller *in vitro* hızlandırılmış shRNA salım çalışmasına tabi tutuldu. Serum muamelesi sonrasında nanopartikül formülasyonlarından serbestleşen shRNA, yöntem 5.2.1.4.'de belirtildiği şekilde spektrofotometrik ve elektroforetik olarak incelendi. Nanopartikül formülasyonlarına ait serum stabilitesi çalışmasına ilişkin elektroforetik inceleme sonuçları, **Resim 6.4.6.**'da verilmiştir.



Resim 6.4.6. Serum ve Nükleaz muamelesi sonrasında kitozan nanopartikül formülasyonlarından serbestleşen shRNA'ya ait agaroz jel fotoğrafı.

İnaktive edilmemiş fetal bovin serum ile muamele edilen kitozan nanopartikül formülasyonlarında; zamana (1., 24., 48. ve 72. saat) ve serum oranına (10 µg shRNA içeren nanopartikül/ml serum ve 10 µg shRNA içeren nanopartikül/10 ml serum) bağlı herhangi bir degradasyon gözlenmedi. shRNA'nın serum ve serum bileşenlerinin enzimatik aktivitesinden 72 saat süresince korunduğu tesbit edildi.

6.4.9. Nükleaz Stabilitesi Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Kitozan nanopartikül formülasyonlarında nükleaz stabilitesi çalışmaları, yöntem 5.2.4.9.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Nükleaz (DNAaz I) enzimi ile muamelesi sonrasında enzimatik reaksiyon durduruldu, nanopartiküller pH 7.4 PBS tamponu ilavesi ile en az 3 kez yıkandı ve hızlandırılmış *in vitro* salım çalışmasına alındı. Serbestleşen shRNA, yöntem 5.2.1.4.'de belirtildiği şekilde spektrofotometrik ve elektroforetik olarak incelendi. Formülasyonlarının nükleaz stabilitesi çalışmasına ait agaroz jel fotoğrafı, Bulgular 6.4.8.'de yer alan **Resim 6.4.6.**'da verilmiştir.

Nükleaz (DNAaz I) stabilitesi çalışmalarında; inkübasyon ortamından 1., 24., 48. ve 72. saatlerde alınan numunelerde, zamana bağlı shRNA degradasyonu saptanmadı. Kitozan nanopartikül formülasyonlarında shRNA'nın, 72 saat süresince nükleaz (DNAaz I) cinsi enzimlerin enzimatik aktivitesinden korunduğu tesbit edildi.

6.5. In Vitro Transfeksiyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

HEK293, HeLa ve MCF-7 hücre kültürlerinde, psiRNA-VEGF taşıyan kitozan ve protamin komplekslerinin in vitro transfeksiyon çalışmaları, yöntem 5.2.5.6.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kitozan ve protamin komplekslerinin in vitro transfeksiyon etkinliği ve in vitro VEGF gen ekspresyonu yöntem 5.2.5.7.'de belirtildiği şekilde tayin edildi.

6.5.1. Kompleksler İle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA nanopleks formülasyonları ile in vitro transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Ayrıca tez

kapsamında kullanılan polimerler ile hazırlanan formülasyonların sitotoksitesisi yöntem 5.2.7.'de belirtildiği şekilde araştırıldı.

6.5.2. Nanopartiküller İle Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmalarına İlişkin Bulgular

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları 3 farklı hücre hattında in vitro transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirildi. İn vitro transfeksiyon çalışmaları kapsamında nanopleksler ile gerçekleştirilen sitotoksitenin belirlenmesine yönelik çalışmalara paralel olarak shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile de yöntem 5.2.7.'de belirtildiği şekilde sitotoksite çalışmaları yapılmıştır.

6.6. İn Vitro Gen İnhibisyonunun Tayinine İlişkin Bulgular

İn vitro VEGF gen inhibisyonunun tayini çalışmaları yöntem 5.2.6.'da belirtildiği şekilde kalitatif ve kantitatif olmak üzere her iki yöntem ile de tayin edilmiştir.

6.6.1. Floresan Mikroskopu İncelemelerine İlişkin Bulgular

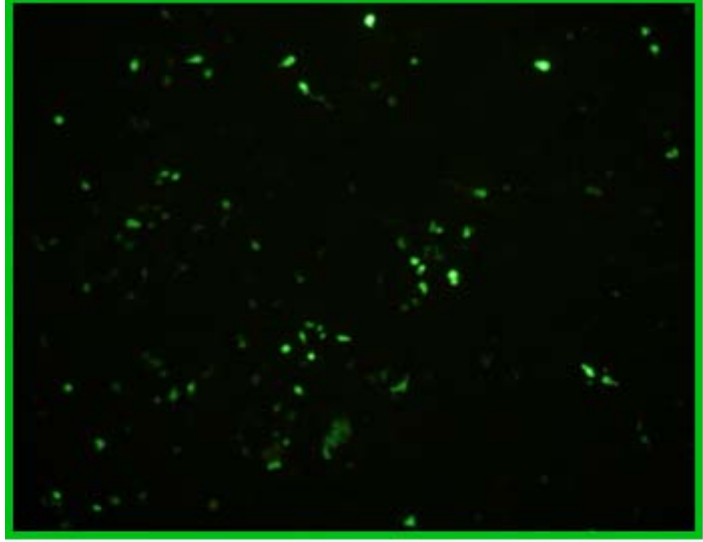
İn vitro transfeksiyon çalışmalarında VEGF gen inhibisyonu kalitatif olarak yöntem 5.2.6.1.'de belirtildiği şekilde floresan mikroskopu incelemeleri ile saptanmıştır.

Floresan mikroskopu çalışmalarında shRNA yapısında bulunan GFP seleksiyon marker geninden yararlanılmıştır. Nanopleks formülasyonları ile üç farklı hücre hattında gerçekleştirilen in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskopu görüntüleri **Resim 6.6.1.**, **6.6.2.**, **6.6.3.**, **6.6.4.** ve **Resim 6.6.5.**'de verilmiştir.

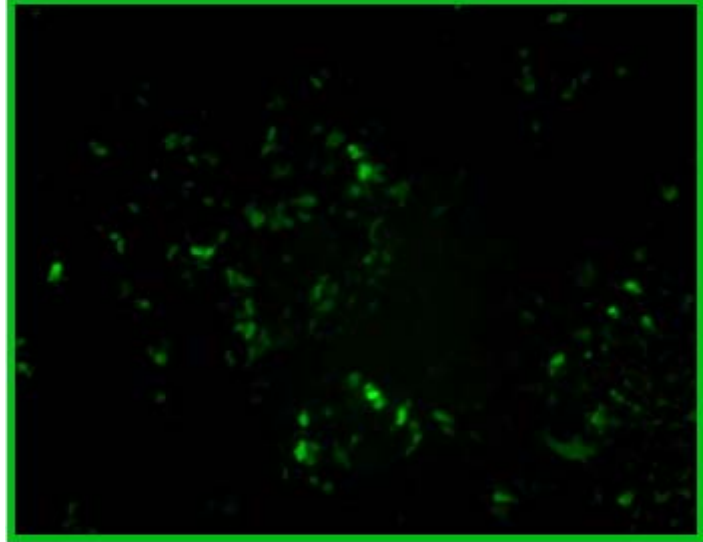
Nanopleksler ile gerçekleştirilen çalışmalara paralel olacak şekilde shRNA içeren nanopartikül formülasyonları ile de aynı çalışma yapılmıştır. Nanopartikül formülasyonları ile HEK293 hücre hattında gerçekleştirilen in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskopu görüntüleri **Resim 6.6.6.**'da verilmiştir.

**Protamin/shRNA
(0.5/1.0)**

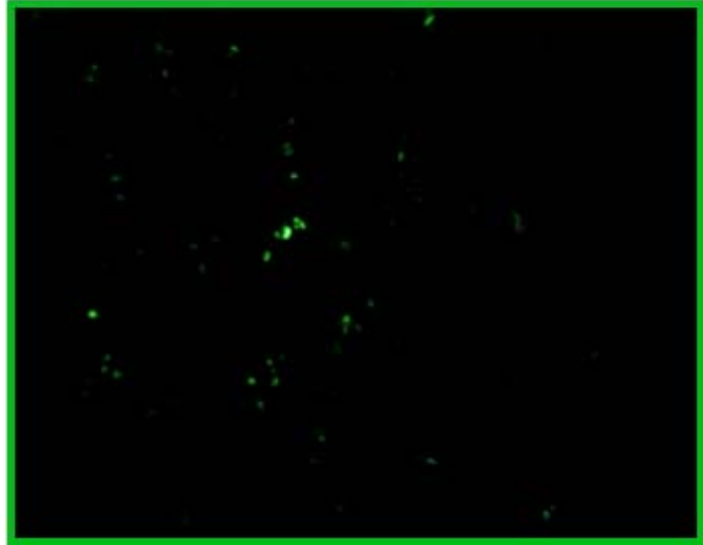
HEK293



HeLa



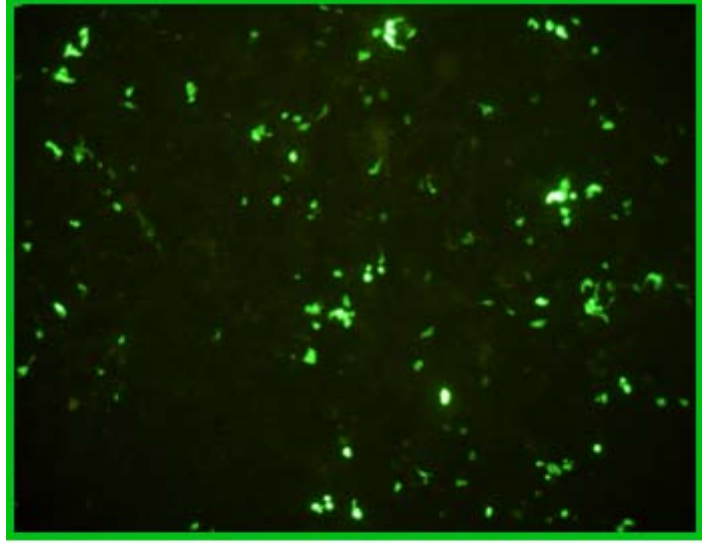
MCF-7



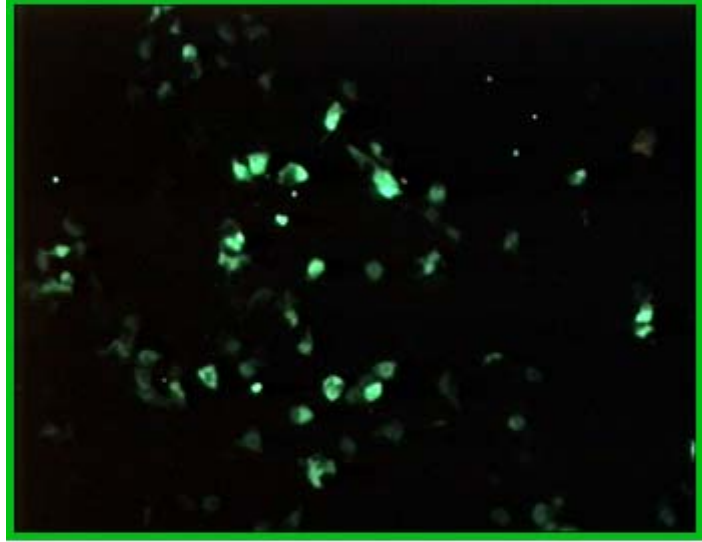
Resim 6.6.1. 0.5/1 (a/a) oranında protamin/shRNA kompleksleri ile farklı hücre tiplerinde in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

**Protamin/shRNA
(1.0/1.0)**

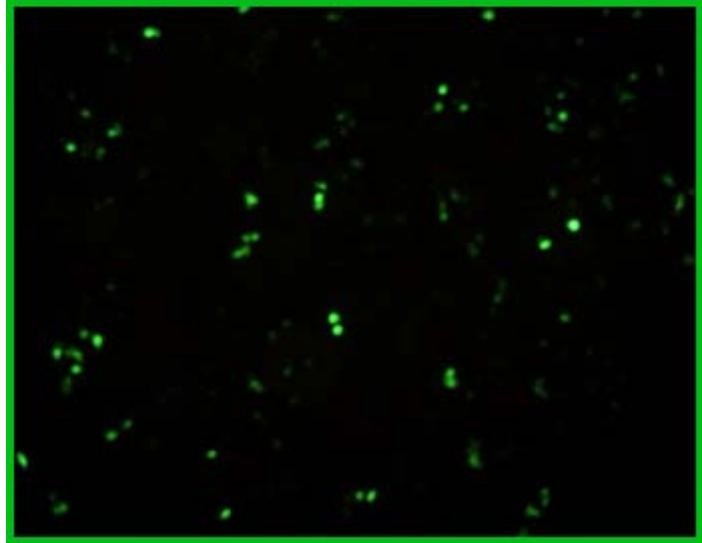
HEK293



HeLa



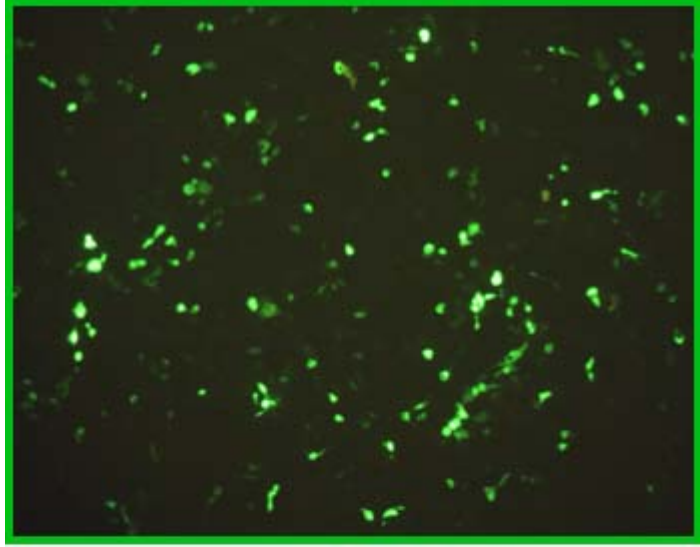
MCF-7



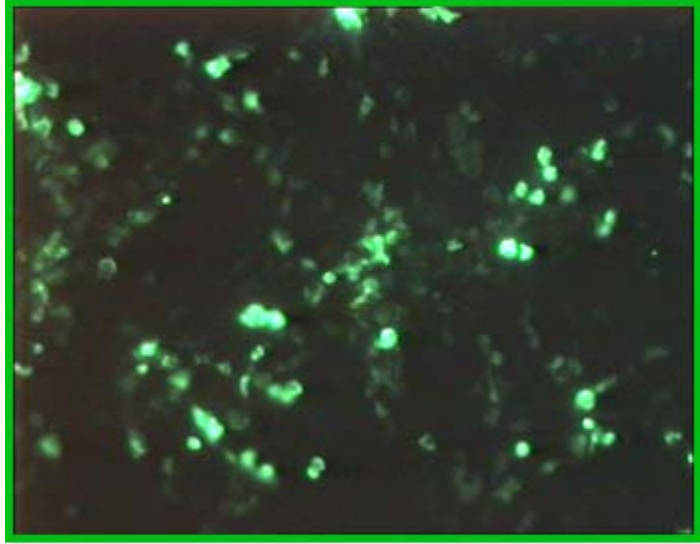
Resim 6.6.2. 1/1 (a/a) oranında protamin/shRNA kompleksleri ile farklı hücre tiplerinde in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

**Protamin/shRNA
(2.0/1.0)**

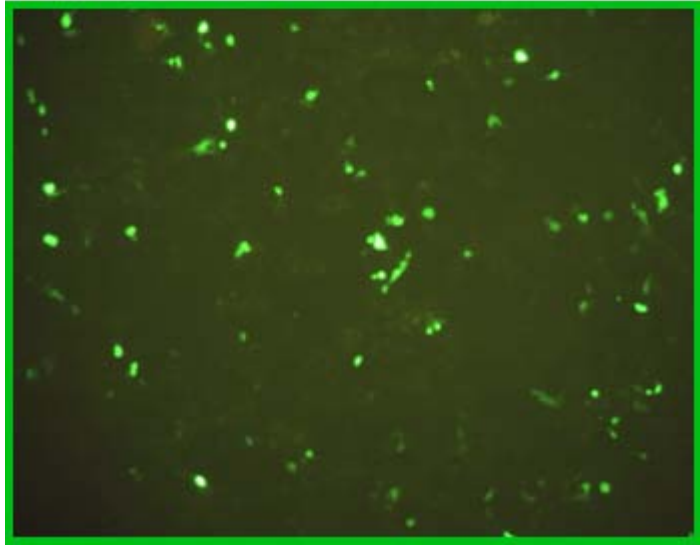
HEK293



HeLa

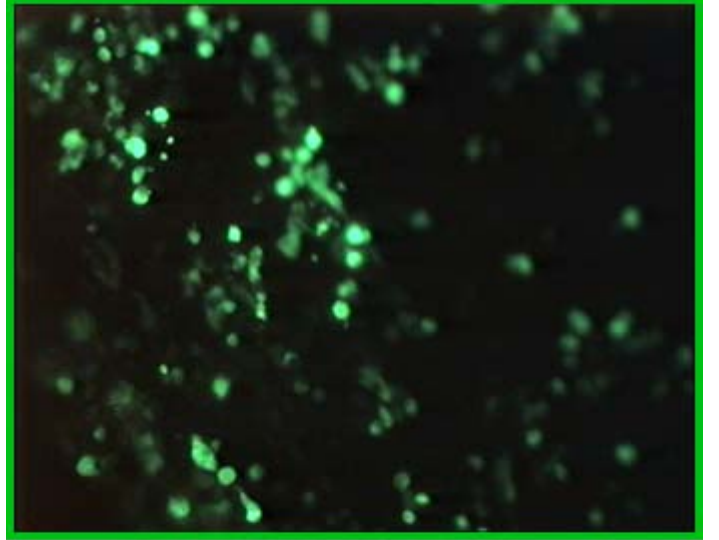


MCF-7

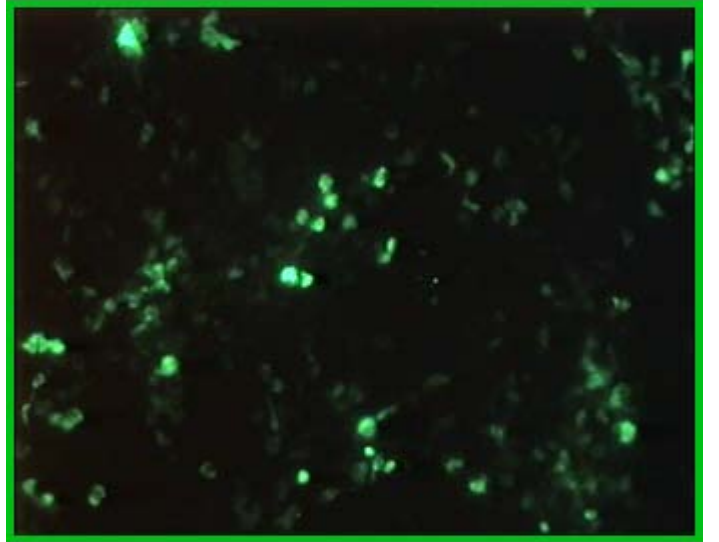


Resim 6.6.3. 2/1 (a/a) oranında protamin/shRNA kompleksleri ile farklı hücre tiplerinde in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

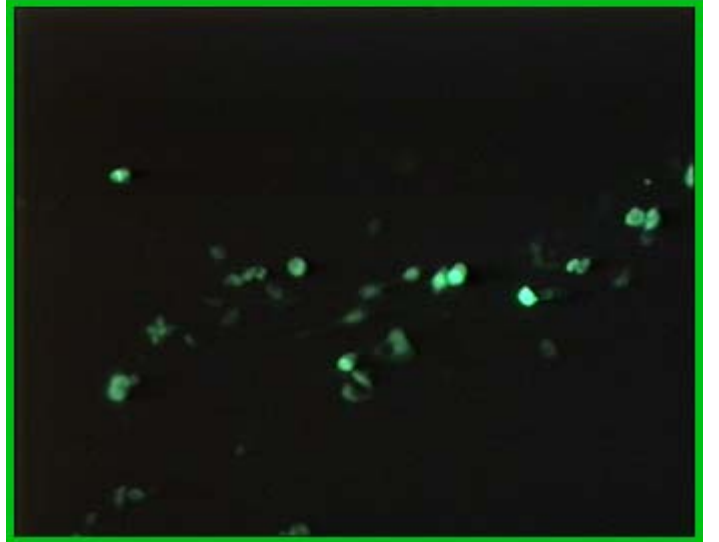
**Kitozan/protamin/shRNA
(0.5/1.0/1.0)**



