T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİNE YÖNELİK siRNA TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİKLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Ayşe GENÇER

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2022

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİNE YÖNELİK siRNA TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİKLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Ayşe GENÇER

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİNE YÖNELİK siRNA TAŞIYICI POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİKLERİNİN İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayşe GENÇER
Danışman: Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN

Bu tez çalışması 02.06.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	*Prof.Dr. Levent ÖNER* *(Hacettepe Üniversitesi)*
Üye:	*Prof.Dr. Yalçın ÖZKAN* *(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)*
Üye:	*Prof.Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ* *(Hacettepe Üniversitesi)*
Üye:	*Prof.Dr. Emirhan NEMUTLU* *(Hacettepe Üniversitesi)*
Üye:	*Doç.Dr. Mustafa Sinan KAYNAK* *(Anadolu Üniversitesi)*

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

16 Haziran 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

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

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

02/06/2022

Ayşe GENÇER

i

---

[i] *"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*

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

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

(3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

ETİK BEYAN

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

Ecz. Ayşe GENÇER

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin ilk gününden itibaren her adımımda yol göstericiliği, bilimsel deneyimi ve desteği ile ilerlediğim ve kendisinden çok şey öğrendiğim kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Sn. Betül ARICA YEGİN'e

Doktora çalışmalarım boyunca her türlü imkânı sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı başkanları Prof. Dr. Sn. Sema ÇALIŞ ve Prof. Dr. Sn. Levent ÖNER'e,

Tez çalışmalarım boyunca bilimsel yol göstericiliği ve desteğini gördüğüm çok değerli hocam Prof. Dr. Sn. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye, tez izleme sürecimde bilgi ve birikimleri ile büyük katkısı olan değerli hocam Prof. Dr. Sn. Yalçın ÖZKAN'a,

Tez çalışmalarım kapsamında hücre kültürü çalışmalarındaki yardım ve destekleri için Dr.Öğr.Üyesi İpek BAYSAL'a, metabolomik çalışmalardaki yardım ve destekleri için Prof. Dr. Sn. Emirhan NEMUTLU'ya

Tüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üye ve yardımcılarına,

Doktoraya başlama sürecimde ve sonrasında hep desteğini gördüğüm değerli hocam Doç. Dr. Sn. Mustafa Sinan KAYNAK'a

Doktora eğitimim süresince dostluklarını ve manevi desteklerini çok yakından hissettiren, varlıkları çok kıymetli arkadaşlarım Ecz. Safiye AKKIN, Ecz. Pelinsu KORUCU ve tüm dostlarıma,

Doktora çalışmalarım boyunca 2211-A doktora bursu ve 118S452 nolu proje kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Tüm hayatım boyunca varlıklarıyla bana her daim güç ve destek veren, sonsuz ilgi ve sevgilerini esirgemeyen bir tanecik Annem, Babam ve Kardeşime,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Ayşe GENÇER

ÖZET

Gençer, A., Akciğer Kanserine Yönelik siRNA Taşıyıcı Polimerik Nanopartiküllerin Geliştirilmesi ve Etkinliklerinin *İn Vitro* Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2022. En yaygın kanser türü olarak bilinen akciğer kanseri aynı zamanda tüm kanser türleri arasında en yüksek ölüm oranına sahiptir. Tedavide kullanılan mevcut yöntemlerin düşük etkinliği ve ciddi yan ve toksik etkiler araştırmacıları istenmeyen sistemik etkileri azaltılmış, hedeflendirilmiş ve özgül etkisi arttırılmış tedavi yaklaşımları geliştirmeye yönlendirmektedir. Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogen (Kras) proteininin akciğer kanserlerinde önemli bir role sahip olduğu ve akciğer adenokarsinom olgularının çoğunda bu yolağın etkinleştiği bilinmektedir. Bu tez kapsamında, alışılagelmiş yöntemlerle hedeflenemeyen mutant KRAS onkogenini hedeflemek üzere siRNA yüklü poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerin hazırlanması, tümör bölgesine seçici ve etkin olarak taşıma sağlamak üzere optimize edilmesi (aktif ve/veya pasif hedeflendirme ile) ve akciğer kanseri tedavisindeki etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan nanopartiküller katyonik özellik kazandırılmak üzere dioleil-3-trimetilamonyum propan (DOTAP) ve polietilenimin (PEI) ile, aktif hedeflendirme amacıyla da hiyalüronik asit ile modifiye edilmiştir. 190-245 nm aralığında partikül büyüklüğü, (-12) - (+14) mV aralığında zeta potansiyele sahip, polidispersite-indeksi 0,1 civarında siRNA yüklü nanopartiküller elde edilmiş, siRNA %80-100 enkapsülasyon etkinliği ile nanopartiküllere yüklenmiştir. *In vitro* çalışmalar ile nanopartiküllerin A549 kanser hücrelerinde ve sağlıklı BEAS-2B akciğer hücrelerinde 72 saatin sonunda hücre canlılığını etkilemediği, A549 hücrelerine özgül etkinlik göstererek hedef genin ekspresyonunda %50'ye kadar azalma, protein düzeyinde ise bazı formülasyonlar ile %90'ın üzerinde azalma sağlandığı gösterilmiştir. Ayrıca nanopartikül uygulaması sonrası hücrelerin metabolik profillerindeki değişiklikleri değerlendirmek için metabolomik analizler gerçekleştirilmiştir. Formüle edilen nanopartiküllerin akciğer kanserinde etkin bir tedavi yöntemi olabileceği değerlendirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, RNA interferans, siRNA, KRAS, Polimerik nanopartikül

Bu tez çalışması TÜBİTAK 2211-A Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 1001-118S452 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Gencer, A., Development of siRNA Carrier Polymeric Nanoparticles for Lung Cancer and *In Vitro* Evaluation, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Doctor of Philosophy Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara, 2022. Lung cancer, one of the most common type of cancers, has the highest mortality rate among all types of cancer, The low effectiveness of current therapies and serious side and toxic effects lead researchers to develop targeted treatment approaches with minimal systemic effects and increased specific effects. It is known that the Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene (Kras) protein has an important role in lung cancers, and this pathway is activated in most of the cases in lung adenocarcinoma. The purpose of this study was to design and developed KRAS silencing small interfering RNA (siRNA) loaded poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticle formulations and evaluate in the treatment of KRAS mutant lung cancer. The nanoparticles prepared by the double emulsion solvent evaporation method were modified with dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) and polyethyleneimine (PEI) to impart cationic surface potential, and also modified with hyaluronic acid for active targeting. The siRNA loaded nanoparticles with particle sizes in the range of 190-245 nm, zeta potential in the range of (-12) - (+14) mV and polydispersity index around 0.1 were obtained. Encapsulation efficiency was found between %80-100. In addition, the cytotoxic and KRAS gene silencing effects of the siRNA loaded nanoparticles on A549 human lung adenocarcinoma and BEAS-2B human healthy lung cell were investigated. *In vitro* studies have shown that the nanoparticles do not affect cell viability of the cancer and healthy lung cells after 72 hours. A decrease of the expression of the target gene up to 50% and a decrease of protein level more than 90% was occurred. In addition, metabolomic analyzes were performed to evaluate the changes in metabolic profiles of the cells after nanoparticles treatment. The formulated siRNA delivery nanoparticles can be promising treatment in lung cancer.

Keywords: Lung cancer, RNA interference, siRNA, KRAS, Polymeric nanoparticle.