HEK293 (Kitozan, 70kD)



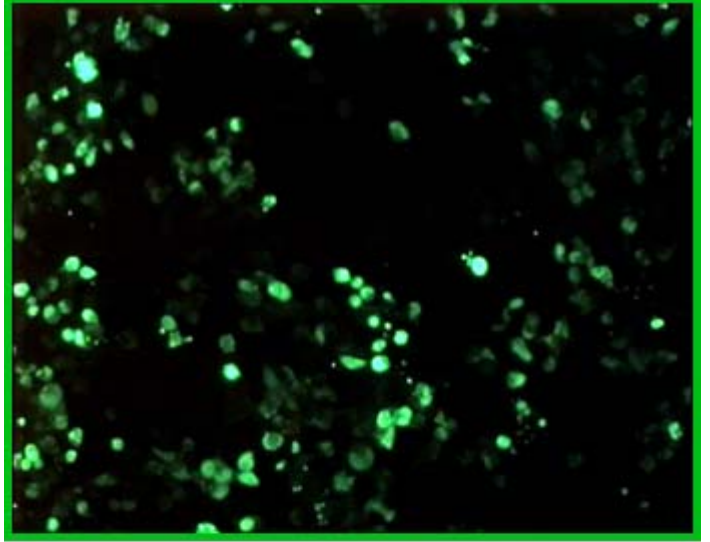
HEK293 (Kitozan, 400kD)



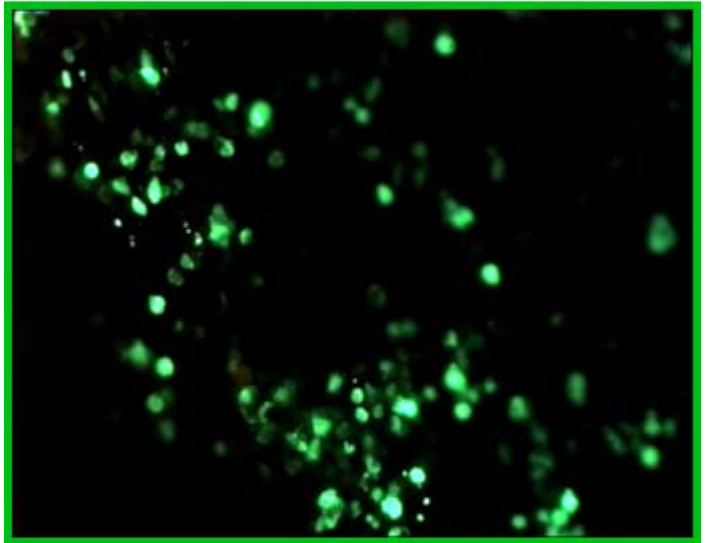
HEK293 (Kitozan, 750kD)

Resim 6.6.4. 0.5/1/1 (a/a) oranında kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

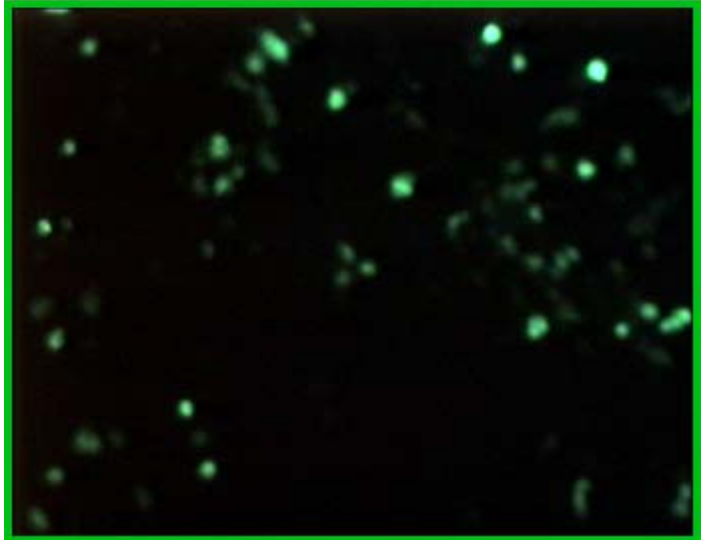
**Kitozan/protamin/shRNA
(1.0/1.0/1.0)**



HEK293 (Kitozan, 70kD)



HEK293 (Kitozan, 400kD)

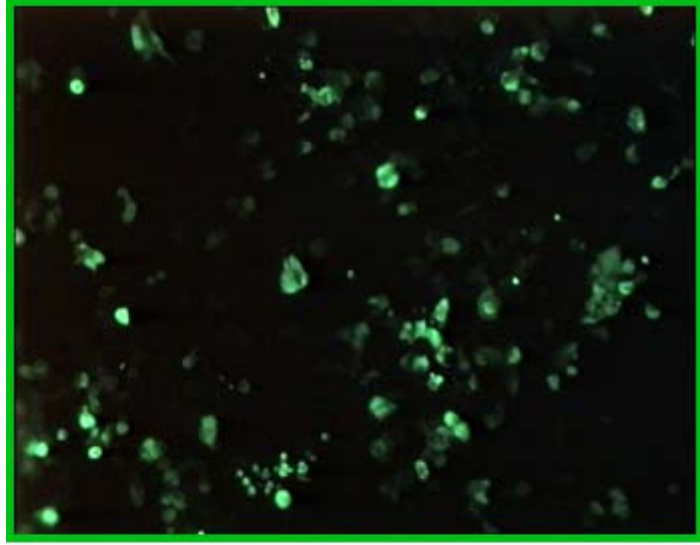


HEK293 (Kitozan, 750kD)

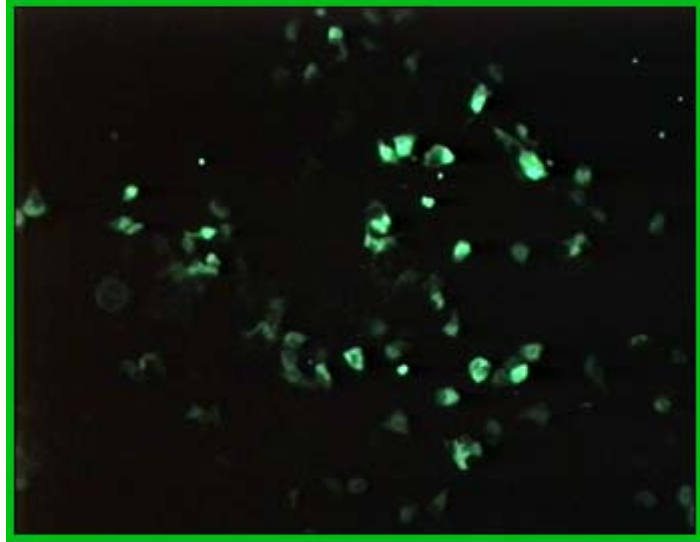
Resim 6.6.5. 1/1/1 (a/a) oranında kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

**Kitozan/TPP
(5.0/1.0)
Nanopartiküller**

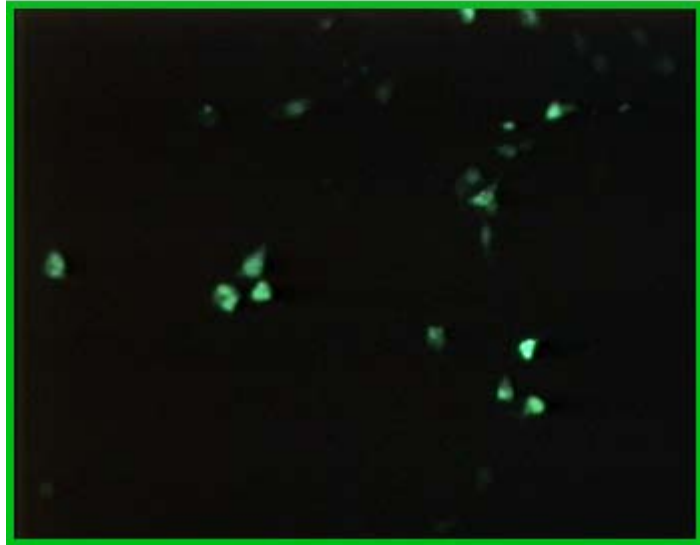
L₂ HEK293



M₂ HEK293



H₂ HEK293



Resim 6.6.6. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile in vitro transfeksiyon çalışmalarına ilişkin floresan mikroskobu görüntüleri.

Protamin/shRNA, kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ve shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile in vitro transfeksiyon çalışmalarında floresan mikroskobu değerlendirmeleri, shRNA yapısında yer alan GFP proteini seleksiyon marker geninden yararlanılarak yapılmıştır.

0.5/1, 1/1 ve 2/1 ağırlık oranlarında hazırlanan protamin/shRNA komplekslerinde maksimum GFP ekspresyonu 2/1 ağırlık oranındaki kompleksler ile HEK293 hücre hattında elde edilmiştir. HEK293 hücre hattının kullanıldığı in vitro transfeksiyon çalışmalarında in vitro transfeksiyon etkinliği açısından daha başarılı sonuçlar alınmıştır. GFP gen ekspresyonu açısından HEK293 hücre hattını HeLa ve MCF-7 takip etmektedir (**Resim 6.6.1., 6.6.2. ve 6.6.3.**).

Kitozan ve protaminin kombine olarak kullanıldığı kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmaları transfeksiyon etkinliği yüksek HEK293 hücre hattında gerçekleştirilmiştir. 0.5/1/1 ve 1/1/1 ağırlık oranlarında hazırlanan kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmalarında; düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan kompleks formülasyonları ile yüksek düzeyde GFP ekspresyonu saptanmıştır. 1/1/1 ağırlık oranında hazırlanan kompleksler ile elde edilen GFP gen ekspresyonu 0.5/1/1 oranındaki komplekslere kıyasla daha fazladır. En düşük düzeyde transfeksiyon etkinliği ve GFP ekspresyonu yüksek molekül ağırlığına sahip kitozan kullanılarak hazırlanan kompleks formülasyonlarında görülmüştür (**Resim 6.6.4. ve 6.6.5.**).

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile gerçekleştirilen in vitro transfeksiyon çalışmalarında da HEK293 hücre hattı kullanılmıştır. GFP ekspresyonu kitozanın molekül ağırlığı ile ters orantılı olacak şekilde L₂ formülasyonu ile en yüksek düzeyde H₂ formülasyonu ile en düşük düzeyde meydana gelmiştir (**Resim 6.6.6.**).

İn vitro transfeksiyon etkinliği ve GFP ekspresyonu açısından kompleks ve nanopartikül formülasyonları kıyaslandığında, kompleks formülasyonları ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

6.6.2. VEGF'in ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) Yöntemi

İle Tayinine İlişkin Bulgular

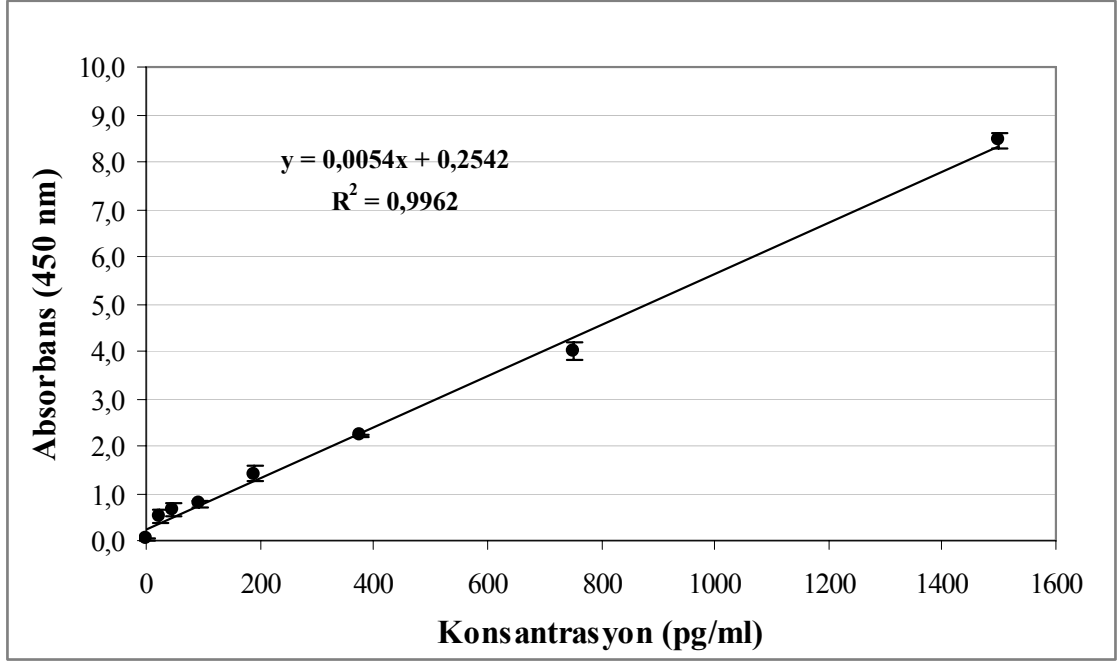
psiRNA ve siRNA taşıyan farmasötik şekillerden olan kitozan kompleks ve kitozan nanopartikül formülasyonlarının in vitro transfeksiyon çalışmalarında; in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF geninin ekspresyonunun spektrofotometrik tayininde kullanılmak üzere VEGF standart eğrisi yöntem 5.2.1.4.'de belirtildiği şekilde çalışılarak hazırlandı.

VEGF konsantrasyon değerlerine karşılık gelen 450 nm'deki absorbans değerlerinden yararlanılarak grafik çizildi. Elde edilen grafikte yer alan değerlerin regresyon analizi yapılarak eğrinin kullanılabilirliği ve doğrusallığı saptandı. Elde edilen pg/ml VEGF konsantrasyonlarına karşılık gelen OD 450 nm'deki absorbans değerleri **Tablo 6.6.1.**'de verilmiştir.

Tablo 6.6.1. huVEGF ELİSA kit standart eğri çizimine ilişkin değerler.

VEGF Konsantrasyonu (pg/ml)	Absorbans (OD 450nm)
23.4	0.500 ± 0.145
46.9	0.650 ± 0.155
93.8	0.775 ± 0.065
188.0	1.415 ± 0.172
375.0	2.215 ± 0.011
750.0	4.000 ± 0.185
1500.0	8.450 ± 0.150

Tablo 6.6.1.'de verilen spektrofotometrik çalışma ve ölçüm sonuçlarına göre çizilen huVEGF standard eğri grafiği ise **Şekil 6.6.1**'de verilmiştir.

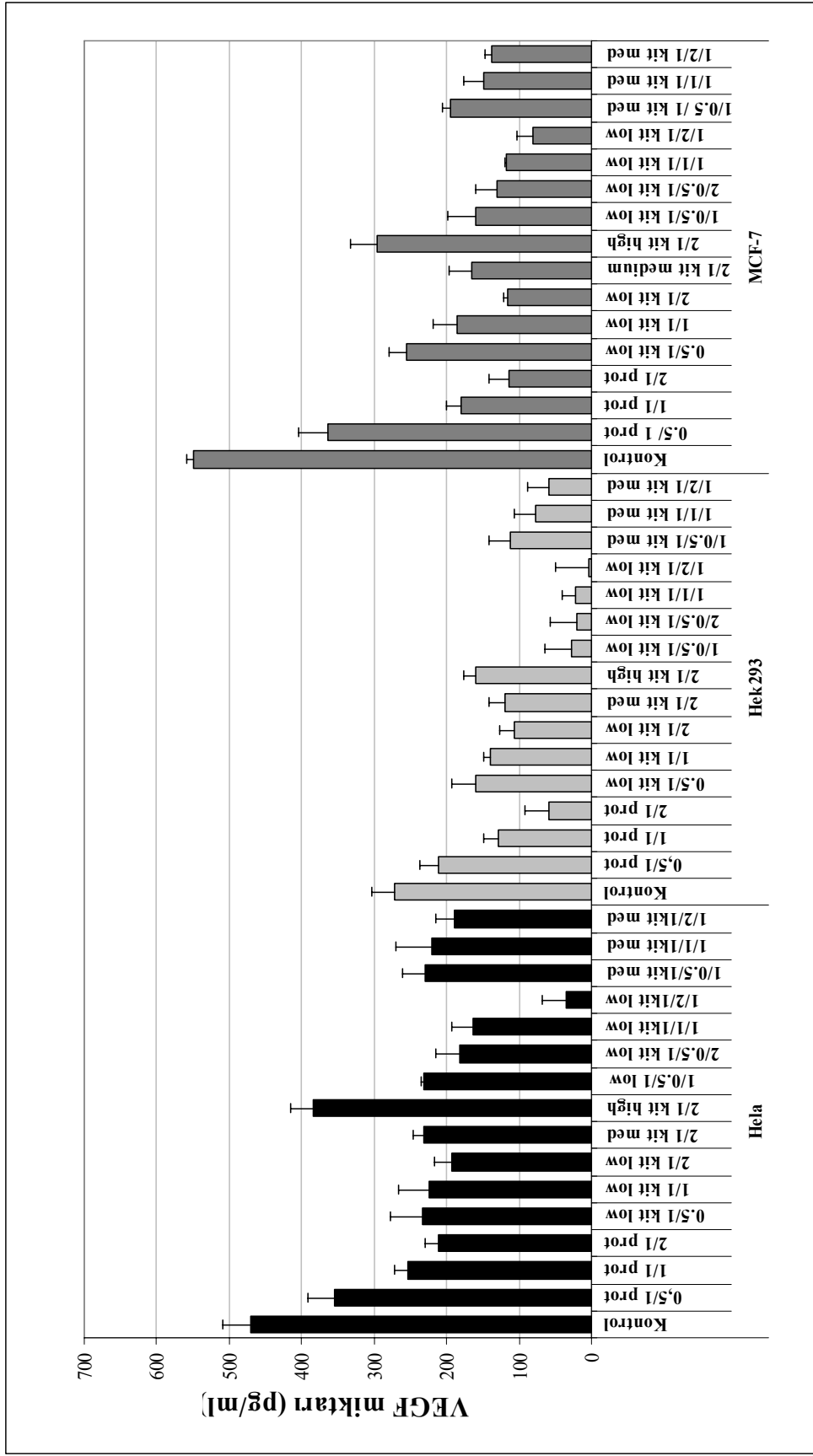


Şekil 6.6.1. huVEGF standart eğrisi.