This thesis was supported by the TUBİTAK (grant number: TUBİTAK 2211-A and 1001-118S452).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI iv
ETİK BEYAN v
TEŞEKKÜR vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR xiii
ŞEKİLLER xiv
TABLOLAR xix
1.GİRİŞ 1
2.GENEL BİLGİLER 4
2.1. Akciğer Kanseri ve Kanser Biyolojisi 4
2.2. Akciğer Kanseri Tedavisinde Konvansiyonel Yöntemler 5
2.3. Akciğer Kanserinde Yeni Tedavi Yaklaşımları 6
2.4. RNA İnterferans Teknolojisi ve siRNA 10
2.5. KRAS Geni ve Akciğer Kanserindeki Rolü 13
2.6. siRNA Taşıyıcı Sistem Yaklaşımları 15
2.6.1.Nanopartiküler siRNA Taşıyıcı Sistemler 16
2.6.2.siRNA Taşıyıcı Sistem Olarak Polimerik Nanopartiküller 18
2.6.3.siRNA Taşıyıcı Sistem Olarak Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) Nanopartiküller 19
2.6.4.Polietilenimin (PEI) 21
2.6.5.Dioleoiltrimetilamonyumpropan (DOTAP) 23
2.7. siRNA Taşıyıcı Polimerik Nanopartiküllerde Aktif Hedeflendirme Yöntemleri 24
2.7.1.Hiyalüronik Asit 25
2.8.Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonları 26
2.9.siRNA Yüklü Nanopartiküllerde Gen Susturma Etkinliği Tayin Yöntemleri 27
2.9.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) 27
2.9.2.Western-Blot Yöntemi 28

2.9.3.Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA) 29
2.10.Metabolomik Çalışmalar 30
3.GEREÇ VE YÖNTEM 32
3.1.Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler 32
3.2.Kullanılan Cihazlar 33
3.3.Polimerik Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları 35
3.4.siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması 38
3.5.Hiyalüronik Asit Kaplı Nanopartiküllerin Hazırlanması 39
3.6.Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları 40
3.6.1.FT-IR Analizi 40
3.6.2.Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi ve Zeta Potansiyel Tayini 40
3.6.3.Morfolojik Değerlendirme 40
3.6.4.Hiyalüronik Asit Bağlanma Etkinliğinin Değerlendirilmesi 41
3.6.5.siRNA Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi 42
3.6.6.Nanopartiküllerden in vitro siRNA Salım Çalışmaları 43
3.6.7.In vitro Serum ve RNAaz Stabilite Testleri 43
3.7.Hücre Kültürü Çalışmaları 44
3.8.In vitro Sitotoksisite Çalışmaları 44
3.9.Transfeksiyon Çalışmaları 45
3.10.Hücrelerde Apoptoz ve Nekrozun Değerlendirilmesi 46
3.11.Gen Susturma Etkinliğinin Değerlendirilmesi 47
3.11.1.PCR Analizi 47
3.11.2.ELISA Deneyi 48
3.11.3.Western-Blot Analizi 48
3.12.Metabolomik Analizler 49
3.12.1.Numunelerin Hazırlanması 49
3.12.2.Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Analizi 50
3.12.3.Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-qTOF-MS) Analizi 51
3.12.4.Veri Analizi 52
3.13.İstatistiksel Analiz 53
4.BULGULAR 54

4.1.Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları 54
4.1.1.siRNA Yüklü Olmayan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 54
4.1.2.siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 68
4.1.3.Hiyalüronik Asit Kaplı Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 72
4.1.4.Nanopartiküllerden in vitro siRNA Salım Çalışmaları 77
4.1.5.In vitro Serum ve RNAaz Stabilite Testleri 78
4.2.Hücre Kültürü Çalışmaları 79
4.2.1.In vitro Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi 79
4.2.2.Hücrelerde Apoptoz ve Nekrozun Değerlendirilmesi 82
4.2.3.Gen Susturma Etkinliğinin Değerlendirilmesi 84
4.3.Metabolomik Analizler 87
4.3.1.Yolak Analizi 104
5.TARTIŞMA 106
5.1.Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu 106
5.1.1.siRNA Yüklü Olmayan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 106
5.1.2.siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 109
5.1.3.Nanopartiküllerden in vitro siRNA Salım Çalışmaları 112
5.1.4.In vitro Serum ve RNAaz Stabilite Testleri 112
5.2.Hücre Kültürü Çalışmaları 113
5.2.1.In vitro Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi 113
5.2.2.Gen Susturma Etkinliğinin Değerlendirilmesi 114
5.3.Metabolomik Analizler 118
6.SONUÇ VE ÖNERİLER 121
7.KAYNAKLAR 123
8.EKLER 140
EK-1: Turnitin dijital makbuz 140
EK-2: Turnitin orijinallik raporu 141
EK-3: Tezden üretilen yayınlar 142
9.ÖZGEÇMİŞ 177

SİMGELER VE KISALTMALAR

a/h	ağırlık/hacim
AGO2	Endonükleaz Argonot 2
ALK	Anaplastik Lenfoma Kinaz
BRAF	v-Raf Murin Sarkoma Viral Onkogen Homoloğu B
CD44	Farklılaşma Kümesi 44
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CTLA-4	Sitotoksik T-lenfosit İlişkili Antijen 4
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAaz	Deoksiribonükleaz
dNTPs	Deoksiribonükleotit trifosfat
DOTAP	1,2-dioleoil-3-trimetilamonyumpropane
DOTAP-PLGA NP	DOTAP Modifiye PLGA Nanopartikülleri
DOTMA	1,2-di-ooktadesenil-3-trimetilamonyumpropan
dsRNA	Çift Sarmallı RNA
DTT	Deoksiribonükleotit Trifosfat
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzime Bağlı Immünosorbent Deneyi
EPR	Artmış Permeabilite ve Tutulum
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GC-qTOF-MS	Gaz Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
GFP	Yeşil Floresan Protein
HA	Hiyalüronik Asit
HA-siRNA-DOTAP-PLGA NP	siRNA Yüklü-HA ve PEI ile Modifiye PLGA Nanopartikülleri
HA-siRNA-PEI-PLGA NP	HA ve PEI ile Modifiye PLGA Nanopartikülleri
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
HRP	Horseradish Peroksidaz
KBr	Potasyum Bromür
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHOAK	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
KRAS	Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogen
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
LC-qTOF-MS	Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
MDR	Çoklu İlaç Direnci
MEK1	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz

mRNA	Mesajcı RNA
MS	Kütle Spektroskopisi
MA	Moleküler Ağırlık
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NP	Nanopartiküller
PACA	Polialkilsiyanoakrilat
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PBS	Fosfat Tamponlanmış Tuz Çözeltisi
PCA	Temel Bileşen Analizi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD-1	Programlı Hücre Ölümü Reseptör-1
PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDI	Polidispersite İndeksi
PD-L1	Programlı Hücre Ölümü Reseptör Ligandı-1
PEI	Polietilenimin
PEI-PLGA NP	PEI ile Modifiye PLGA Nanopartikülleri
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PLA	Polilaktikasit
PLGA	Poli (laktik asit-ko-glikolik asit)
PLGA NP	PLGA Nanopartikülleri
PLL	Poli (L-lizin)
PLS-DA	Kısmi En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi
PVA	Polivinil Alkol
Rb	Retinoblastom
RISC	RNA Tetikli Sessizleştirme Kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
RNAaz	Ribonükleaz
RNAi	RNA interferans
RNAseq	RNA Dizileme
ROS1	C-Ros Onkogen 1 ya da Reseptör Tirozin Kinaz
RT-PCR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S/Y/S	Su/Yağ/Su
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
siRNA	Küçük Susturucu RNA
siRNA DOTAP-PLGA NP	siRNA Yüklü- DOTAP ile Modifiye PLGA Nanopartikülleri
siRNA PEI-PLGA NP	siRNA Yüklü-PEI ile Modifiye PLGA Nanopartikülleri
siRNA PLGA NP	siRNA Yüklü PLGA Nanopartikülleri
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskopu
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör
VEGF	Vasküler Endoteltyal Büyüme Faktörü
VIP	Variable Importance in Projection
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil **Sayfa**

2.1. siRNA aracılı gen susturma mekanizmasının şematik gösterimi. 11

2.2. Akciğer kanserinde meydana gelen mutasyonlar. 13

2.3. Çeşitli kanser türlerinde RAS gen mutasyonlarının görülme sıklığı. 14

2.4. siRNA taşınmasında kullanılan nanopartiküler sistemler. 17

2.5. Gen taşıyıcı polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi. Matriks ya da rezervuar sistemler (a), elektrostatik etkileşme ile yüzeye adsorpsiyon (b), polimer-gen kompleksi (c). 19