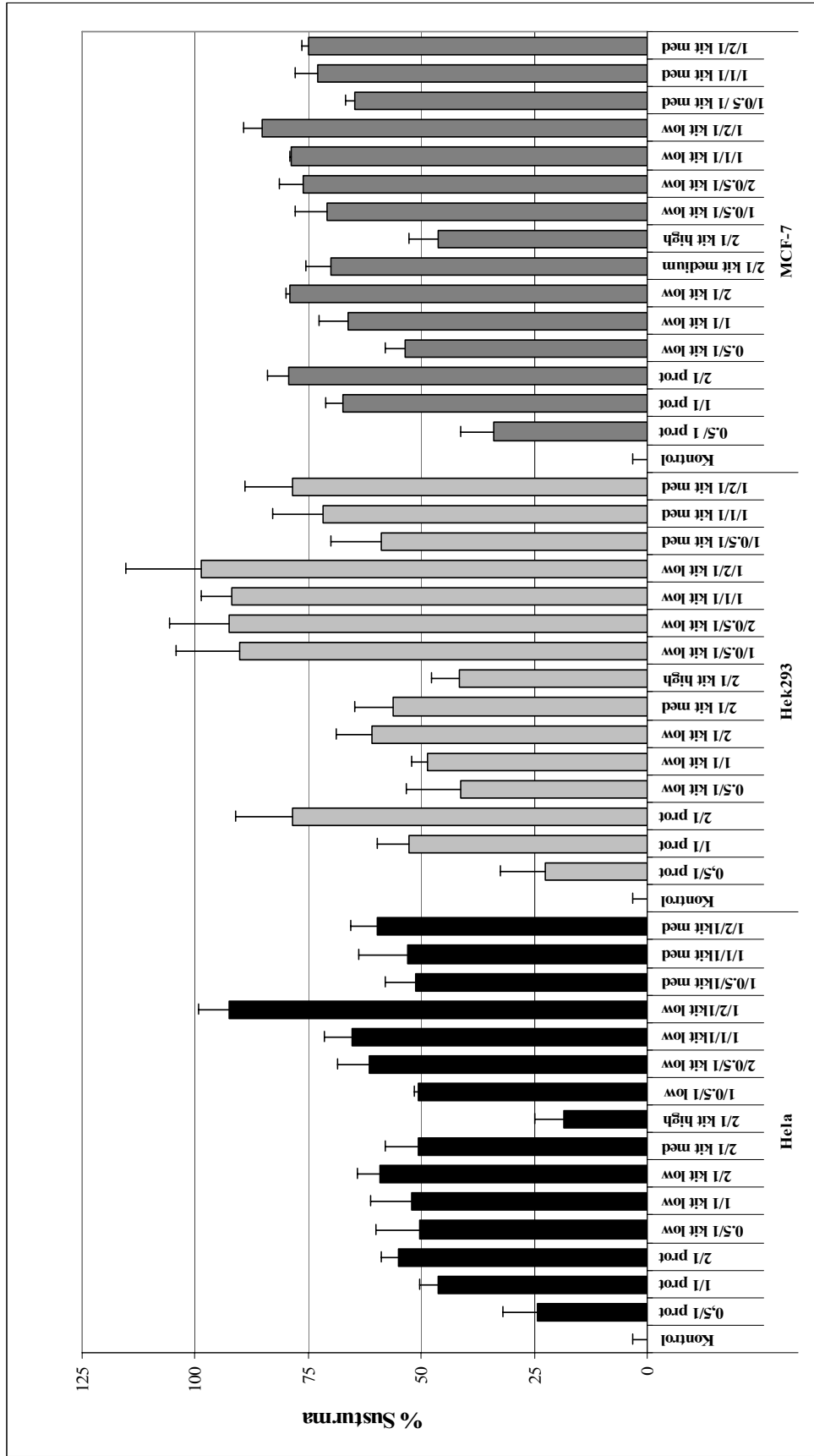
Hazırlanan VEGF standart eğrisinin; doğru denkleminin $y=0.0054x+0.2542$, R^2 değerinin 0.9962 olduğu saptanmıştır. VEGF Elisa kit ve elde edilen standart eğrinin in vitro transfeksiyon çalışmalarında insan VEGF gen ekspresyonunun tayininde kullanılabileceğine karar verildi.

Tez çalışmasında farklı hücre tiplerinde susturma etkinliğini incelemek için kullanılan HEK293, HeLa ve MCF-7 hücre hatlarındaki endojen VEGF ekspresyonundan yararlanıldı. Kompleks ve nanopartikül formülasyonu uygulanmış hücre hatlarındaki VEGF ekspresyon miktarı kontrol hücre grupları ile kıyaslandı.

Hücrelerde transfeksiyon sonrası ölçülen VEGF miktarları **Şekil 6.6.2.,6.6.3.,6.6.4. ve 6.6.5.**'de verilmiştir.



Şekil 6.6.2. shRNA komplekslerinin farklı hücre dizilerinde in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF gen ekspresyonunun susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar-1 .



Şekil 6.6.3. shRNA komplekslerinin farklı hücre dizilerinde in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF gen ekspresyonunun susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar-2 .

İn vitro transfeksiyon çalışmalarında shRNA kompleksleri ile VEGF gen inhibisyonu üç farklı hücre hattında incelendi (**Şekil 6.6.2.** ve **6.6.3.**). HeLa hücre hattında; protamin/shRNA kompleksleri ile 2/1 ağırlık oranında maksimum % 55.11, düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan 2/1 ağırlık oranındaki kitozan/shRNA kompleksleri ile maksimum % 50.05 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir. Her iki polimerin kombine kullanıldığı kitozan/protamin/shRNA ile transfeksiyon çalışmalarında ise her bir polimerin tek tek taşıyıcı sistem olarak kullanıldığında elde edilen gen inhibisyon değerinin yaklaşık olarak iki katı oranında gen inhibisyonu elde edilmiştir. 1/2/1 ağırlık oranında kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile elde edilen gen inhibisyonu % 92.8 dir.

HEK293 hücre hattında; protamin/shRNA kompleksleri ile 2/1 ağırlık oranında % 78,53, düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan 2/1 ağırlık oranındaki kitozan/shRNA kompleksleri ile % 61.02 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir. Kitozan/protamin/shRNA ile transfeksiyon çalışmalarında ise % 98.59 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir ve bu değer de HeLa hücre hattında olduğu gibi her iki polimerin tek tek kullanıldığında elde edilen maksimum gen inhibisyonu değerinin yaklaşık iki katıdır.

MCF-7 hücre hattında ise; protamin/shRNA ve kitozan/shRNA kompleksleri ile istatistiksel olarak (**Tablo 6.6.4.**) da anlamsız benzer düzeyde gen inhibisyonu elde edilmiştir (% 79.24, % 78.98). Her iki polimerin kombine kullanıldığı kitozan/protamin/shRNA ile transfeksiyon çalışmalarında ise % 85.22 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile HeLa, HEK293 ve MCF-7 hücre hatlarında yüksek düzeyde gen inhibisyonu sağlanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları **Tablo 6.6.2., 6.6.3.** ve **6.6.4.**'de verilmiştir. Kullanılan hücre hatları gen inhibisyonu açısından HEK293>HeLa>MCF-7 şeklindedir ve floresan mikroskobu değerlendirmeleri ile korelasyon göstermektedir.

Tablo 6.6.2. shRNA kompleks formülasyonlarının HeLa hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

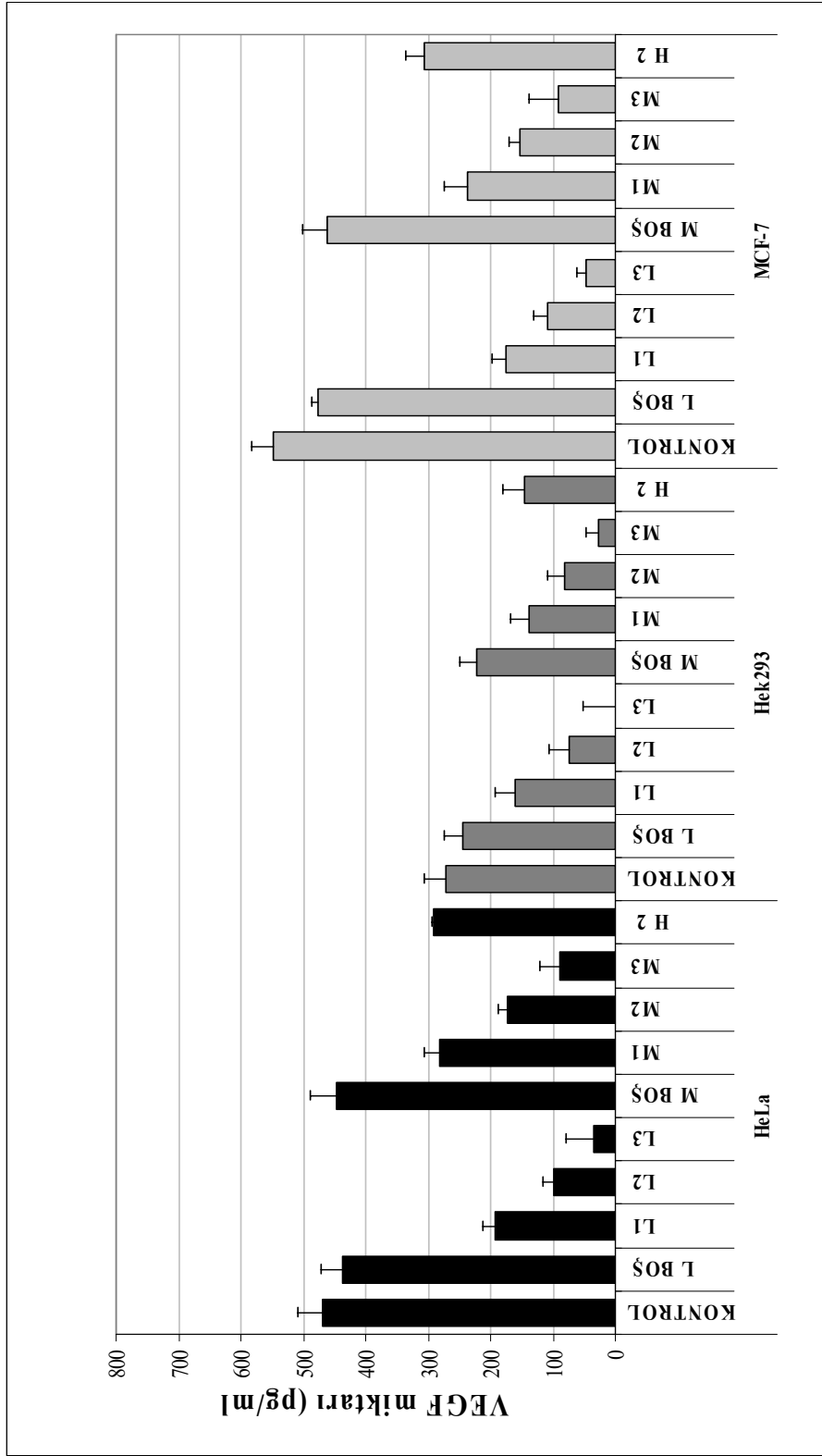
	Kontrol (HeLa)	0.5/1 Prot.	1/1 Prot.	2/1 Prot.	0.5/1 (70kD)	1/1 Kit. (70kD)	2/1 Kit. (70kD)	2/1 Kit. (400kD)	2/1 Kit. (750kD)	1/0.5/1 (70kD)	2/0.5/1 (70kD)	1/1/1 (70kD)	1/2/1 (70kD)	1/0.5/1 (400kD)	1/1/1 (400kD)	1/2/1 (400kD)
Kontrol (Hela)	---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
0.5/1 Prot.		---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1 Prot.			---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Prot.				---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
0.5/1 (70kD)					---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.001$
1/1 Kit. (70kD)						---	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.001$
2/1 Kit. (70kD)							---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Kit. (400kD)								---	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.001$
2/1 Kit. (750kD)									---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/0.5/1 (70kD)										---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P>0.05$
2/0.5/1 (70kD)											---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$
1/1/1 (70kD)												---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/2/1 (70kD)													---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/0.5/1 (400kD)														---	$P>0.05$	$P<0.001$
1/1/1 (400kD)															---	$P<0.001$
1/2/1 (400kD)																---

Tablo 6.6.3. shRNA kompleks formülasyonlarının HEK293 hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

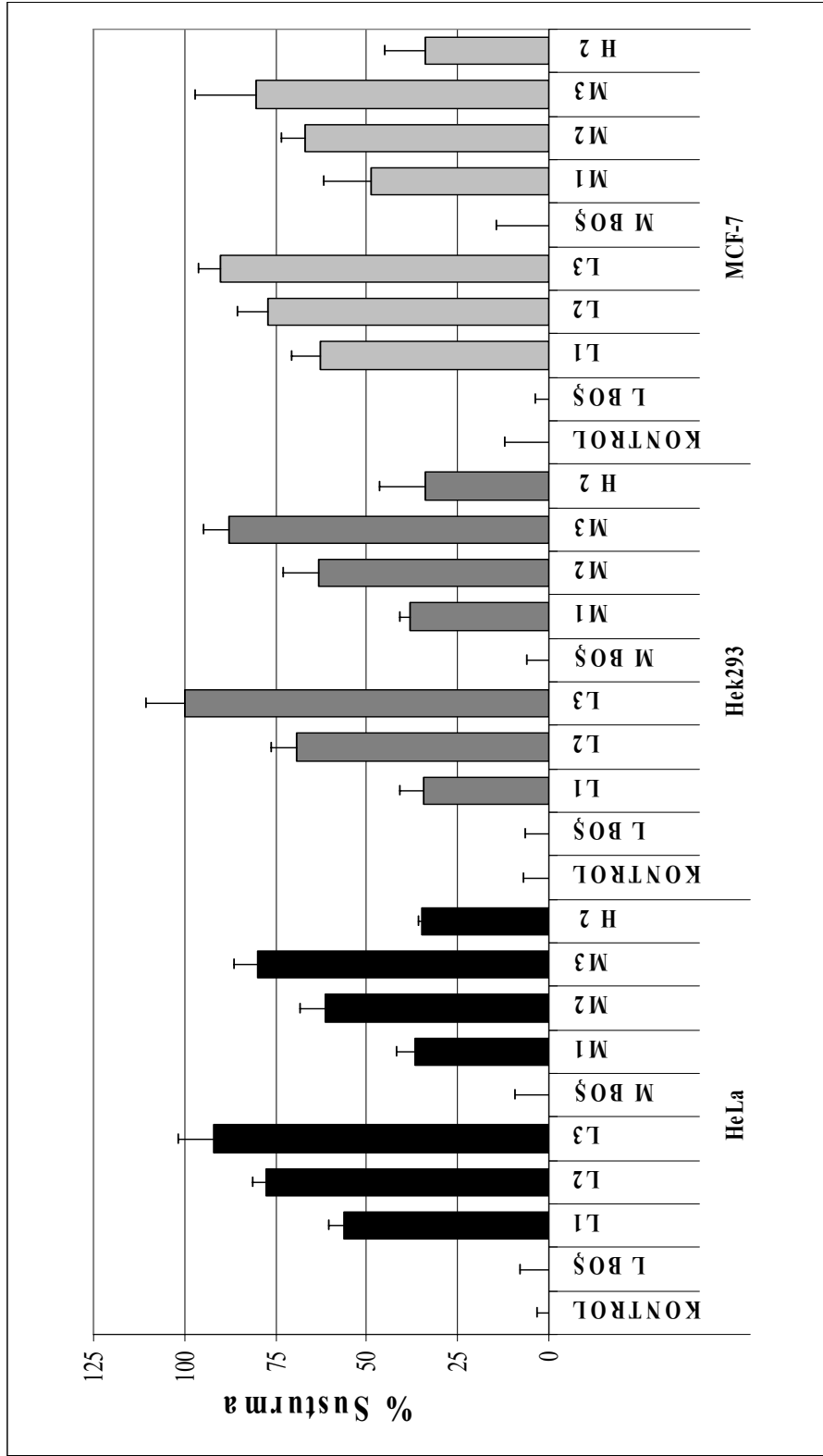
	Kontrol (HEK293)	0.5/1 Prot.	1/1 Prot.	2/1 Prot.	0.5/1 (70kD)	1/1 Kit. (70kD)	2/1 Kit. (70kD)	2/1 Kit. (400kD)	2/1 Kit. (750kD)	1/0.5/1 (70kD)	2/0.5/1 (70kD)	1/1/1 (70kD)	1/2/1 (70kD)	1/0.5/1 (400kD)	1/1/1 (400kD)	1/2/1 (400kD)
Kontrol (HEK293)	---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
0.5/1 Prot.		---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1 Prot.			---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Prot.				---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$
0.5/1 (70kD)					---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1 Kit. (70kD)						---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Kit. (70kD)							---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Kit. (400kD)								---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Kit. (750kD)									---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/0.5/1 (70kD)										---	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/0.5/1 (70kD)											---	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1/1 (70kD)												---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/2/1 (70kD)													---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/0.5/1 (400kD)														---	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1/1 (400kD)															---	$P<0.001$
1/2/1 (400kD)																---

Tablo 6.6.4. shRNA kompleks formülasyonlarının MCF-7 hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

	Kontrol (MCF-7)	0.5/1 Prot.	1/1 Prot.	2/1 Prot.	0.5/1 (70kD)	1/1 Kit. (70kD)	2/1 Kit. (70kD)	2/1 Kit. (400kD)	2/1 Kit. (750kD)	1/0.5/1 (70kD)	2/0.5/1 (70kD)	1/1/1 (70kD)	1/2/1 (70kD)	1/0.5/1 (400kD)	1/1/1 (400kD)	1/2/1 (400kD)
Kontrol (MCF-7)	---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
0.5/1 Prot.		---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1 Prot.			---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Prot.				---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
0.5/1 (70kD)					---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1 Kit. (70kD)						---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Kit. (70kD)							---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Kit. (400kD)								---	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
2/1 Kit. (750kD)									---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/0.5/1 (70kD)										---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$
2/0.5/1 (70kD)											---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1/1 (70kD)												---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/2/1 (70kD)													---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
1/0.5/1 (400kD)														---	$P<0.001$	$P<0.001$
1/1/1 (400kD)															---	$P<0.001$
1/2/1 (400kD)																---



Şekil 6.6.4. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerinin farklı hücre dizilerinde in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF gen ekspresyonunun susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar-1 .



Şekil 6.6.5. shRNA içeren kitozan/TPP nanopartiküllerinin farklı hücre dizilerinde in vitro transfeksiyon etkinliği ve VEGF gen ekspresyonunun susturulması açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar-2 .

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile VEGF gen inhibisyonu çalışmaları da shRNA kompleksleri ile *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında olduğu gibi HeLa, HEK293 ve MCF-7 hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir (**Şekil 6.6.4.** ve **6.6.5.**).

VEGF gen inhibisyonu çalışmalarında HeLa hücre hattında; maksimum gen inhibisyonu düşük molekül ağırlıklı kitozanın kullanıldığı L₃ formülasyonu ile elde edilmiştir (% 92.23). Orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitozan ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları ile istenilen düzeyde gen inhibisyonu elde edilmiştir M₃ formülasyonu ile maksimum gen inhibisyonu %79.97, H₂ formülasyonu ile maksimum gen inhibisyonu ise % 34.91'dir.

Nanopartikül formülasyonları ile HEK293 hücre hattında; L₃ formülasyonu ile % 99.75, M₃ formülasyonu ile % 87.62 ve H₂ formülasyonu ile % 33.80 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir.

MCF-7 hücre hattında nanopartikül formülasyonları ile gerçekleştirilen *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında ise HeLa ve HEK293 hücre hattında elde edilen gen inhibisyonu değerlerine kıyasla daha düşük olmakla birlikte L₃ formülasyonu ile % 90.35, M₃ formülasyonu ile % 80.21, H₂ formülasyonu ile % 33.89 düzeyinde VEGF gen inhibisyonu elde edilmiştir.

Kullanılan hücre hatlarında shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile yüksek düzeyde gen inhibisyonu sağlanmıştır. Nanopartikül formülasyonlarında kullanılan kitozanın molekül ağırlığı ve formülasyona ilave edilen shRNA miktarı etkili parametrelerdir. Kullanılan hücre hatları gen inhibisyonu açısından HEK293>HeLa> MCF-7 şeklinde bir sıralama ve floresan mikroskobu değerlendirmeleri ile korelasyon göstermektedir (**Şekil 6.6.4.** ve **6.6.5.**). Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları **Tablo 6.6.5., 6.6.6. ve 6.6.7.**'de verilmiştir.

Tablo 6.6.5. shRNA nanopartikül formülasyonlarının HeLa hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

	Kontrol	L _{Boş}	L ₁	L ₂	L ₃	M _{Boş}	M ₁	M ₂	M ₃	H ₂
Kontrol	---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L _{Boş}		---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L ₁			---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$
L ₂				---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$
L ₃					---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
M _{Boş}						---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
M ₁							---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$
M ₂								---	$P<0.001$	$P<0.001$
M ₃									---	$P<0.001$
H ₂										---

Tablo 6.6.6. shRNA nanopartikül formülasyonlarının HEK293 hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

	Kontrol	L _{Boş}	L ₁	L ₂	L ₃	M _{Boş}	M ₁	M ₂	M ₃	H ₂
Kontrol	---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L _{Boş}		---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L ₁			---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L ₂				---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P>0.05$	$P<0.001$	$P<0.001$
L ₃					---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
M _{Boş}						---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
M ₁							---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
M ₂								---	$P<0.001$	$P<0.001$
M ₃									---	$P<0.001$
H ₂										---

Tablo 6.6.7. shRNA nanopartikül formülasyonlarının MCF-7 hücre hattında in vitro transfeksiyonuna ilişkin istatistiksel değerlendirme sonuçları.