2.6. PLGA'nın moleküler yapısı. 19

2.7. Polyethylenimine (PEI)'in moleküler yapısı. 22

2.8. Dioleoiltrimetilamonyumpropan (DOTAP)'ın moleküler yapısı. 23

2.9. Hiyalüronik asitin moleküler yapısı. 26

2.10. ELISA yöntemlerinin şematik gösterimi. 30

3.1. Çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma tekniği ile nanopartiküllerin hazırlanması. 36

3.2. XTT deneyinin şematik gösterimi. A: siRNA çözeltisi, B: PLGA NP ve siRNA-PLGA NP, C: DOTAP PLGA NP ve siRNA-DOTAP PLGA NP, D: PEI-PLGA NP ve siRNA-PEI-PLGA NP, E: HA-DOTAP-PLGA NP ve HA-siRNA-DOTAP PLGA NP, F: HA-PEI-PLGA NP ve HA-siRNA-PEI-PLGA NP. 45

4.1. siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü dağılımı (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h), PLGA 50:50 MA:7.000-17.000 Da). 57

4.2. siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü dağılımı (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %2 (a/h), PLGA 50:50 MA:38.000-54.000 Da). 58

4.3. siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü dağılımı (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h), PLGA 75:75 MA:4.000-15.000 Da). 58

4.4. Nanopartiküllerin kullanılan polimer tipine bağlı olarak (a) Ortalama partikül büyüklüğü, (b) Polidispersite indeksi (PDI) ve (c) Zeta potansiyel değişimleri (n=3, *p <0,05, **p>0,05). 59

4.5. Nanopartiküllerin PEI miktarına bağlı olarak (a) Ortalama partikül büyüklüğü, (b) Polidispersite indeksi (PDI) ve (c) Zeta potansiyel değişimleri (n=3, **p <0,05). 61

4.6. Nanopartiküllerin DOTAP miktarına bağlı olarak (a) Ortalama partikül büyüklüğü, (b) Polidispersite indeksi ve (c) Zeta potansiyel değişimleri (n=3, ** p <0,05). 62

4.7. (a) Polietilenimin (PEI)'e ait FT-IR spektrumu, (b) Dioleoiltrimetilamonyumpropan (DOTAP)'a ait FT-IR spektrumu, (c) PLGA'ya ait FT-IR spektrumu. 64

4.8. PEI ve DOTAP ile modifiye nanopartiküllere ilişkin FT-IR spektrumlar, (a) PLGA NP, (b) PEI-PLGA NP, (c) DOTAP-PLGA NP, (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); PEI miktarı:1 mg; DOTAP miktarı: 1,5 mg; PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)). 65

4.9. siRNA yüklü olmayan PLGA nanopartikül formülasyonuna ilişkin SEM fotoğrafları, (a) 100.000x büyütme, (b) 200.000x büyütme (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h), PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)). 66

4.10. siRNA yüklü olmayan PLGA nanopartikül formülasyonuna ilişkin TEM fotoğrafları (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h), PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)). 67

4.11. DOTAP modifiye, siRNA yüklü olmayan PLGA nanopartikül formülasyonuna ilişkin TEM fotoğrafları (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); DOTAP miktarı: 1,5 mg; PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)). 67

4.12. PEI modifiye, siRNA yüklü olmayan PLGA nanopartikül formülasyonuna ilişkin TEM fotoğrafları (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); PEI miktarı: 1 mg; PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)). 67

4.13. DOTAP modifiye siRNA yüklü PLGA nanopartikül formülasyonuna ilişkin TEM fotoğrafları (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); DOTAP miktarı: 1,5 mg; PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)). 70

4.14. PEI modifiye siRNA yüklü PLGA nanopartikül formülasyonuna ilişkin TEM fotoğrafları (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); PEI miktarı: 1 mg; PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)). 70

4.15. siRNA yüklü nanopartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliğine ilişkin agaroz-jel elektroforez görüntüleri, (1) siRNA-PLGA NP, (2) siRNA-DOTAP-PLGA NP, (3) siRNA-PEI-PLGA NP. 71

4.16. Hiyalüronik asit (HA)'e ve HA kaplı nanopartiküllere ilişkin FT-IR spektrumları, (a) Hiyalüronik asit, (b) PEI modifiye nanopartikül (sol panel-HA-PEI-PLGA NP, sağ panel-PEI-PLGA NP), (c) DOTAP modifiye nanopartikül (sol panel-HA-DOTAP-PLGA NP, sağ panel-DOTAP-PLGA NP). 74

4.17. HA kaplı siRNA yüklü PLGA nanopartikül formülasyonuna ilişkin TEM fotoğrafları, (a,b) HA-siRNA-DOTAP-PLGA NP, (c,d) HA-siRNA-PEI-PLGA NP (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); DOTAP miktarı: 1,5 mg; PEI miktarı: 1 mg; HA miktarı:0,5 mg; PLGA 50:50 MA:7.000-17.000 Da;). 75

4.18. Nanopartiküllere ait XPS spektrumları, (a) PLGA-NP, (b) DOTAP-PLGA NP, (c) PEI-PLGA-NP, (d) HA- DOTAP-PLGA NP, (e) HA- PEI-PLGA NP (e) 76

4.19. siRNA yüklü nanopartiküllerden salım örneklerine ait agaroz-jel elektroforezi görüntüleri, (a) siRNA-PLGA NP, (b) siRNA-PEI-PLGA NP, (c) siRNA-DOTAP-PLGA NP, (d) HA-siRNA-DOTAP-PLGA NP, (e) HA-siRNA-PEI-PLGA NP. 77

4.20. HA kaplı nanopartikül formülasyonlarının pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki siRNA salım grafikleri (n=3, ortalama ± SS). 78

4.21. Nanopartiküllerin (a) serum ve (b) RNAaz ortamında inkübasyonları sonrası agaroz-jel elektroforezi görüntüleri. 79

4.22. siRNA içeren ve içermeyen DOTAP ile modifiye edilmiş nanopartikül formülasyonlarıyla 72 saat muamele sonrası A549 hücre canlılığı (n=3, ortalama ± SS). 80

4.23. siRNA içeren ve içermeyen PEI ile modifiye edilmiş nanopartikül formülasyonlarıyla 72 saat muamele sonrası A549 hücre canlılığı (n=3, ortalama ± SS). 80

4.24. siRNA içeren ve içermeyen DOTAP ile modifiye nanopartikül formülasyonlarıyla 72 saat muamele sonrası BEAS-2B hücre canlılığı (n=5, ortalama ± SS). 81

4.25. siRNA içeren ve içermeyen PEI ile modifiye nanopartikül formülasyonlarıyla 72 saat muamele sonrası BEAS-2B hücre canlılığı (n=5, ortalama ± SS). 81

4.26. 72 saat sonunda siRNA yüklü olmayan fomülasyon uygulanan A549 hücrelerine ilişkin floresan mikroskop görüntüleri, (a) DOTAP-PLGA-NP, (b) PEI-PLGA NP, (c) HA-DOTAP-PLGA NP, (d) HA-PEI-PLGA NP, Apoptotik hücreler yeşil, nekrotik hücreler kırmızı, floresan ile görülmektedir. 83

4.27. 72 saat sonunda siRNA yüklü fomülasyon uygulanan A549 hücrelerine ilişkin floresan mikroskop görüntüleri, (a) siRNA-DOTAP-PLGA-NP, (b) siRNA-PEI-PLGA NP, (c) HA-siRNA-DOTAP-PLGA NP, (d) HA-siRNA-PEI-PLGA NP, Apoptotik hücreler yeşil, nekrotik hücreler kırmızı floresan ile görülmektedir. 83