	Kontrol	L _{Boş}	L ₁	L ₂	L ₃	M _{Boş}	M ₁	M ₂	M ₃	H ₂
Kontrol	---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L _{Boş}		---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L ₁			---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L ₂				---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
L ₃					---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
M _{Boş}						---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
M ₁							---	$P<0.001$	$P<0.001$	$P<0.001$
M ₂								---	$P<0.001$	$P<0.001$
M ₃									---	$P<0.001$
H ₂										---

6.7. Taşıyıcı Sistemlerin İn Vitro Sitotoksitesine İlişkin Bulgular

Kitozan/shRNA, protamin/shRNA, kitozan/protamin/shRNA kompleks ve shRNA içeren nanopartikül formülasyonları ile in vitro transfeksiyon çalışmaları kapsamında kullanılan polimerler ile hazırlanan formülasyonların sitotoksitesi MTT yöntemi ile araştırıldı. Sitotoksitenin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalara ilişkin elde edilen sonuçlar **Şekil 6.7.1., 6.7.2., 6.7.3., 6.7.4., 6.7.5. ve 6.7.6.**'da verilmiştir.

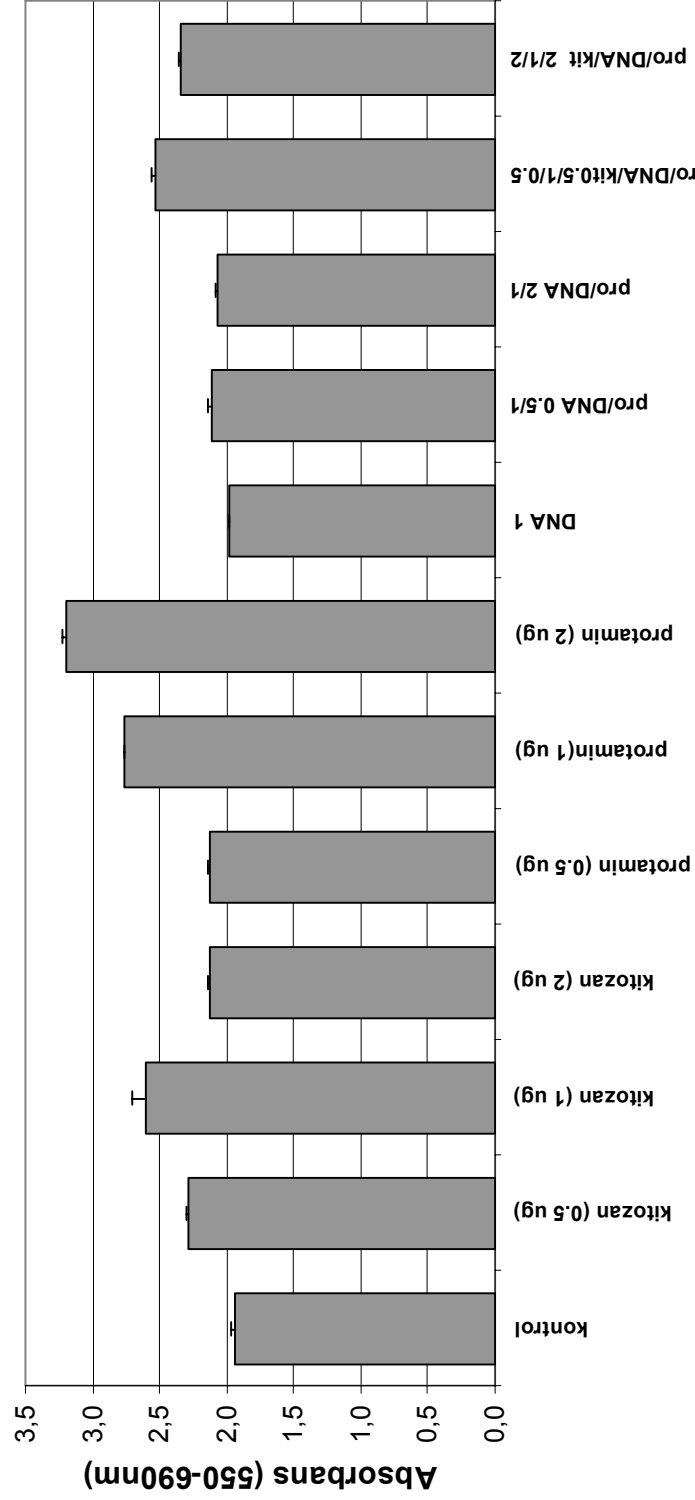
Kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA komplekslerinin sitotoksitesinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan polimerler ve bu polimerler ile hazırlanan komplekslerin hücreler için toksik bir etki göstermediği aksine hücre proliferasyonunu teşvik ettiği saptanmıştır (1µg kitozan; % 134, 2µg protamin; % 164, 0.5/0.5/1 ağırlık oranında kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile % 130) (**Şekil 6.7.1., 6.7.2. ve 6.7.3.**).

İn vitro transfeksiyon çalışmaları kapsamında kompleks formülasyonları ile gerçekleştirilen sitotoksitenin belirlenmesine yönelik çalışmalara paralel olarak shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile de sitotoksite çalışmaları yapılmıştır.

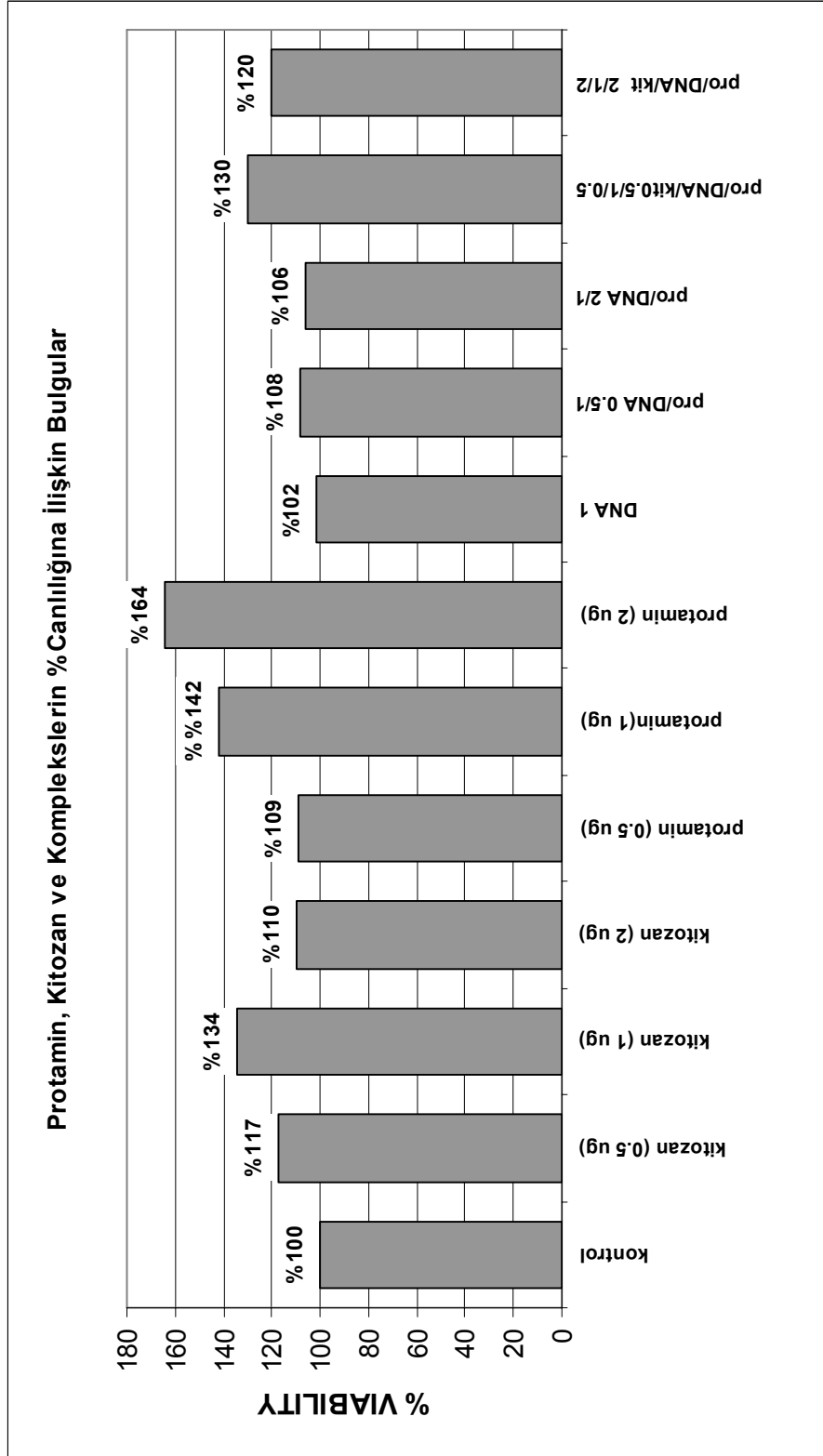
Nanopartikül formülasyonları ile sitotoksite çalışmalarında da kullanılan polimer ve hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının hücreler üzerinde sitotoksik bir etkisi saptanmamıştır (**Şekil 6.7.4., 6.7.5. ve 6.7.6.**).

Sitotoksite çalışmaları sonuçlarına göre kullanılan polimerler ile hazırlanan formülasyonların kullanılan hücre hatları üzerinde toksik herhangi bir etkisinin olmadığı ve hücre proliferasyonunu inhibe edici bir etki göstermediği saptanmıştır. Sitotoksite çalışmalarında elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları anlamlıdır ($p<0.001$).

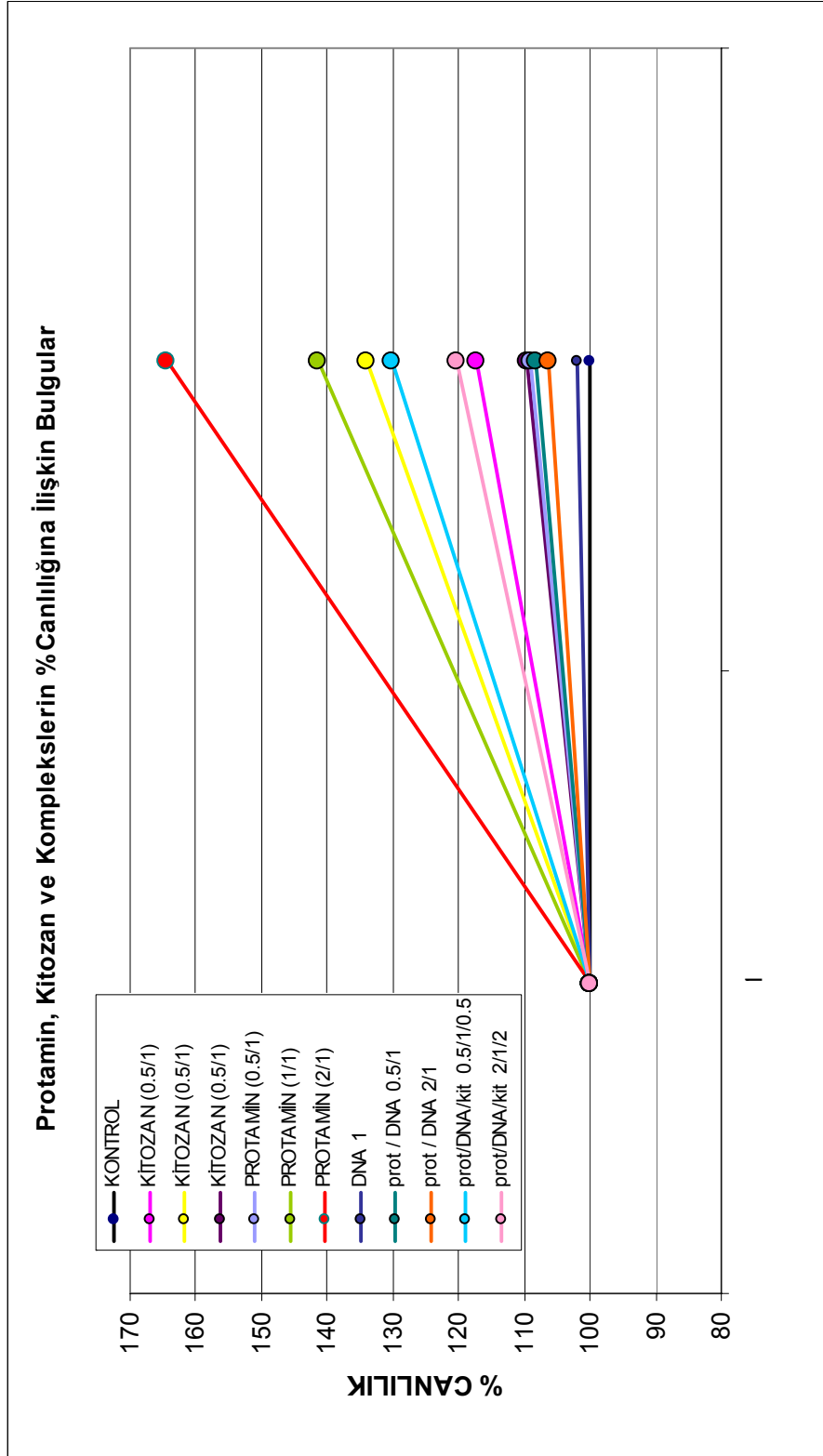
Protamin, Kitozan ve Komplekslerin Sitotoksitesine İlişkin Bulgular



Şekil 6.7.1.1. shRNA komplekslerine ait sitotoksitesite çalışması sonuçları-1 (MTT).

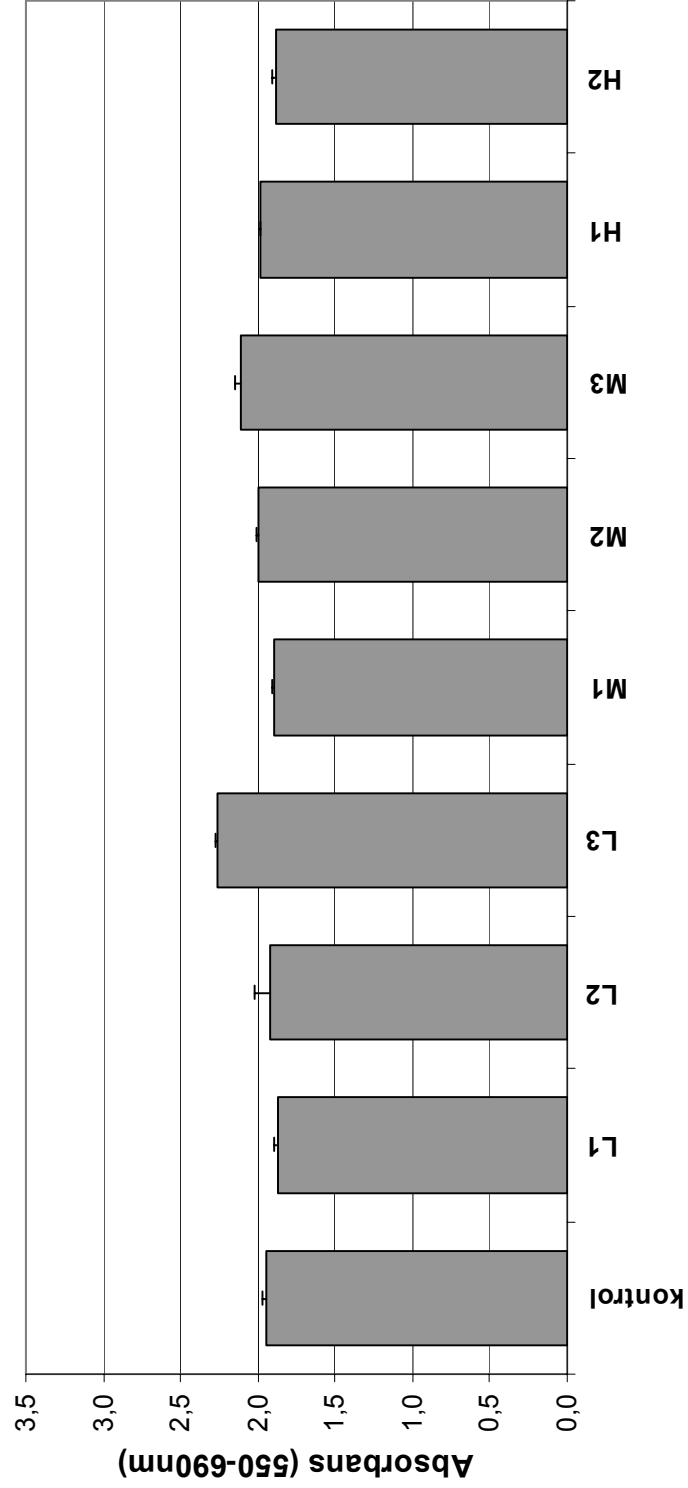


Şekil 6.7.2. shRNA komplekslerine ait sitotoksosite çalışması sonuçları-2 (MTT).

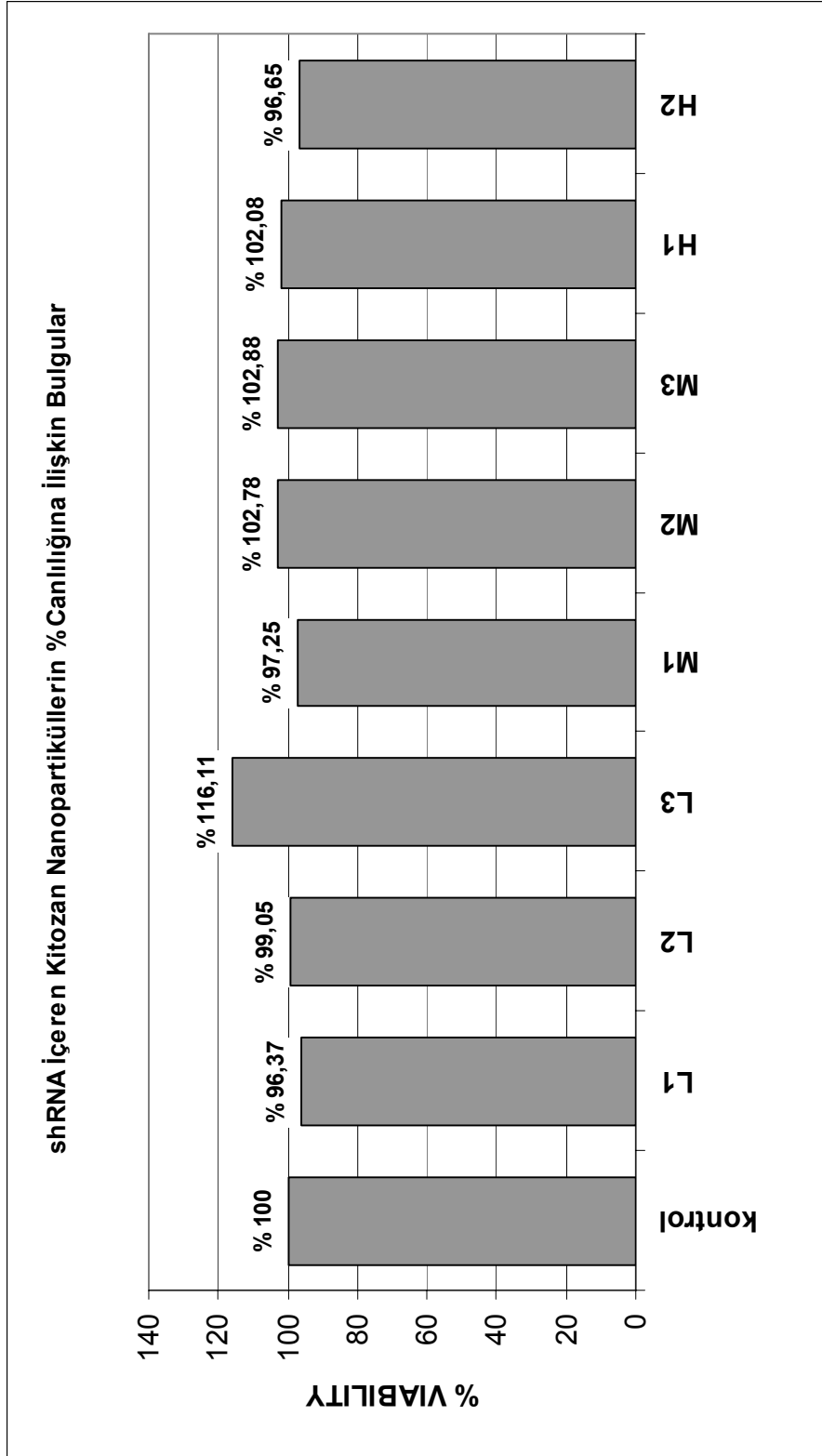


Şekil 6.7.3. shRNA komplekslerine ait sitotoksosite çalışması sonuçları-3 (MTT).