4.28. siRNA yüklü nanopartiküllerle muamele sonrası A549 hücrelerinin KRAS gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim. KRAS gen düzeyi iç kontrol geni olan GAPDH düzeyi ile oranlanarak normalize edilmiştir, (n=6, ortalama ± SS) (* $p<0,05$, ** $p<0,01$). 84

4.29. siRNA yüklü nanopartiküllerle muamele sonrası BEAS-2B hücrelerinin KRAS gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim. KRAS gen düzeyi iç kontrol geni olan GAPDH düzeyi ile oranlanarak normalize edilmiştir, (n=6, ortalama ± SS) (* p<0,05, ** p<0,01). 84

4.30. A549 hücrelerinde 72 saat uygulama sonrası göreceli KRAS protein düzeyleri (n=6, ortalama ± SS) (*** p<0,001). 86

4.31. BEAS-2B hücrelerinde 72 saat uygulama sonrası göreceli KRAS protein düzeyleri (n=6, ortalama ± SS) (*** p<0,001). 86

4.32. 100 nM siRNA içeren HA modifiye PEI-PLGA nanopartikül formülasyonu (HA-siRNA-PEI-PLGA NP) ile 72 saatlik uygulamadan sonra A549 ve BEAS-2B hücreleri için Western Blot görüntüsü. 87

4.33. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlere ait hizalandırılmış nokta sıralı kromatogramlar (A) C18 kolon ve negatif iyonizasyon, (B) C18 kolon ve pozitif iyonizasyon, (C) HILIC kolon ve negatif iyonizasyon ve (D) HILIC kolon ve pozitif iyonizasyon (Her bir nokta bir metabolit pikini işaret etmektedir. Noktaların renkleri piklerin şiddetini göstermektedir (mavi düşük, kırımız yüksek)). 99

4.34. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analizlere ait temel pik kromatogramları (A) C18 kolon ve negatif iyonizasyon, (B) C18 kolon ve pozitif iyonizasyon, (C) HILIC kolon ve negatif iyonizasyon ve (D) HILIC kolon ve pozitif iyonizasyon. 99

4.35. (A) PCA analizleri uygulanmış ve veri setinde aykırı bir değerlerin bulunduğu grafik, (B) aykırı veriler çıkarılarak hazırlanmış PCA analiz grafiği. 100

4.36. A549 ve BEAS-2B hücre hatları için elde edilen metabolomiks verisine ait çok değişkenli veri analiz. (A) PLS-DA skor grafiği, (B) veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği. 101

4.37. A549 hücre hattı için elde edilen metabolomiks verisine ait çok değişkenli veri analiz. (A) PLS-DA skor grafiği (R^2: 0,899 ve Q^2:0,987), (B) veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, (C) regresyon katsayısı grafiği (A549 hücrelerinde nanopartikül uygulaması sonrasında artan ve azalan metabolitleri göstermektedir. 102

4.38. BEAS-2B hücre hattı için elde edilen metabolomiks verisine ait çok değişkenli veri analiz. (A) PLS-DA skor grafiği (R^2: 0,996 ve Q^2:0,927), (B) veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği, (C) regresyon katsayısı grafiği (BEAS-2B hücrelerinde nanopartikül uygulaması sonrasında artan ve azalan metabolitleri göstermektedir). 103

4.39. (A) A459 hücre hattı için nanopartikül uygulaması sonrasındaki yolak analizi, (B) BEAS-2B hücre hattı için nanopartikül uygulaması sonrasındaki yolak analizi. 104

TABLOLAR

Tablo **Sayfa**

2.1. Akciğer kanseri tedavisinde güncel yaklaşımlar. 7

2.2. Klinik araştırmadaki bazı siRNA tedavileri. 12

2.3. siRNA taşınmasında kullanılan PLGA nanopartiküller. 20

3.1. Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyon değişkenleri. 37

3.2. PEI ile modifiye katyonik nanopartikül formülasyonlarına ait değişkenler. 38

3.3. DOTAP ile modifiye katyonik nanopartikül formülasyonlarına ait değişkenler. 38

3.4. siRNA içeren nanopartiküle ilişkin formülasyon bileşenleri. 39

3.5. RT-PCR deneylerinde kullanılacak olan primer dizileri. 48

3.6. GC-MS analiz koşulları ve cihaz değişkenleri. 50

3.7. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analiz için gradient elüsyon programı. 52

3.8. LC-qTOF-MS cihaz değişkenleri. 52

4.1. PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da) ile hazırlanan %2 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 54

4.2. PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da) ile hazırlanan %3 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 54

4.3. PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da) ile hazırlanan %4 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 55

4.4. PLGA 50:50 (MA: 38.000-54.000 Da) ile hazırlanan %2 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 55

4.5. PLGA 50:50 (MA: 38.000-54.000 Da) ile hazırlanan %3 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 55

4.6. PLGA 50:50 (MA: 38.000-54.000 Da) ile hazırlanan %4 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 56

4.7. PLGA 75:25 (MA: 4000-15.000 Da) ile hazırlanan %2 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 56

4.8. PLGA 75:25 (MA: 4000-15.000 Da) ile hazırlanan %3 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 56

4.9. PLGA 75:25 (MA: 4000-15.000 Da) ile hazırlanan %4 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 57

4.10. PEI ile modifiye edilmiş nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 60

4.11. DOTAP ile modifiye edilmiş nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 60

4.12. siRNA yüklü nanopartiküllere ilişkin formülasyon bileşenleri ve partikül büyüklüğü-zeta potansiyel değerleri, (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h), PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)) (n=3, ortalama ± SS). 69

4.13. siRNA yüklü nanopartiküllere ilişkin formülasyon bileşenleri ve partikül büyüklüğü-zeta potansiyel değerleri, (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); DOTAP 1,5 mg; PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)) (n=3, ortalama ± SS). 69

4.14. siRNA yüklü nanopartiküllere ilişkin formülasyon bileşenleri ve partikül büyüklüğü-zeta potansiyel değerleri (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); PEI 1 mg; PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)) (n=3, ortalama ± SS). 69

4.15. siRNA yüklü nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri (n=3, ortalama ± SS). 71

4.16. Hiyalüronik asit kaplı, DOTAP modifiye siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ilişkin formülasyon bileşenleri ve partikül büyüklüğü-zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 72

4.17. Hiyalüronik asit kaplı, PEI modifiye siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ilişkin formülasyon bileşenleri ve partikül büyüklüğü-zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 72

4.18. Hiyalüronik asit kaplı, siRNA yüklü nanopartiküllere ilişkin formülasyon bileşenleri ve partikül büyüklüğü-zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS). 73

4.19. Metabolomik analizlerinde GC-MS, LC-qTOF-MS kullanılarak elde edilen metabolit tablosu. 88

4.20. A549 hücre hattında nanopartikül uygulaması sonucunda istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 105

4.21. BEAS-2B hücre hattında nanopartikül uygulaması sonucunda istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin yer aldıkları yolaklar. 105

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporlarına göre akciğer kanseri, dünya genelinde en sık teşhis edilen üçüncü kanser türü olmakla birlikte, kansere bağlı ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Bu raporlara göre 2025 yılında akcğer kanseri olgularının dünya çapında 2,54 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (1). Akciğer kanserinin yüksek mortalitesi, tedavide başvurulan konvansiyonel yöntemlerin (cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi) yetersizliğini ortaya koymaktadır (2, 3). Bu durum, akciğer kanseri tedavisinde yan etkileri düşük, tedavi etkinliği yüksek ve özgül olan yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekliliğini doğurmakta bu konuda çok sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda araştırmalar kanser patogenezinin moleküler temellerini aydınlatmak üzerinde yoğunlaşmış ve elde edilen bilgiler doğrultusunda tümör hücresine özgül hedefleme yapabilen ve bireye yönelik tedavi yöntemleri geliştirilmesi mümkün olmuştur. Böylece diğer kanser türlerinde olduğu gibi akciğer kanserinde de yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