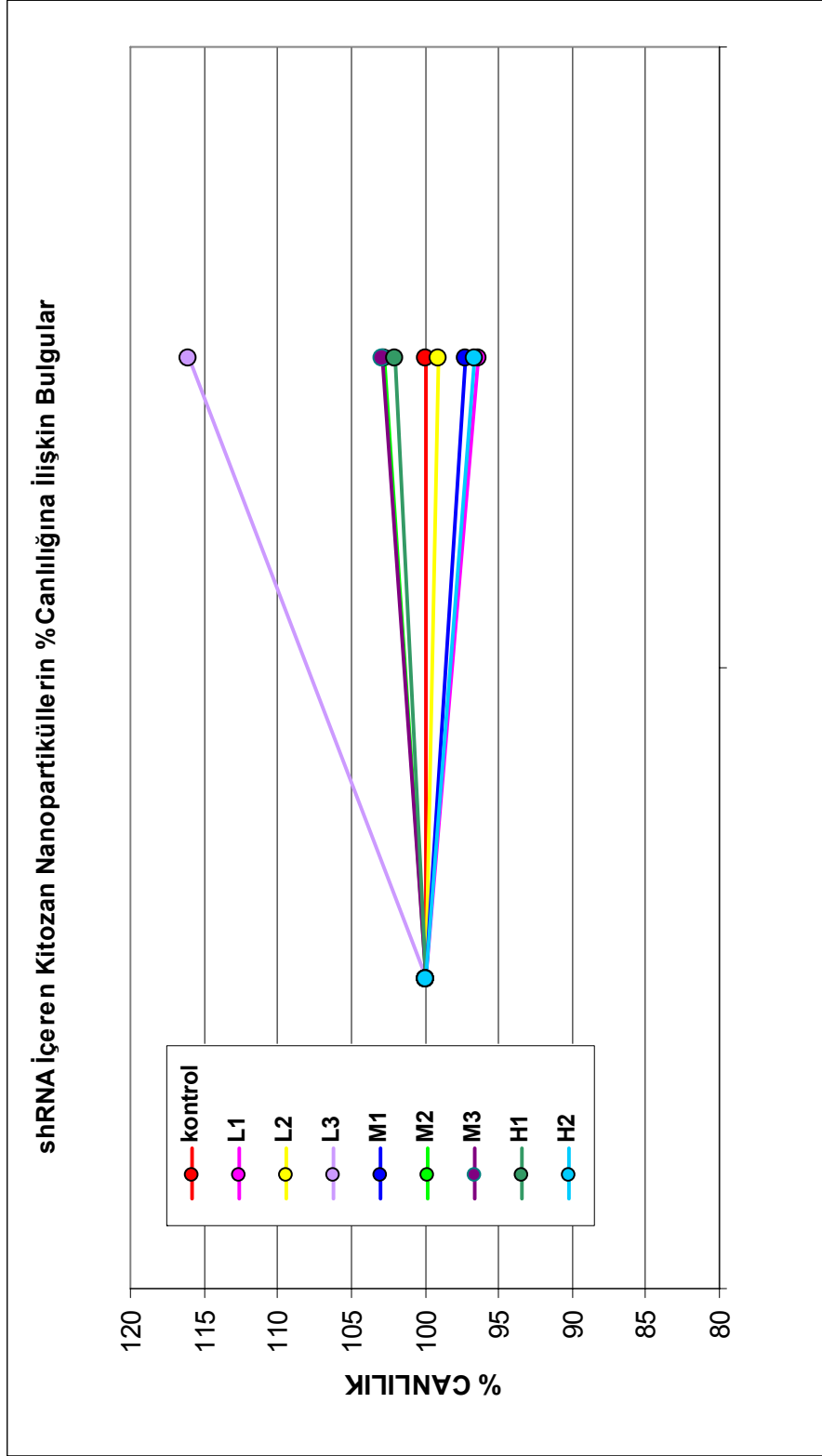
shRNA İçeren Kitozan Nanopartiküllerin Sitotoksitesine İlişkin Bulgular



Şekil 6.7.4. shRNAİeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarına ait sitotoksitesite çalışması sonuçları-1 (MTT).



şekil 6.7.5. shRNAİeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarına ait sitotoksosite çalışması sonuçları-2 (MTT).



şekil 6.7.6. shRNAİeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarına ait sitotoksisite çalışması sonuçları-3 (MTT).

7. TARTIŞMA

Gelişen çağımızın en ileri teknolojilerinden biri olarak gösterilen ve kalıtsal, kronik hastalıkların çözüm kaynağı olarak görülen gen tedavisi, fonksiyonel genin hücrelere aktarılması ve ekspresyonunun kontrolünün yanısıra hastalığa neden olan genlerin susturulması şeklinde de uygulanmaktadır. Gen teknolojilerinin ana unsurunu teşkil eden nükleik asitler, çağımızın en önemli hastalığı olan kanser tedavisinde kemoterapötikler ve protein ilaçlarına alternatif olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda plazmid DNA ve özellikle siRNA ile gen tedavisi önemli araştırma alanlarından biri olmuştur.

Proteinlerin işlevlerinin ve etkilerinin, baskılanarak ya da durdurularak araştırılması sık rastlanan bir yöntemdir. RNAi ile hedeflenen post-transkripsiyonel gen susturulması, hem biyolojik araştırmalarda hem de hastalıklara neden olan gen ürünlerinin in vivo inaktivasyonu için ilaç geliştirilmesinde son derece önemli bir araçtır. Gen anlatımının durdurulması amacıyla siRNA kullanımına dayanan yöntemde tedavi edici gen, mRNA'ya etki ederek çeşitli enzimlerin yardımıyla yanlış anlatım yapan genin işlevini etkisiz hale getirmektedir. Hedefe özgün olan bu yöntem, gen tedavisi çalışmalarına yeni bir boyut kazandırmıştır ⁽⁹²⁾.

Diğer taraftan VEGF ailesi proteinleri ve reseptörlerini (VEGFR) kapsayan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) yolağı fizyolojik ve patolojik anjiogenezin önemli regülatörüdür. Proanjiogenik koşulların gelişmesi malign tümör gelişmesi için gerekli bir kademedir ve pek çok kanser tipinde (kolorektal, mide, pankreas, karaciğer, akciğer, meme, tiroid, genitoüriner, intrakranial ve hematopoetik) VEGF'in yüksek oranda eksprese edildiği saptandığından bu aşamalardaki yolakların düzenlenmesi ve/veya inhibisyonu üzerine yapılan araştırmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır ⁽¹¹³⁾. Yüksek miktarda VEGF ekspresyonunun tümör büyümesi ile ilgili olduğu bilinmekte olduğundan VEGF gen inhibisyonu yoluyla kanser tedavisi diğer yöntemlere nazaran çok daha önemli bir unsur haline gelmiştir ⁽¹²⁷⁾. VEGFR sinyalleri ve VEGF yolunu inhibe edecek moleküller üzerinde çalışılmaktadır. Bu amaçla, geliştirilen monoklonal antikorlar

(Bevasizumab, VEGF Trap), tirozin kinaz inhibitörleri ve gen baskılayıcılar (antisens oligonükleotidler) üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmı klinikte kullanılmakta, bir kısmının ise faz çalışmaları devam etmektedir ⁽⁵¹⁾.

siRNA ve shRNA da, kanser tedavisi açısından kullanılabilir ve ümit vaad eden etkin bir yöntemler olarak pek çok açıdan araştırılmaktadır ^(43, 93).

Günümüzde shRNA'ların terapötik alanda kullanımında, ekzo ve endonükleazlara karşı RNA duplekslerinin stabilitesi, taşınması, zayıf intrasellüler alımı ve spesifik olmayan immün stimülasyonu gibi çeşitli problemler mevcuttur. shRNA molekülleri, nükleaz degradasyonuna antisens moleküllerden daha fazla direnç göstermelerine karşın, bazı serum nükleazları tarafından da kolaylıkla degrades olmaktadır. Bu nedenle stabiliteyi arttırmak için molekülde kimyasal modifikasyonlar yapılmakta ⁽⁴⁴⁾, ancak modifiye şekillerin de toksisite ve düşük aktivite gibi sorunları bulunmaktadır.

Terapötik shRNA'lar için ideal bir taşıma sisteminin dizaynında, kan dolaşımında uzun süreli sirkülasyon, shRNA'nın hedef dokuda birikiminin artması ve bozunmadan etkin intrasellüler transportu sağlamak önemli hususların başında gelmektedir. Yukarıda belirtilen sorunları gidermek ve shRNA'ların hücre alımlarını arttırabilmek için viral ve viral olmayan pek çok taşıyıcı sistem geliştirilmektedir. Viral vektörlerin, yüksek transdüksiyon etkinliğinde olmalarına karşın toksik ve immunojenik olmaları, geniş çapta üretimlerinin güç ve masraflı olması, terapötik amaçlı kullanımlarına büyük engel teşkil etmektedir. Bu nedenle, son yıllarda doğal veya sentetik katyonik polimerler ve katyonik lipidler ile viral olmayan shRNA taşıyıcı sistemler oluşturulmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır ^(185,194).

Gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde, katyonik özellikte bir polimer olan kitozan, biyogeçimli olması, düşük oranda immün yanıt oluşturmaması, parçalanma ürünlerinin toksik etkiye sahip olmaması ve ekonomik olması nedeniyle pek çok çalışmada denenmektedir ⁽⁶⁾. Yapılan pek çok çalışmada kitozan, özellikle plazmid

DNA ile gen taşınması çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmış olup, ayrıca kitozan esaslı pDNA poliplekslerin düşük sitotoksosite gösterdikleri, in vivo olarak da mukozal dokulara gen taşınmasında etkin olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (209).

Arginin amino asidi bakımından zengin katyonik yapıda bir peptid olan protamin, oligonükleotidlerin, nanopartiküllerin ve çeşitli oranlarda hazırlanan nanoplekslerin oluşturulmasında denenmektedir. Protaminin hücreye penetrasyonu arttırıcı etkisi nedeni ile son yıllarda protamin esaslı taşıyıcı sistemler özellikle kompleks, proticles yapıları gen taşıyıcı sistem olarak denenmekte, fakat stabil komplekslerin oluşturulmasında bazı sorunlar ile karşılaşmaktadır. Bu sorunların giderilmesi amacı ile çeşitli stabilizan ve koruyucu çözeltiler eklenerek stabil komplekslerin oluşturulmasına çalışılmaktadır (191, 200).

Bilindiği gibi shRNA'nın tedavide kullanılabilirliği son derece yenidir. Howard ve ark.'ları, kitozan-temelli siRNA nanopartikül taşıyıcı sistemi oluşturmuşlardır. Zenginleştirilmiş yeşil floresan proteinini (EGFP) stabil olarak eksprese eden H1299 insan akciğer karsinoma hücreleri ve murine peritoneal makrofajları, EGFP siRNA taşıyan kitozan nanopartiküller ile transfekte etmişler ve yüksek düzeyde EGFP gen inhibisyonu sağlamışlardır (82).

Aynı grup diğer bir çalışmalarında, kitozan/siRNA nanopartiküllerinin fizikokimyasal özellikleri (boyut, zeta potansiyeli, morfoloji ve kompleks stabilitesi) ve in vitro susturma etkinliğinde, kitozanın moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesinin etkili parametreler olduğu rapor etmektedir (83).

Issa ve ark.'ları, farklı molekül ağırlığında ve deasetilasyon derecesinde kitozan kullanarak, hücresel alımı ve kolloidal stabiliteyi arttırmayı amaçladıkları çalışmalarında, in vitro ve in vivo transfeksiyon etkinliğini arttırarak uzun süreli gen inhibisyonu elde etmişlerdir. Uzun lineer kitozan oligomerleri ve siRNA ile, nano boyutta kompleksler oluşturmuşlar ve intrasellüler olarak siRNA'nın bozunmadan sürekli salımını sağlamışlardır (90).

Sailong ve ark.'ları, gen inhibisyonu için siRNA taşıyıcı sistemler olarak kitozan/siRNA nanopartiküllerini kullanmışlar, siRNA ve kitozan arasındaki etkileşim gücünün nanopartiküllerin stabilite ve oluşumunu anlamada katkı sağlayacağını düşünmüşlerdir ⁽¹⁵⁹⁾.

Andersen ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, liyofilize katyonik polimer olan kitozan ile lipid (TransIT-TKO) siRNA formülasyonlarını gen susturma mekanizmaları için yeni bir metod tanımlamaya çalışmışlardır. Kriyoprotektan olarak sukroz içeren kitozan/siRNA formülasyonu (~%70) ve TransIT-TKO/siRNA ile önceden kaplanmış platelerde transfekte edilen H1299 insan akciğer karsinoma hücrelerinde EGFP'nin (enhanced green fluorescent protein) etkin ve spesifik olarak susturulduğunu göstermişlerdir ⁽¹²⁾.

Kitozan ve tiamin pirofosfat kullanılarak yeni bir siRNA taşıyıcısı formüle edilmiştir. Bu formül stabil ve devamlı olarak EGFP-ekspresse eden HepG2 hücrelerine (insan hepatokarsinoma hücre dizisi), siRNA'nın taşınmasında kullanılmıştır ⁽¹⁵⁵⁾.

Short hairpin RNA (shRNA) için yeni bir taşıyıcı sistem geliştirmeye çalışan Wang ve ark.'ları, bu amaçla insan rabdomyosarkom RD hücre dizisinde TGF- β 1 ekspresyonunu inhibe etmek için shRNA ekspresse eden kitozan nanopartiküllerini taşıyıcı sistem olarak kullanmışlardır ⁽¹⁹²⁾.

Jere ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, kitozan-PEI kompozisyonunun siRNA taşınmasında başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir. Araştırmacılar akciğer kanseri ile ilgili yaptıkları in vitro çalışmada, Akt1 siRNA'nın kanser hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde azalttığını saptamışlardır ⁽⁹³⁾.

Zimmer ve ark.'ları protamin oligonükleotidlerinin tuz çözeltilerinde çok kısa sürede agregasyona uğramaları ve hücre içerisinde zayıf oranda çözünmeleri gibi negatif etkilerini, oluşturulacak nanopartiküllere ve oligonükleotidlere human serum

albumini ekleyerek ortadan kaldırmışlardır ⁽⁹⁸⁾. Bu şekilde oluşturulan makromolekülleri, small angle X-ray dağılımı (SAXS), floresan korelasyon spektroskopisi (FCS), foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ölçümü ve taramalı elektron mikroskopisi (SEM) yöntemiyle görüntülemişler ve boyutlarını ve yüzey yüklerini incelemişlerdir ⁽¹¹⁸⁾.

VEGFA shRNA/kitozan ve VEGFA shRNA/protamin kompleksleri ile ilgili sınırlı sayıda yayın olması nedeniyle, bu tez kapsamında kitozan ve protaminin VEGF shRNA için taşıyıcı sistem olabilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu tezin amacı, VEGFA shRNA için yeni bir taşıyıcı sistem olarak protamin ve kitozandan hareketle; protamin/VEGFA shRNA, kitozan/VEGFA shRNA ve protamin/kitozan/VEGFA shRNA kompleks ve kitozan/VEGFA shRNA nanopartikülleri hazırlayarak, karakterizasyonu yapmak, in vitro stabilitesini, transfeksiyon özelliklerini araştırmak ve optimize ederek geliştirmektir. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler daha ileri düzeydeki çalışmalara temel teşkil edecektir. Bu amaçla gen susturucu olarak vektör temelli plazmid siRNA (shRNA) kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında; shRNA'nın izolasyon sonrası spektrofotometrik ve elektroforetik kontrolleri yapılmış, DNA molekülüne spesifik olarak spektrumunda 260 nm'de maksimum absorbanans değeri ölçülmüş ve agaroz jel elektroforezinde de yaklaşık olarak % 100 oranında kapalı halkasal formda DNA bandı gözlenmiştir (**Resim 6.1.1.** ve **6.1.2.**). Çalışmamızda protaminin yanı sıra düşük (70 kD), orta (400 kD) ve yüksek (750 kD) molekül ağırlığına sahip kitozanlar, % 0.25 (a/h) konsantrasyonda kullanılarak kitozan/VEGFA shRNA, protamin/VEGFA shRNA kitozan/protamin/VEGFA shRNA kompleksleri ile VEGFA shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlarda; kompleks oluşumu incelenmiş, partikül boyutu, yüzey yükü ölçümleri, elektron mikroskobu (TEM, SEM) incelemeleri, serum ve nükleaz stabiliteleri, in vitro stabilite, in vitro salım, in vitro transfeksiyon ve in vitro sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır.

Kitozan/shRNA komplekslerinin hazırlanmasında denenen 0.5/1, 1/1 ve 2/1 (a/a) ağırlık oranlarında kitozan ile shRNA arasında tam kompleks oluşumu gözlenmiştir (**Resim 6.3.1**). Kısmi kompleks oluşumu göstergesi olarak kabul edilen serbest shRNA bandına rastlanmamıştır. shRNA'nın DNA molekülüne spesifik floresan bir boya olan etidyum bromür ile bağlanma eğilimi, kompleks oranı ile ters orantılı olarak değişmektedir ve jel elektroforezi sonrası UV transillüminatörde jellerin incelenmesi sırasında düşük kompleks oranlarında daha yüksek yoğunlukta floresan göstermeleri ile de tesbit edilebilmektedir.

Protamin kullanılarak oluşturulan komplekslerde; kompleks oluşturma oranı, zamana bağlı kompleksasyon, farklı çözücülerin etkisi ve liyofilizasyonun etkisi araştırılmıştır.

Protamin/shRNA komplekslerinde, 0.1/1.0 ve 0.25/1.0 ağırlık oranlarında kısmi kompleks oluşumu meydana gelmiş ve jelde serbest shRNA gözlenmiştir. Serbest shRNA miktarı 0.1/1.0 kompleks oranında 0.25/1.0 kompleks oranına kıyasla daha fazladır. 0.50/1.0 kompleks oranından itibaren ise jelde serbest shRNA gözlenmemiş ve kullanılan 0.50/1.0, 1.0/1.0, 2.0/1.0 oranlarında tam kompleks oluşumu meydana gelmiştir (**Resim 6.3.2.**).

Protamin/shRNA tam kompleks oluşumunun gözlemlendiği 0.5/1.0 ve 1.0/1.0 oranlarında protamin/shRNA kompleksleri, ddH₂O ve PBS tamponu yanı sıra çözücü olarak serum fizyolojik, %5.0 glukoz çözeltisi ve 10mM Asetat tamponu kullanılarak da hazırlanmıştır. Farklı çözücülerin protamin/shRNA kompleks oluşumu üzerinde negatif yönde bir etkisi gözlenmemiştir. Tez çalışmamız kapsamında in vitro transfeksiyon çalışmaları da düşünülerek fizyolojik ortama en uygun çözücünün PBS olduğuna karar verilmiş ve bundan sonraki bütün protamin/shRNA komplekslerinin hazırlanmasında çözücü olarak PBS kullanılmıştır (**Resim 6.3.3. ve 6.3.4.**).

Protamin/shRNA kompleks oluşumunda zaman etkili bir faktördür. Zamana bağlı olarak kompleks oluşumunun daha stabil bir şekilde meydana geldiği, kompleks oluşum süresi olarak 30 dakikanın denendiği örneklerde kullanılan

oranlarda kısmi kompleks oluşumunun (özellikle 0.5/1, protamin/shRNA) meydana geldiği saptanmıştır. Kompleks oluşum süresi arttırıldığında ise kullanılan bütün oranlarda tam kompleks oluşumu gözlenmiştir (**Resim 6.3.5.**). Zamana bağlı kompleks oluşumu (30, 60 ve 120 dakika) optimize edilmiştir ve protamin/shRNA komplekslerinde kompleks oluşum süresi olarak 60 dakika kullanılmıştır.

Liyofilizasyonun etkisinin araştırılması amacı ile farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan protamin/shRNA kompleksleri liyofilizasyon öncesi ve sonrası agaroz jel elektroforezi yöntemi ile değerlendirilmiştir. Liyofilizasyon sonrasında 0.5/1.0 oranındaki protamin/shRNA komplekslerinde açılma meydana gelmiş ve jelde serbest shRNA ile kısmi kompleks oluşumu gözlenmiştir. 1.0/1.0 oranında hazırlanan komplekslerde ise bir değişme saptanmamıştır. Çözücülerin liyofilizasyon sürecine etkisine ilişkin olarak; 0.5/1.0 oranında serum fizyolojik ile hazırlanan komplekslerde açılma diğer çözücülere kıyasla daha düşük düzeyde meydana gelmiştir (**Resim 6.3.6.**).

Farklı molekül ağırlığına sahip kitozan kullanılarak hazırlanan kitozan/protamin/shRNA komplekslerinde **Resim 6.3.7.**'de de görüldüğü gibi kompleks oluşumu ve etidyum bromür bağlama spesifitesi kitozan oranındaki artış ile doğru orantılı olacak şekilde artmıştır. Elektroforetik yöntem ile farklı molekül ağırlığına sahip kitozan kullanılarak hazırlanan kompleksler arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Protamin/shRNA kompleks yapısına kitozan ilave edilmesi sonucunda daha stabil kompleksler elde edilmiştir.

Sonuç olarak, shRNA molekülü hem kitozanla hem de protaminle kompleks oluşturma özelliğindedir, ancak kompleks oluşturmak için gereken kitozan ve protamin oranları farklıdır. DNA'nın aksine ⁽¹⁰⁶⁾, RNA ile stabil polipeks oluşturmak için yüksek molekül ağırlıklı ve yüksek oranda polikasyon gerekliliği literatürde kayıtlıdır ⁽¹¹⁶⁾. Pekçok yayında artan polimer içeriğine bağlı olarak (yüksek N/P) nanopartikül stabilitesi ve in vitro ve in vivo olarak artan gen susturma arasındaki ilişkiye dikkat çekilmiştir ^(76, 167). Sonuçta kitozan/shRNA ve protamin/shRNA ile ilgili verilerimiz literatür ile uyumludur.

Transmisyon elektron mikroskopisi çalışması ile kitozan/VEGFA shRNA ve protamin/VEGFA shRNA komplekslerinin globüler yapıda olduğu ve homojen bir dağılım gösterdiği görülmüştür (**Resim 6.3.8.** ve **6.3.9.**). Kitozan/protamin/VEGFA shRNA komplekslerinin protamin/VEGFA shRNA komplekslerinden daha homojen görünümde olduğu gözlemlenmiştir. TEM verileri kitozanın pDNA ile kompleks oluşturmaya ilişkin veriler ile uyumluluk göstermektedir ⁽⁸⁸⁾.

siRNA taşıyıcı komplekslerin partikül boyutlarının küçük olması, hücrelere endositozis yoluyla taşınmasında kolaylık sağlamaktadır. Çalışmamızda farklı molekül ağırlıklarına sahip kitozan ve protamin ile hazırlanan komplekslerde partikül büyüklüğü, kitozan/VEGFA shRNA komplekslerinde (236.80 ± 10.15) – (365.77 ± 10.12) nm, protamin/VEGFA shRNA komplekslerinde (221.15 ± 5.26) – (293.35 ± 12.22) nm ve kitozan/ protamin/VEGFA shRNA komplekslerinde ise (287.52 ± 9.51) – (401.28 ± 14.56) nm arasında değişmektedir (**Tablo 6.3.1.**). En küçük boyuttaki kompleksler protamin/VEGFA shRNA kompleksleridir. Kitozan/VEGFA shRNA ve kitozan/protamin/VEGFA shRNA komplekslerinde partikül büyüklüğü kullanılan kitozanın molekül ağırlığı ile doğru orantılı olacak şekilde artmaktadır ($p < 0.05$). Kullanılan polimerler ve yöntem ile özellikle in vitro transfeksiyon çalışmalarında kullanıma uygun istenilen boyutta kompleksler elde edilmiştir.

siRNA'ların viral olmayan taşıyıcılarla hücrelere taşınmasında, taşıyıcının yüzey yükü de çok önemlidir. Hücre membranları fizyolojik koşullarda negatif yüklü olduğu için pozitif yüklü taşıyıcılara gerek duyulmaktadır. Yüzey yükü, kitozan/shRNA komplekslerinde (8.32 ± 2.14) – (28.11 ± 3.76) mV, protamin/shRNA komplekslerinde (-12.51 ± 5.21) – (13.18 ± 2.56) mV ve kitozan/protamin/ shRNA komplekslerinde ise (8.71 ± 1.65) – (21.22 ± 3.28) mV arasında değişmektedir (**Tablo 6.3.1.**). -70 mV yüzey yükü potansiyele sahip shRNA molekülü, kitozan ve protaminle kompleks oluşturduğu zaman yüzey yükü pozitif değer aralığında artmıştır.

Komplekslerin nükleaz ve serum stabilitesi, siRNA'nın in vivo ve in vitro etkinliği için gereklidir. Stabil protamin/kitozan/pDNA kompleksleri endozomal kompartmanlarda DNA'nın korunması açısından önemlidir, fakat bu durum nükleusa DNA'nın girişini sınırlar ve sonuçta düşük gen ekspresyonu oluşturur. Bu nedenle siRNA'nın biyolojik fonksiyonu için hücreye girişı ve korunması arasında yeterli bir dengenin sağlanması önemlidir ⁽⁹⁰⁾.

Protamin/VEGFA shRNA (1/1, a/a) komplekslerinde, kompleks yapısı serum varlığında 24 saat süresince stabil kalmış, 48. saatte kompleks yapısında kısmi açılmayı takiben 72. saatte degradasyon gözlenmiştir (**Resim 6.3.10.**). Protamin, shRNA'yı serum ve serum komponentlerinin enzimatik etkisine karşı başarılı bir şekilde korumuştur.

Protamin/VEGFA shRNA (1/1, a/a) komplekslerinde, nükleaz muamelesi sonrası kompleks yapısı 72 saat süresince stabil kalmıştır (**Resim 6.3.11.**). Protamin, shRNA'yı nükleaz cinsi enzimlere karşı başarılı bir şekilde korumuştur. Serbest shRNA'nın nükleaz ile muamelesi sonrasında ise belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde 0. dakikadan itibaren shRNA'nın tamamen deşre olduğu gözlenmiştir.

shRNA'lar katyonik polimerler ile formüle edilerek nano boyutta partiküller oluşturulabilir. Nanopartiküller nükleazlara karşı shRNA'yı korur ve partikül boyutu yaklaşık 200 nm olduğunda shRNA'lar bozunmadan endositoz ile hücrelere kolaylıkla geçebilir ⁽⁹⁹⁾. Tez kapsamında kitozan temelli diğeri bir farmasötik şekil olarak VEGFA shRNA yüklü kitozan/TPP nanopartikülleri hazırlanmıştır.

Nanopartikül formülasyonlarının, transmission elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemeleri sonuçlarına göre; çalışılan yöntem ile istenilen özelliklerde, küresel kitozan nanopartiküller elde edilmiştir (**Resim 6.4.1., 6.4.2., 6.4.3. ve 6.4.4.**).

Kitozan nanopartikül formülasyonlarında, % verim ve % enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda; formülasyon veriminin,

% 92.2 ± 1.0 ile % 97.8 ± 1.0 (L formülasyonlarında; % 93.3 – 96.5, M formülasyonlarında; % 93.3 – 97.8, ve H formülasyonlarında ise % 92.2 – 92.8) değerleri arasında değiştiği, % enkapsülasyon etkinliğinin ise, % 89.7 ± 1.0 ile % 98.6 ± 1.6 (L formülasyonlarında; % 89.7 - 98.6, M formülasyonlarında; % 89.9 – 95.7 ve H formülasyonlarında ise % 91.7 – 94.2) değerleri arasında değiştiği saptanmıştır (**Tablo 6.4.1.**). Sonuç olarak, tez kapsamında kullanılan yöntem ile istenilen derecede yüksek verim ve enkapsülasyon etkinliği değerlerine sahip kitozan ve shRNA içeren kitozan nanopartiküller elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Partikül boyutu ve yüzey yükü nükleik asitlerin hücreye transferi ve dağılımında yukarıda belirtildiği gibi en önemli faktörlerden birisidir. Diğer taraftan gen taşıyıcı sistemin hücrelere alımı ve endozomdan serbestleşmesi hücre içerisinde önemli hız kısıtlayıcı kademelerdir ⁽⁴⁹⁾.

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutunun, 209.05 ± 10.71 nm ile 315.60 ± 10.55 nm arasında değiştiği saptanmıştır (**Tablo 6.4.2.**). Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında, partikül boyutu üzerinde kullanılan farklı kitozanların molekül ağırlığı ile ilave edilen shRNA miktarının etkili parametreler olduğu belirlendi. Kitozan nanopartikül formülasyonlarında partikül boyutu, kitozan molekül ağırlığı ve ilave edilen shRNA miktarı ile doğru orantılı olarak değişmektedir. (L formülasyonlarında; 209.05 – 289.51 nm, M formülasyonlarında; 218.87 – 315.60 nm ve H formülasyonlarında; 236.51 – 272.85 nm). Partikül boyutu ölçüm sonuçlarının, istatistiksel analizi anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Kullanılan yöntem ile hazırlanan, shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonlarının tamamında, yüzey yük değerlerinin pozitif (+) değer aralığında 8.14 ± 1.0 mV ile 24.01 ± 1.2 mV arasında değiştiği saptandı.

Literatürde sınırlı sayıda yer alan kitozan çalışmalarının hemen hemen tümü kitozan/siRNA kompleks ve nanopartikülleri ile ilgilidir. Bunlar arasında Katas ve Alpar ⁽⁹⁹⁾ iki farklı kitozan (kitozan HCl ve glutamat) ve tripolifosfat kullanarak iki

farklı metotla (iyonik çapraz bağlama ve iyonik jelasyon) kitozan nanopartiküller hazırlamışlardır ⁽⁹⁹⁾. Yaklaşık 500 nm boyutunda, %72-90 enkapsülasyon etkinliğine sahip nanopartikülleri, CHO K1 ve HEK293 hücre hatlarında in vitro transfeksiyon etkinliği ve gen baskılama açısından denemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda yaklaşık olarak %20 ile %40 arasında gen inhibisyonu elde etmişlerdir. Benzer şekilde Howard ve ark. da 350-400 nm boyutlarında hazırladıkları nanopartikülleri NIH 3T3 hücre hattının in vitro transfeksiyonunda denemişler ve %66.4 ile %86.9 arasında gen inhibisyonu elde etmişlerdir ⁽⁸²⁾. Kitozan ve TPP kullanarak iyonik jelasyon yöntemi ile VEGFA shRNA nanopartikülleri hazırladığımız tez çalışmamızda ise, Katas ve Alpar ile Howard ve ark.'nın sonuçlarına kıyasla daha küçük 500 nm'nin altında (ortalama 200-300 nm) ve %89.7 ile %98.2 enkapsülasyon etkinliği değerlerine sahip nanopartiküller elde edilmiştir (**Tablo 6.4.1.**).

Tablo 6.4.1.'de de görüldüğü gibi nanopartikül boyutlarımız, Katas ve Alpar ile Howard ve ark.'dan daha küçüktür ve % enkapsülasyon etkinliği değerlerimiz de Katas ve Alpar ile Howard ve ark.'nın çalışmalarında elde ettikleri değerlerden daha yüksektir.

Hazırlanan nanopartikül formülasyonları ile 2 ay süresince kontrollü bir salım profili elde edilmiştir (**Şekil 6.4.1 - 6.4.19.**). Formülasyonlardan shRNA'nın in vitro salımında kullanılan kitozanın molekül ağırlığı etkili bir parametredir. Düşük molekül ağırlıklı kitozan (70 kD) kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan shRNA'nın salımı orta ve yüksek molekül ağırlıklı kitozan (400 kD ve 750kD) kullanılarak hazırlanan formülasyonlara kıyasla daha hızlı ve kısa sürede gerçekleşmektedir. Düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılan L₁ ve L₂ formülasyonlarında salım 25-30, orta molekül ağırlıklı kitozan kullanılan M₁ ve M₂ formülasyonlarında salım 35-40 ve yüksek molekül ağırlıklı kitozan kullanılan H₁ ve H₂ formülasyonlarında ise 50-65 gün arasında tamamlanmaktadır. Nanopartiküllerden shRNA salımında kitozanın molekül ağırlığı kadar ilave edilen shRNA miktarı da önemli bir parametredir. shRNA salımı formülasyonda kullanılan shRNA miktarı ile doğru orantılı olacak şekilde artmaktadır.

Nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* stabilitesinin incelenmesi çalışmaları; 3. ay sonunda partikül büyüklüğü ve yüzey yükü ölçüm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümlerde; +4°C’da bekletilen örneklerde partikül boyutunun, 210.11 ± 12.51 nm ile 311.66 ± 14.50 nm, 37°C’da bekletilen örneklerde ise 214.12 ± 10.45 nm ile 308.58 ± 12.95 nm arasında değiştiği saptanmıştır. Nanopartikül formülasyonlarında yüzeyel yük ölçümleri ise +4°C’da bekletilen örneklerde 8.66 ± 1.4 mV ile 21.10 ± 1.2 mV, 37°C’da bekletilen örneklerde 9.05 ± 1.2 mV ile 20.52 ± 1.1 mV olarak elde edilmiştir (**Tablo 6.4.3.**). 3.ay *in vitro* stabilite çalışması sonrası elde edilen partikül boyutu ve yüzey yükü ölçüm değerlerinin başlangıç değerleri ile anlamlı bir farklılık göstermediği yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu saptanmıştır ($p>0.05$).

In vitro salım profilinde, ilk günlerde bir patlama etkisi (burst-effect) gözlenmiştir (%10-20). Nanopartiküllerden shRNA salımı uzun süreli ve kontrollü bir şekilde devam etmiştir. *In vitro* stabilite ve *in vitro* salım çalışmaları sonucunda +4°C’da 3 ay süre ile bekletilen nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu, yüzey yük değerleri ve *in vitro* salım profillerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır ($p>0.05$). Nanopartikül formülasyonları +4°C’da stabildir. 37°C’da bekletilen formülasyonlarda ise partikül boyutu ve yüzey yük değerleri anlamlı düzeyde değişmemiştir ($p>0.05$). Ancak formülasyonların *in vitro* salım profillerinde salımı hızlandırıcı yönde bir artış söz konusudur. Salım hızı artmış ve buna bağlı olarak salım süresi kısalmıştır ($p<0.05$).

In vitro serbestleşen shRNA örneklerinin elektroforetik incelemelerinde; kitozan nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması, santrifügasyon, liyofilizasyon ve *in vitro* salım çalışmaları sonrasında, formülasyona ilave edilen shRNA’da yapısal form olarak herhangi bir değişimin meydana gelmediği saptanmıştır. *In vitro* salım çalışmaları serbestleşen shRNA’nın, yapısal olarak başlangıçtaki (shRNA izolasyonu sonrası) % 100 kapalı halkasal (süper sarmal) formunu muhafaza ettiği ve *in vitro* salım çalışmaları esnasında serbestleşen shRNA’da, kompleks oluşumunun söz konusu olmadığı tesbit edilmiştir.

Nanopartikül stabilitesi ekstrasellüler shRNA korunması için gereklidir. İnaktive edilmemiş fetal bovin serum ile muamele edilen kitozan nanopartikül formülasyonlarında; zamana ve serum oranına bağlı herhangi bir degradasyon gözlenmedi. shRNA'nın serum ve serum bileşenlerinin enzimatik aktivitesinden 72 saat süresince korunduğu tesbit edildi. Serbest shRNA'nın nükleaz muamelesi sonucu tamamen degrede olduğu buna karşın nükleaz (DNAaz I) stabilitesi çalışmalarında; inkübasyon ortamından 1., 24., 48. ve 72. saatlerde alınan numunelerde, zamana bağlı shRNA degradasyonunun meydana gelmediği saptanmıştır. Kitozan nanopartikül formülasyonlarında shRNA'nın, 72 saat süresince nükleaz (DNAaz I) cinsi enzimlerin enzimatik aktivitesinden korunduğu tesbit edilmiştir (**Resim 6.4.6.**).

Kompleks ve nanopartikül formülasyonları ile yapılan in vitro transfeksiyon çalışmasında 3 farklı hücre hattı kullanılmıştır. Bunlar; HEK 293, HeLa ve MCF-7 hücreleridir. Bu hücrelerden sonuncusu insan meme kanseri hücresi olup özellikle seçilmiştir. Formülasyonların hücreye transferleri plazmidin taşıdığı GFP seleksiyon marker geninin ekspresyonu ile floresan mikroskopta izlenmiştir (**Resim 6.6.1., 6.6.2., 6.6.3., 6.6.4., 6.6.5. ve 6.6.6.**).

0.5/1, 1/1 ve 2/1 ağırlık oranlarında hazırlanan protamin/shRNA komplekslerinde maksimum GFP ekspresyonu 2/1 ağırlık oranındaki kompleksler ile HEK293 hücre hattında elde edilmiştir. HEK293 hücre hattının kullanıldığı in vitro transfeksiyon çalışmalarında in vitro transfeksiyon etkinliği açısından daha başarılı sonuçlar alınmıştır. GFP gen ekspresyonu açısından HEK293 hücre hattını HeLa ve MCF-7 takip etmektedir (**Resim 6.6.1., 6.6.2. ve 6.6.3.**). Kitozan ve protaminin kombine olarak kullanıldığı kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmaları transfeksiyon etkinliği yüksek HEK293 hücre hattında gerçekleştirilmiştir. 0.5/1/1 ve 1/1/1 ağırlık oranlarında hazırlanan kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmalarında; düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan kompleks formülasyonları ile yüksek düzeyde GFP ekspresyonu saptanmıştır. 1/1/1 ağırlık oranında hazırlanan kompleksler ile elde edilen GFP gen ekspresyonu 0.5/1/1 oranındaki komplekslere

kıyasla daha fazladır. En düşük düzeyde transfeksiyon etkinliği ve GFP ekspresyonu yüksek molekül ağırlığına sahip kitozan kullanılarak hazırlanan kompleks formülasyonlarında görülmüştür (**Resim 6.6.4.** ve **6.6.5.**).

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile gerçekleştirilen in vitro transfeksiyon çalışmalarında da HEK293 hücre hattı kullanılmıştır. GFP ekspresyonu kitozanın molekül ağırlığı ile ters orantılı olacak şekilde L₂ formülasyonu ile en yüksek düzeyde H₂ formülasyonu ile en düşük düzeyde meydana gelmiştir (**Resim 6.6.6.**).

İn vitro transfeksiyon etkinliği ve GFP ekspresyonu açısından kompleks ve nanopartikül formülasyonları kıyaslandığında, kompleks formülasyonları ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

İn vitro transfeksiyon çalışmalarında shRNA kompleksleri ile VEGF gen inhibisyonu üç farklı hücre hattında incelenmiştir (**Şekil 6.6.2.** ve **6.6.3.**). shRNA kompleksleri ile in vitro transfeksiyon çalışmalarında: HeLa hücre hattında; protamin/shRNA kompleksleri ile 2/1 ağırlık oranında % 55.11, düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan 2/1 ağırlık oranındaki kitozan/shRNA kompleksleri ile % 50.05 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir. Her iki polimerin kombine kullanıldığı kitozan/protamin/shRNA ile transfeksiyon çalışmalarında ise her bir polimerin tek tek taşıyıcı sistem olarak kullanıldığında elde edilen gen inhibisyon değerinin yaklaşık olarak iki katı oranında gen inhibisyonu elde edilmiştir (% 92.8). HEK293 hücre hattında; protamin/shRNA kompleksleri ile 2/1 ağırlık oranında % 78.53, düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan 2/1 ağırlık oranındaki kitozan/shRNA kompleksleri ile % 61.02 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir. Kitozan/protamin/shRNA ile ise % 98.59 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir ve bu değer de HeLa hücre hattında olduğu gibi her iki polimerin tek tek kullanıldığında elde edilen maksimum gen inhibisyonu değerinin çok üstündedir. MCF-7 hücre hattında ise; protamin/shRNA (% 79.24) ve kitozan/shRNA (%78.98) kompleksleri ile yakın gen inhibisyonu (p>0.05) elde edilmiştir. Her iki polimerin kombine kullanıldığı kitozan/protamin/shRNA ile

transfeksiyon çalışmalarında ise % 85.22 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir (Şekil 6.6.2. ve 6.6.3.).

Tez çalışması kapsamında hazırlanan kitozan/shRNA, protamin/shRNA ve kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile HeLa, HEK293 ve MCF-7 hücre hatlarında yüksek düzeyde gen inhibisyonu sağlanmıştır. Kompleks formülasyonunda kullanılan kitozanın molekül ağırlığı in vitro transfeksiyon ve gen inhibisyonu açısından önemli bir parametredir. Düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak hazırlanan kompleks formülasyonları ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir (HEK293 hücre hattında düşük molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak 1/2/1 ağırlık oranında hazırlanan kitozan/protamin shRNA kompleksleri ile %98.59, orta molekül ağırlıklı kitozan kullanılarak 1/2/1 ağırlık oranında hazırlanan kitozan/protamin shRNA kompleksleri ile %78.53). En yüksek susturma etkinliği çoğalma hızı fazla olan insan embriyonik böbrek kültürü hücresi HEK 293’de gözlenmiştir. Bu farklılığın hücrede bulunan VEGF reseptör sayısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kullanılan hücre hatları gen inhibisyonu açısından HEK293>HeLa>MCF-7 şeklinde bir sıralama ve floresan mikroskobu değerlendirmeleri ile korelasyon göstermektedir ($p<0.05$) (Şekil 6.6.2. ve 6.6.3.).

shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile VEGF gen inhibisyonu çalışmalarında (Şekil 6.6.4. ve 6.6.5.): Hela hücre hattında; maksimum gen inhibisyonu düşük molekül ağırlıklı kitozanın kullanıldığı L₃ formülasyonu ile elde edilmiştir (% 92.23). M₃ formülasyonu ile maksimum gen inhibisyonu %79.97, H₂ formülasyonu ile maksimum gen inhibisyonu ise % 34.91’dir. HEK293 hücre hattında; L₃ formülasyonu ile % 99.75, M₃ formülasyonu ile % 87.62 ve H₂ fomülasyonu ile % 33.80 düzeyinde gen inhibisyonu elde edilmiştir. MCF-7 hücre hattında nanopartikül formülasyonları ile gerçekleştirilen in vitro transfeksiyon çalışmalarında ise Hela ve HEK293 hücre hattında elde edilen gen inhibisyonu değerlerine kıyasla daha düşük olmakla birlikte L₃ formülasyonu ile % 90.35, M₃ formülasyonu ile % 80.21, H₂ formülasyonu ile % 33.89 düzeyinde VEGF gen inhibisyonu elde edilmiştir ($p<0.05$).

Kullanılan hücre hatlarında VEGFA shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile yüksek düzeyde gen inhibisyonu sağlanmıştır. Nanopartikül formülasyonlarında kullanılan kitozanın molekül ağırlığı ve formülasyona ilave edilen shRNA miktarı etkili parametrelerdir. Kullanılan hücre hatları gen inhibisyonu açısından HEK293>HeLa>MCF-7 şeklinde bir sıralama ve floresan mikroskobu değerlendirmeleri ile korelasyon göstermektedir (Şekil 6.6.4. ve 6.6.5.). Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları **Tablo 6.6.5., 6.6.6. ve 6.6.7.**'de verilmiştir.

Tan ve ark.'ları ⁽¹⁸⁰⁾, kuantum dotta enkapsüle olan HER2siRNA konjuge kitozan nanopartiküllerinin SKBR3 ve MCF-7 hücresinde inhibisyon özelliğini incelemişler ve SKBR3'de HER2 proteininin daha fazla eksprese olduğunu saptamışlardır.

Chono ve ark.'larının yaptıkları çalışmada, serbest siRNA'nın gen susturma etkisi görülmemektedir, çünkü hücre membranı aracılığıyla siRNA geçirgenliği çok düşüktür. Bu bulgu in vitro intrasellüler siRNA taşıma çalışmamız ile uyumludur ⁽⁴³⁾.

Hücreler arasında susturma etkinliği açısından görülen bu farklılığın hücrelerin reseptör içeriği ve intrasellüler taşınma mekanizmalarının farklılığından kaynaklandığına ilişkin hipotezler literatürde mevcuttur ^(99, 180).

Kitozan/VEGFA shRNA, protamin/VEGFA shRNA, kitozan/protamin/VEGFA shRNA kompleks ve VEGFA shRNA içeren nanopartikül formülasyonları ile in vitro transfeksiyon çalışmaları kapsamında kullanılan polimerler ile hazırlanan formülasyonların sitotoksitesi MTT yöntemi ile araştırıldı.

Kitozan/VEGFA shRNA, protamin/VEGFA shRNA ve kitozan/protamin/VEGFA shRNA komplekslerinin sitotoksitesinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan polimerler ve bu polimerler ile hazırlanan komplekslerin hücreler için toksik bir etki göstermediği aksine hücre proliferasyonunu teşvik ettiği saptanmıştır (1µg kitozan; % 134, 2µg protamin; %

164, 0.5/0.5/1 ağırlık oranında kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile % 130) (Şekil 6.7.1., 6.7.2. ve 6.7.3.).

İn vitro transfeksiyon çalışmaları kapsamında kompleks formülasyonları ile gerçekleştirilen sitotoksitenin belirlenmesine yönelik çalışmalara paralel olarak VEGFA shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile de sitotoksite çalışmaları yapılmıştır. Nanopartikül formülasyonları ile sitotoksite çalışmalarında da kullanılan polimer ve hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının hücreler üzerinde sitotoksik bir etkisi saptanmamıştır (Şekil 6.7.4., 6.7.5. ve 6.7.6.).

Sitotoksite çalışmaları sonuçlarına göre kullanılan polimerler ile hazırlanan formülasyonların kullanılan hücre hatları üzerinde toksik herhangi bir etkisinin olmadığı ve hücre proliferasyonunu inhibe edici bir etki göstermediği saptanmıştır. Sitotoksite çalışmalarında elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları anlamlıdır ($p < 0.001$).

Kısaca özetleyecek olursak;

- 221-401 nm boyutlarında VEGFA shRNA kompleksleri ile 209-316 nm boyutlarında VEGFA shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır.
- Hazırlanan farmasötik şekillerde taşıyıcı sistem olarak kullanılan kitozan ve protamin, shRNA'yı serum ve nükleaz degradasyonuna karşı başarılı bir şekilde korumuştur.
- Hazırlanan shRNA içeren kitoza/TPP nanopartikül formülasyonları ile uzun süreli kontrollü bir salım elde edilmiştir.
- +4°C ve 37°C ' da gerçekleştirilen in vitro stabilite çalışmasında partikül boyutu ve yüzey yükünün değişmediği, 37°C 'da bekletilen örneklerde shRNA salım hızının arttığı saptanmıştır.

- İn vitro transfeksiyon çalışmalarında; en yüksek düzeyde VEGF gen inhibisyonu kitozan/protamin/shRNA kompleksleri ile elde edilmiştir (%98.59). Kompleks formülasyonları ile VEGF gen inhibisyonu açısından kullanılan hücre hatları HEK>HeLa>MCF-7 şeklinde bir sıralama göstermektedir.
- shRNA içeren kitozan/TPP nanopartikül formülasyonları ile in vitro transfeksiyon çalışmalarında en yüksek düzeyde VEGF gen inhibisyonu düşük molekül ağırlıklı kitozanın kullanıldığı L3 formülasyonu ile elde edilmiştir (%92.23). Nanopartikül formülasyonunda kullanılan kitozanın molekül ağırlığı ve ilave edilen shRNA miktarı, transfeksiyon etkinliği açısından önemli parametrelerdir. Nanopartikül formülasyonları ile VEGF gen inhibisyonu açısından kullanılan hücre hatları kompleks formülasyonlarında olduğu gibi HEK>HeLa>MCF-7 şeklinde bir sıralama göstermektedir.
- İn vitro sitotoksosite çalışmaları sırasında kullanılan polimerler ile hazırlanan formülasyonların hücreler üzerinde toksik herhangi bir etkisinin olmadığı, hücre proliferasyonunu inhibe edici bir etki göstermediği aksine teşvik edici yönde etki ettiği saptanmıştır.

Sonuç olarak kitozan ve/veya protamin-esaslı taşıyıcı sistemler ile VEGFA shRNA'nın başarılı bir şekilde formülasyonu, etkin bir gen transferi ve inhibisyonu mümkündür. Elde edilen veriler, RNAi teknolojisinde shRNA stabilitesi ve transferi çalışmalarına önemli ölçüde katkıda bulunacak niteliktedir.

8. KAYNAKLAR:

1. Aagaard L, Rossi JJ. (2007). RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*, 59:75–86.
2. Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Déglon N, Pralong W, Aebischer P. (2002). Entiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther*, 13 (18):2197-201.
3. Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. (2003). RNA interference: Biology, mechanism and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4): 657-685.
4. Aigner A. (2006). Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of Biotechnology*., 124 (1):12-25.
5. Akbuğa J, Özbaş-Turan S, Erdoğan N. (2004). Plasmid-DNA loaded chitosan microspheres for in vitro IL-2 expression. *Eur J Pharm Biopharm*, 58(3): 501-507.
6. Akbuğa J. (1995). A Biopolymer:Chitosan. *Int J Pharm Adv*, 1:3-18.
7. Akhtar S, Benter I. (2007). Toxicogenomics of non-viral drug delivery systems for RNAi: Potential impact on siRNA-mediated gene silencing activity and specificity . *Adv Drug Deliv Rev*, 59 (2-3): 164-82.
8. Al-Abd AM, Lee SH, Kim SH, Cha JH, Park TG, Lee SJ, Kuh HJ. (2009). Penetration and efficacy of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles in a human solid tumor model in vitro. *J Control Release*, 137: 130–135.
9. Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D. (2004). Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1654 (1): 39-49.
10. Almeida R, Allshire RC. (2005). RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol.*, 15(5): 251-258.
11. Amor D. (2001). Gene therapy:Principles and potential applications. *Aust Family Phys.*, 30(10):953-958.
12. Andersen MQ, Howard KA, Paludan SR, Besenbacher F, Kjems J. (2008). Delivery of siRNA from lyophilized polymeric surfaces. *Biomaterials*, 29(4): 506-512.

13. Ando S., Putnam D., Pack D.W., Langer R.(1999). PLGA microspheres containing plasmid DNA: preservation of supercoiled DNA via cryopreparation and carbohydrate stabilization. *J. Pharm. Sci.*, 88(1): 126-130.
14. Aral C, Özbaş-Turan S, Kabasakal L, Keyer-Uysal M, Akbuğa J.(2000). Studies of effective factors of plasmid DNA-loaded chitosan microspheres I. plasmid size, chitosan concentration and plasmid addition techniques. *S.T.P. Pharm. Sci.*,10(1): 83-88.
15. Aukunuru JV, Ayalasomayajula SP, Kompella UB. (2003). Nanoparticle formulation enhances the delivery and activity of a vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human retinal pigment epithelial cells. *J Pharm Pharmacol*, 55(9): 199-206.
16. Bao H, Li L, Zhang H. (2008). Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan–TPP nanoparticles in aqueous solutions. *J Colloid Interface Sci*, 328:270–277.
17. Barquinero J, Eixarch H, Pérez-Melgosa M. (2004). Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther*, 11(Suppl 1): S3-9.
18. Barton GM, Medzhitov R. (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (23):14943-14945.
19. Bayat A, PhD, Larijani B, MD, Ahmadian S, PhD, Junginger HE, PhD, Rafiee-Tehrani M, PhD. (2008). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives. *Nanomedicine: NBM* 4, 115–120.
20. Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A and Malvy C. (2002). Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 296 (4):1000–1004.
21. Biegeleisen K. (2006). The probable structure of the protamine-DNA complex. *J Theor Biol*, 241:533-540.
22. Bikfalvi A. (2003). Recent insights in the regulation of angiogenesis and its role in health and disease. *Trakia Journal of Sciences*, 1(1):1-4.
23. Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids Res*, 7(6):1513-1522.

24. Borchard G. (2001). Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 52:145-150.
25. Borges O, Silva M, de Sousa A, Borchard G, Junginger HE, Cordeiro-da-Silva A. (2008). Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. *Int Immunopharmacol*, 8:1773–1780.
26. Bozkır A, Saka OM. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency. *J Drug Target*, 12(5): 281-288.
27. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
28. Brooks PC, Siletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA. (1998). Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, 92(3):391-400.
29. Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila Jato JL, Alonso MJ. (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.*, 14:431-443.
30. Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji RW, Folkman J. (1998). Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J Clin Invest*, 101(5):1055–63.
31. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysen B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 98 (2):147–157.
32. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*, 5(5):495-502.

33. Carmeliet P. (1999). Developmental biology. Controlling the cellular brakes. *Nature*, 401(6754):657-58.
34. Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6): 653–60.
35. Carmell MA, Hannon GJ. (2004). RNAase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol.*, 11(3): 214-218.
36. Castanotto D, Sakurai K, Lingeman R, Li H, Shively L, Aagaard L, Soifer H, Gatignol A, Riggs A, Rossi JJ. (2007). Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res.*, 35(15): 5154-5164.
37. Chang KB, Tai MC, Cheng FH. (2001). Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem*, 49:4845-4851.
38. Chaterji S, Kwon Il K, Park K. (2007). Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices. *Prog. Polym. Sci.*, 32(8-9):1083–1122.
39. Chen F, Zhang Z-R, Yuan F, Qin X, Wang M, Huang Y. (2008). *In vitro* and *in vivo* study of *N*-trimethyl chitosan nanoparticles for oral protein delivery. *Int J Pharm*, 349:226–233.
40. Cheng H, Li Y-Y, Zeng X, Sun Y-X, Zhang X-Z, Zhuo R-X. (2009). Protamine sulfate/poly(L-aspartic acid) polyionic complexes self-assembled via electrostatic attractions for combined delivery of drug and gene. *Biomaterials*, 30:1246–1253.
41. Chicas A, Macino G. (2001). Characteristics of post-transcriptional gene silencing. *EMBO Rep.*, 2(11): 992-996.
42. Choi Y-S, Lee JY, Suh JS, Kwon Y-M, Lee S-J, Chung J-K, Lee D-S, Yang VC, Chung C-P, Park Y-J. (2010). The systemic delivery of siRNAs by a cell penetrating peptide, low molecular weight protamine. *Biomaterials*, 31:1429-1443.
43. Chono S, Li SD, Conwell C, Huang L. (2008). An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor. *J Control Release*, 131: 64-69.

44. Choung S, Kim YJ, Kim S, Park HO, Choi YC. (2006). Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. *Biochem Biophys Res Commun*, 342(3):919-927.
45. Convertine AJ, Benoit DSW, Duvall CL, Hoffman AS, Stayton PS. (2009). Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery. *J Control Release*, 133:221-229.
46. Corsi K, Chellat F, Yahia L'H, Fernandes JC. (2003). Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials*, 24:1255–1264.
47. De Martimprey H, Vauthier C, Malvy C, Couvreur P. (2008). Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA. *Eur J Pharm Biopharm*, 71(3):490-504.
48. Detmar M. (2000). Tumor angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 5(1):20-3.
49. Dinauer N, Lochmann D, Demirhan I, Bouazzaoui A, Zimmer A, Chandra A, Kreuter J, von Briesen H. (2004). Intracellular tracking of protamine/antisense oligonucleotide nanoparticles and their inhibitory effect on HIV-1 transactivation. *J Control Release*, 96:497-507.
50. Dinauer N, Lochmann D, Demirhan I, Chandra A, Zimmer A, von Briesen H. (2002) Enhancement of HIV-1 antisense effect using protamine-based nanoparticles. *Int Conf AIDS*, 14.
51. Donovan EA, Kummar S. (2006). Targeting VEGF in Cancer Therapy. *Curr Prob Cancer*, 30: 7-32.
52. Du W-L, Niu S-S, Xu Y-L, Xu Z-R, Fan C-L. (2007). Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydr Polym*, 75:385–389.
53. Dunne M, Bibby DC, Jones JC, Cudmore S. (2003). Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. *J Control Release*, 92:209–219.
54. Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, Nagy JA, van de Water L, Senger DR. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important

- mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*, 107(1-3):233-5.
55. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, 20(23):6877-6888.
 56. Errington N, Harding SE, Vårum KM, Illum L. (1993). Hydrodynamic characterisation of chitosans varying in degree of acetylation. *Int J Biol Macromol*, 15(2):113-117.
 57. Fang N, Chan V, Mao HQ, Leong KW. (2001). Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. *Biomacromolecules*, 2(4):1161-8.
 58. Fattal E, Bochot A. (2008). State of the art and perspectives for the delivery of antisense oligonucleotides and siRNA by polymeric nanocarriers. *Int J Pharm*, 364:237–248.
 59. Felgner PL. (1990). Particulate systems and polymers for in vitro and in vivo delivery of polynucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*, 5:163–187.
 60. Fernandez-Urrusuno R., Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila Jato J.L.(1999). Chitosan nanoparticles: A new vehicle for increasing the nasal absorption of peptides. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 26: 353-354.
 61. Ferrara N. (2004). Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*, 9:2-10.
 62. Ferreira MG, Tillman L, Hardee G, Bodmeier R. (2001). Characterization of complexes of an antisense oligonucleotide with protamine and pol-L-lysine salts. *JCR.*, 73(2-3): 381-390.
 63. Ferreira MG, Tillman L, Hardee G, Bodmeier R. (2002). Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers. *Int J Pharm*, 239:47–59.
 64. Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb FA, Pillai RS. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol*. 15(3): 331-341.
 65. Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.*, 391: 806-811.

66. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser H-P, Kissel T. (1999). A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethyleneimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*. , 16 (8): 1273-1279.
67. Fluri DA, Kemmer C, Daoud-El BM, Fussenegger M. (2008). Novel system for trigger-controlled drug release from polymer capsules. *J Control Release*, 131:211–219.
68. Fred DL. (1994). Non-viral gene therapy. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(6):626-636.
69. Fujita T, Furuhata M, Hattori Y, Kawakami H, Toma K, Maitani Y. (2009) Calcium enhanced delivery of tetraarginine-PEG-lipid-coated DNA/protamine complexes. *Int. J. Pharm.*, 368(1-2): 186-192.
70. Gan Q, Wang T. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release . *Colloids Surf B Biointerfaces*, 59:24–34.
71. Gao Y, Zhang Z, Chen L, Gu W, Li Y. (2009). Chitosan N-betainates/DNA self-assembly nanoparticles for gene delivery: In vitro uptake and transfection efficiency. *Int J Pharm*, 371(1,2):156-162.
72. Gary DJ, Puri N, Won Y-Y. (2007). Polymer-based siRNA delivery: Perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *J Control Release*, 121:64–73.
73. Gazori T, Khoshayand MR, Azizi E, Yazdizade P, Nomani A, Haririan I. (2009). Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: formulation, optimization and invitro characterization. *Carbohydr Polym*, 77(3):599-606.
74. Gewirtz AM. (2007). On future's doorstep: RNA interference and the pharmacopeia of tomorrow. *The Journal of Clinical Investigation*., 117(12): 3612-3614.
75. Gill TA, Singer DS, Thompson JW. (2006). Purification and analysis of protamine. *Process Biochem*, 41:1875-1882.

76. Grayson AC, Doody AM, Putnam D. (2006). Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery in vitro. *Pharm Res*, 23:1868-76.
77. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. (2006). MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol.*, 342: 33-47.
78. Grimm D. (2002). Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods*, 28 (2):146-157.
79. Guo S, Kemphues KJ. (1995). A gene required for establishing polarity in *C. Elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, 81: 611-620.
80. Hicklin D, Ellis L. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 23:1011-27.
81. Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, Xu ZL, Sakurai F, Ishii-Watabe A, Kawabata K, Yamaguchi T, Nakagawa S, Mayumi T, Hayakawa T. (2004). Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference. *Hum Gene Ther*, 15 (8):813-819.
82. Howard KA, Rahbek UL, Liu X, Damgaard CK, Glud SZ, Andersen MØ, Hovgaard MB, Schmitz A, Nyengaard JR, Besenbacher F, Kjems J. (2006). RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther*, 14(4):476-84.
83. Howard KA. (2008). Polycation-based Nanoparticle Delivery of RNA Interference. *Adv Drug Deliv Rev*, 10.1016
84. Huang M, Fong CW, Khor E, Lim LY. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer weight and degree of deacetylation. *J Control Release*, 106(3):391-406.
85. Huang Y-Z, Gao J-Q, Chen J-L, Liang W-Q. (2006). Cationic liposomes modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49(2):158-164.
86. Hutvagner G. (2005). Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Letters.*, 579(26): 5850-5857.

87. Illum L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*, 15(9):1326-1331.
88. Ishii T, Okahata Y, Sato T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochimica&Biophysica Acta-Biomembranes*, 1514(1):51-64.
89. Issa MM, Köping-Höggard M, Artrusson P. (2005). Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discovery Today*, 2(1):1-6.
90. Issa MM. (2006). Linear and Branched Chitosan Oligomers as Delivery Systems for pDNA and siRNA In Vitro and In Vivo. Doctorate thesis, Upsala University, Upsala Sweden.
91. Jaronczyk K, Carmichael JB, Hobman TC. (2005). Exploring the functions of RNA interference pathway proteins: some functions are more RISCy than others. *Biochem J*, 387: 561-571.
92. Jaskiewicz L, Filipowicz W. (2008). Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 320: 77-97.
93. Jere D, Kim J-E, Arote R, Jiang H-L, Kim Y-K, Choi YJ, Yun C-H, Cho M-H, Cho C-S. (2009). Akt1 silencing efficiencies in lung cancer cells by sh/si/ssiRNA transfection using a reductable polyspermine carrier. *Biomaterials*, 30(8):1635-1647.
94. Jintapattanakit A, Mao Shirui, Kissel T, Junyaprasert VB. (2008). Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. *Eur J Pharm Biopharm*, 70:563–571.
95. Jones SW, De Souza PM, Lindsay MA. (2004) SiRNA for gene silencing: a route to drug target discovery. *Current Opinion in Pharmacology*, 4: 522-527.
96. Jorgensen RA. (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnology.*, 8: 340-344.
97. Joshua-Tor L. (2006). The Argounates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 71: 67-72.
98. Junghans M, Loitsch SM, Steiniger S. CJ, Kreuter J, Zimmer A.(2005). Cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for delivery of antisense c-myc oligonucleotides. *Eur J Pharm Biopharm*, 60:287-294.

99. Katas H, Alpar O. (2006). Development and characterization of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 115:216-225.
100. Khatri K, Goyal AK, Gupta PN, Mishra N, Vyas SP. (2008). Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *Int J Pharm*, 354:235–241.
101. Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG. (2006). PEG conjugated VEGF siRNA for anti-angiogenic gene therapy. *Journal of Controlled Release*. 1-7.
102. Kim SH, Jeong JH, Lee SH, Kim SW, Park TG.(2008). Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. *Journal of Controlled Release*, 129(2):107-116.
103. Kim T-H, Jiang H-L, Jere D, Park I-K, Cho M-H, Nah J-W, Choi Y-J, Akaike T, Cho C-S. (2007). Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Prog. Polym. Sci.*, 32:726–753.
104. Kim TI, Ou M, Lee M, Kim SW. (2009). Arginine-grafted bio reducible poly(disulfide amine) for gene delivery systems. *Biomaterials*, 30(4):658-664.
105. Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Nozaki M. (2008). Sequence and target independent angiogenesis supression by siRNA via TLR3. *Nature*. 452:591-597.
106. Köping-Höggård M, Melnikova YS, Vårum KM, Lindman B, Artrusson P. (2003). Relationship between the physical shape and the efficiency of oligomeric chitosan as a gene delivery system in vitro and in vivo. *J Gene Med*, 5(2):130-41.
107. Kratzer I, Wernig K, Bernhart E, Panzenböck U, Wronski R, Windisch M, Zimmer A, Sattler W. (2006). Uptake of oligonucleotide-protamine nanoparticles by brain capillary endothelial cells. *Chem Phys Lipids*, 143:106-114.
108. Kratzer I, Wernig K, Panzenboeck U, Bernhart E, Reicher H, Wronski R, Windisch M, Hammer A, Malle E, Zimmer A, Sattler W. (2007). Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Control Release*, 117:301-311.
109. Kurreck J. (2003). Antisense Technologies improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry*, 270: 1628-1644.

110. Lai WF, Lin MC. (2009). Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives. *J Control Release*, 134(3):158-168.
111. Lavertu M, Methot S, Tran-Khanh N, Buschmann MD. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27):4815-4824.
112. Lee KW, Yoon JJ, Lee JH, Kim SY, Jung HJ, Kim SJ, Joh JW, Lee HH, Lee DS, Lee SK. (2004). Sustained Release of Vascular Endothelial Growth Factor From Calcium-Induced Alginate Hydrogels Reinforced by Heparin and Chitosan. *Transplant Proc*, 36:2464-2465.
113. Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. (2007). VEGF mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *Plos Medicine*, 4(6):1101-1110.
114. Lee YJ , Park BH , Bae SJ , Kim JH , Kim IS, Kim GC , Kim HJ, Lee GH , Kim TJ, Chang Y. (2009). Combination of magnetic nanoparticles and transfection agents: Physicochemical properties for cell labeling. *Current Applied Physics*, 9:S22–S24.
115. Li XW, Lee DK, Chan AS, Alpar HO. (2003). Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles. *Biochim Biophys Acta*, 1630(1):7-18.
116. Liu X, Howard KA, Dong M, Andersen MØ, Rahbek UL, Johnsen MG, Hansen OC, Besenbacher F, Kjems J. (2007). The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*, 28(6): 1280-1288.
117. Lochmann D, Jauk E, Zimmer A. (2004). Drug delivery of oligonucleotides by peptides. *Eur J Pharm Biopharm*, 58:237-251.
118. Lochmann D, Weyermann J, Georgens C, Prassl Ruth, Zimmer A.(2005) Albumin-protamine-oligonucleotide nanoparticles as a new antisense delivery system. Part 1 : Physicochemical characterization. *Eur J Pharm Biopharm*,59(3):419-429.
119. Lu PY, Xie FY, Woodle MC. (2005) Modulation of angiogenesis with siRNA inhibitors for novel therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 11(3):104-113.

120. Luo D, Saltzman WM. (2000). Synthetic DNA delivery system. *Nature Biotechnology*, 18(1):33-7.
121. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, 114:
122. Malyala P, O'Hagan DT, Singh M.(2009). Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 11809.
123. Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Biopharm*, 57(1)1-8.
124. Mao S, Shuai X, Unger F, Wittmar M, Xie X, Kissel T. (2005). Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. *Biomaterials*, 26:
125. Mao Z, Ma L, Yan J, Yan M, Gao C, Shen J. (2007). The gene transfection efficiency of thermoresponsive N,N,N-trimethyl chitosan chloride-g-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer. *Biomaterials*, 28: 4488–4500.
126. Marathe R, Anandalakshmi R, Smith TH, Pruss GJ, Vance VB. (2000). RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol.*, 43(2-3): 295-306.
127. Matsumoto G, Kushibiki T, Kinoshita Y, Lee U, Omi Y, Kubota E, Tabata Y. (2006). Cationized gelatin delivery of a plasmid DNA expressing small interference RNA for VEGF inhibits murine squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 97(4):313–321.
128. Mayer G, Vogel V, Weyermann J, Lochmann D, van der Broek JA, Tziatzios C, Haase W, Wouters D, Schubert US, Zimmer A, Kreuter J, Schubert D.(2005). Oligonucleotide-protamine-albumin nanoparticles: Protamine sulfate causes drastic size reduction. *J Control Release*, 106:181-187.
129. Meins F Jr. (2000). RNA degradation and models for post-transcriptional gene-silencing. *Plant Mol Biol.* 43(2-3): 261-273.
130. Meng F, Hennink WE, Zhong Z. (2009). Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications. *Biomaterials*, 30(12):2180-2198.

131. Miyoshi K, Uejima H, Nagami-Okada T, Siomi H, Siomi MC. (2008). In vitro RNA cleavage assay for Argounate-family proteins. *Methods Mol Biol.* 442: 29-43.
132. Morille M, Passirani C, Vonarbourg A, Clavreul A, Benoit J-P. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*,29(24-25):3477-96.
133. Motwani SK, Chopra S, Talegaonkar S, Ahmad K K FJ, Khar RK. (2008). Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimisation and in vitro characterisation. *Eur J Pharm Biopharm*,68:513–525.
134. Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, Schmitaz JC, Uchio E, Chu E, Cha C. (2007). Short interfering RNA-mediated gene silencing of Vascular Endothelial Growth Factor. *Arch Surg*, 141:367-374.
135. Mumper RJ, Wang J, Claspell JM, Rolland AP. (1995). Novel polymeric condensing carriers for gene delivery. *Proceed Int Symp Control Rel Bioact Mater*, 22:178-179.
136. Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. (2009). Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *J Control Release*, 136(1):2-13.
137. Nam HY, Kwon SM, Chung H, Lee S-Y, Kwon S-H, Jeon H, Kim Y, Park JH, Kim J, Her S, Oh Y-K, Kwon IC, Kim K, Jeong SY. (2009). Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J Control Release*, 135(3):259-267.
138. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia result in supression of homologous revesible so-supression of homologous genes in trans. *The Plant Cell.* 2: 279-289.
139. Nascimento E. JM, Amorim R. V, Cavalcanti A. C., Alves V. F, Nakazawa M., Pereira V. RA, Lucena-Silva N. (2007). Assessment of a DNA vaccine encoding an anchored-glycosylphosphatidylinositol tegumental antigen complexed to protamine sulphate on immunoprotection against murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(1):21-27.

140. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13(1):9-22.
141. Nguyen J, Steele T WJ, Merkel O, Reul R, Kissel T. (2008). Fast degrading polyesters as siRNA nano-carriers for pulmonary gene therapy. *J Control Release*, 132: 243–251.
142. Nucleic acid delivery: Where material sciences and bio-sciences meet. (2007) *Mater Sci Eng R Rep*, 58:117–161.
143. Oliveira AC, Ferraz MP, Monteiro FJ, Simões S. (2009). Cationic liposomes-DNA complexes as gene delivery vectors: Development and behaviour towards bone-like cells cta. *Acta Biomater*, 10.1016/j.actbio.2009.02.019.
144. Özbaş-Turan S, Aral C, Kabasakal L, Keyer-Uysal M, Akbuğa J. (2003). Coencapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a non-viral gene delivery vehicle. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 6 (1): 27-32.
145. Özgel G, Akbuğa J. (2006). In vitro characterization and transfection of IL-2 gene complexes. *Int J Pharm*, 315(1-2): 44-51.
146. Pan X, Guan J, Yoo J-W, Epstein AJ, Lee LJ, Lee RJ. (2008). Cationic lipid-coated magnetic nanoparticles associated with transferrin for gene delivery. *Int J Pharm*, 358:263–270.
147. Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, Behne AD. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J*, 15: 1236-1238.
148. Philips MI. (1997). Antisense inhibition and AAV delivery for reducing hypertension. *Hypertension*, 29:177-187.
149. Pickford AS, Cogoni C. (2003). RNA-mediated gene silencing. *Cell Mol Life Sci*. 60(5): 871-882.
150. Pratt AJ, MacRae IJ. (2009). The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*. 284(27): 17897-17901.)43(2-3): 295-306.
151. Ravi Kumar MN. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*, 46(1):1-27.

152. Raymond MS, Archibald JM, Aslam MA. (2005) Transporting silence: Design of carriers for siRNA to angiogenic endothelium. *Journal of Controlled Release*, 109:5-14.
153. Reischl D, Zimmer A. (2009). Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine: NBM*, 5: 8-20.
154. Roemer K, Friedmann T. (1992) Concepts and strategies for human gene therapy. *Eur J Biochem*, 208:211-255.
155. Rojanarata T, Opanasopit P, Techaarpornkul S, Ngawhirunpat T, Ruktanonchai U. (2008). Chitosan-Thiamine Pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery. *Pharmaceutical Research*, 25(12):2807-14.
156. Romano N, Macino G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Mikrobiology*, 6: 3343-3353.
157. Rozema DB, Lewis DL. (2003). siRNA delivery technologies for mammalian systems. *TARGETS*, 2(6):253-260.
158. Ryther RCC, Flynt AS, Phillips III JA, Patton JG. (2005) SiRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Therapy*, 12: 5-11.
159. Sailong X, Mindong D. (2007). Direct force measurements between siRNA and chitosan molecules using force spectroscopy. *Biophys J Bio FAST*, 4:1-18.
160. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.(1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
161. Sania M, Patrick L. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Pharm Biopharm*, 57:1-8.
162. Sato T, Ishii T, Okahata Y. (2001). In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22:2075-2080.
163. Schiedner G, Morral N, Parks RJ, Wu Y, Koopmans SC, Langston C, Graham FL, Beaudet AL, Kochanek S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity

adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet*, 18(2):180-183.

164. Schiffelers RM, Ansari A, Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema G, Scaria P, Woodle MC. (2004). Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Research*, 32(19):149.
165. Sgouras D, Duncan R. (1990). Methods for The Evaluation of Biocompatibility of Soluble Synthetic Polymer Which Have Potential for Biomedical Use: 1- Use of the Tetrazolium-Based Colorimetric Assay (MTT) As a Preliminary Screen for Evaluation of In Vitro Cytotoxicity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1: 61-68.
166. Shen C, Buck AK, Liu X, Winkler M, Reske SN. (2003). Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS Lett*, 539 (1-3):111-114.
167. Shen XC, Zhou J, Liu X, Wu J, Qu F, Zhang ZL, Pang DW. (2007). Importance of size to charge ratio in construction of stable and uniform nanoscale RNA/dendrimer complexes. *Org Biomol Chem*, 5(22):3674-81.
168. Shen Y, Li Q, Tu J, Zhu J. (2009). Synthesis and characterization of low molecular weight hyaluronic acid-based cationic micelles for efficient siRNA delivery . *Carbohydr Polym*, 77(1):95-104.
169. Shubia Z, Budiao Z. (2007). Cationic lipid and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release*, 123:1-10.
170. Singh R, James WL Jr. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol*, 86(3):215-223.
171. Singh SK, Hajeri PB. (2008). siRNAs:-their potential as therapeutic agents. Part II Methods of delivery. *Drug Discovery Today*, 1-22.
172. Singla AK, Chawla M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects an update. *J Pharm. Pharmacol*, 53:1047-1067.
173. Smith LC. (1998). Synthetic peptide-based DNA complexes for nonviral gene delivery. *Adv Drug Del Rev*, 30: 115–131.

174. Sonaje K, Lin Y-H, Juang J-H , Wey S-P , Chen C-T, Sung H-W. (2009). In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 30(12):2329-39.
175. Song E, Zhu P, Lee S-K, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA & Lieberman J. (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol*, 23(6):709-717.
176. Sunil AA, Nagada NM, Tejraj MA. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*, 100:5-28.
177. Tae-Hee K, Hu-Lin J. (2007). Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Prog Polym Sci*, 32:726-753.
178. Takahashi Y., Nishikawa M., Takakura Y. (2009) Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61 :760–766.
179. Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T. (2004) A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res*, 64: 3365-3370.
180. Tan WB, Jiang S, Zhang Y. (2007). Quantum-dot based nanoparticles for targeted silencing of HER2/neu gene via RNA interference. *Biomaterials*, 28:1565-1571.
181. Tebes SJ, Kruk PA. (2005). The genesis of RNA interference, its potential clinical applications, and implications in gynecologic cancer. *Gynecologic Oncology*, 99: 736-741.
182. Teijeiro-Osorio D, Remuñán-López C, Alonso MJ. (2009). Chitosan/cyclodextrin nanoparticles can efficiently transfect the airway epithelium in vitro. *Eur J Pharm Biopharm*, 71:257–263.
183. Tijsterman M, Plasterk PH. (2004). Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell*, 117(1): 1-3.
184. Tiyaaboonchai W, Limpeanchob N. (2007). Formulation and characterization of amphotericin B–chitosan–dextran sulfate nanoparticles. *Int J Pharm*, 329:142-149.

185. Tiyaaboonchai W. (2003). Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal*, 11(3):51-66.
186. Toub N, Malvy C, Fattal E, Couvreur P. (2006). Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA. *Biomed Pharmacother*, 60: 607-620.
187. Van der Krol AR, Lenting PE, Veenstra J, van der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR. (1988). An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*. 333: 866-869.
188. Van der Lubben IM, Verhoef JC, Gerrit B, Junginger HE. (2001). Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci*, 14:201-207.
189. Verheul RJ, Amidi M, van der Wal S, van Riet E, Jiskoot W, Hennink WE. (2008). Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free N,N,N-trimethylated chitosan. *Biomaterials*, 29: 3642–3649.
190. Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. (2001). Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev*, 52:139-144.
191. Vogel V, Lochmann D, Weyermann J, Mayer G, Tziatzios C, van den Broek JA, Haase W, Wouters D, Schubert US, Kreuter J, Zimmer A, Schubert D. (2005). Oligonucleotide–protamine–albumin nanoparticles: preparation, physical properties, and intracellular distribution. *J Control Release*, 103:99– 111.
192. Wang SL, Yao HH, Guo LL, Dong L, Li SG, Gu YP, Qin ZH. (2009). Selection of optimal sites for TGFB1 gene silencing by chitosan-TPP nanoparticle-mediated delivery of shRNA. *Cancer Genet Cytogenet*, 190(1):8-14.
193. Wang X-L, Xu R, Lu Z-R. (2009). A peptide-targeted delivery system with pH-sensitive amphiphilic cell membrane disruption for efficient receptor-mediated siRNA delivery. *J Control Release*, 134(3):207-213.
194. Watts JK, Deleavey GF and Damha MJ. (2008). Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug Discov Today*, 13:19-20.
195. Wernig K, Griesbacher M, Andreae F, Hajos F, Wagner J, Mosgoeller W, Zimmer A. (2008). Depot formulation of vasoactive intestinal peptide by protamine-based biodegradable nanoparticles. *J Control Release*, 130:192-198.

196. Werth S, Klein BU, Dai L, Höbel S, Grzlenski M, Bakowsky U, Czubayko F, Aigner A. (2006). A low molecular weight fraction of polyetilenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes. *Journal of Controlled Release*, 19:1-14.
197. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. (2004). Comparison of antisense oligonucleotide drug delivery systems. *J Control Release*, 100:411-423.
198. Wong SY, Pelet JM, Putnam D. (2007). Polymer systems for gene delivery Past, present, and future. *Prog. Polym. Sci.*, 32:799-837.
199. Wu H, Huang L, Huang C, Lai H, Liu C, Huang Y, Hsu Y, Lu C, Chen D, Chen P. (2005). RNA interference mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology*, 128(3):708–716.
200. Xia JG, Zhang S, Zhang Y, Ma M, Gu N. (2009). Maghemite Nanoparticles and Their Protamine Derivatives: Cellular Internalization and Effects on Cell-Cycle Progress. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9 (4):1025-1028.
201. Xing K, Chen XG, Li YY, Liu CS, Liu CG, Cha DS, Park HJ. (2008). Antibacterial activity of oleoyl-chitosan nanoparticles: A novel antibacterial dispersion system. *Carbohydr Polym*, 74: 114–120.
202. Xu S, Dong M, Liu X, Howard KA, Kjems J, Besenbacher F. (2007). Direct force measurements between siRNA and chitosan molecules using force spectroscopy. *Biophys J*, 93(3):952-9.
203. Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, BingYu A. (2006). Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci*, 61: 1027-1040.
204. Yoksan R, Akashi M. (2009). Low molecular weight chitosan-g-L-phenylalanine: Preparation, characterization, and complex formation with DNA. *Carbohydr Polym*, 75:95–103.
205. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*, 270(32):18997-19007.
206. Zang Y, Singh VK, Yang VC. (1998). Poly-L-lysine amplification of protamine immobilization and heparin adsorption. *J Biomed Mater Res*, 42:182-187.

207. Zhang S, Zhao B, Jiang H, Wang B, Ma B. (2007). Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. *J Control Release*, 123:1–10.
208. Zhang W, Singam R, Hellermann G, Kong X, Juan HS, Lockey RF, Wu SJ, Porter K, Mohapatra SS. (2004) Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery. *Genet Vaccines Ther*, 2(1):8.
209. Zhao X, Yu SB, Wu FL, Mao ZB, Yu CL. (2006). Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles. *J Control Release*, 112 :223-228.
210. Zheng Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S, Dong L, Wu L, Shen X. (2007). Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 67: 621–631.
211. Zhu A, Yuan L, Liao T. (2008). Suspension of Fe₃O₄ nanoparticles stabilized by chitosan and o-carboxymethylchitosan. *Int J Pharm*, 350:361–368.
212. Zhu S, Qian F, Zhang Y, Tang C, Yin C. (2007). Synthesis and characterization of PEG modified N-trimethylaminoethylmethacrylate chitosan nanoparticles. *Eur Polymer J*, 43:2244–2253.
213. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 72 (12):9873-9880.

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fulden	Soyadı	Erdem Çakmak
Doğum Yeri	Üsküdar	Doğum Tarihi	01.07.1980
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	
E-mail	fulerdem@hotmail.com	Tel	0505 2629128

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	
Yüksek Lisans	-	
Lisans	Marmara Ün. Eczacılık Fakültesi	2002
Lise	Kabataş Erkek Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Eczacı	Fuldenur Eczanesi	2005-
2.	Eczacılık Hizmetleri Md.	Acıbadem Hastanesi	2003-2005
3.	Eczacı Yrd.	Merkez Eczanesi - Kadıköy	2002- 2003

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-

Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL

CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English;

CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin.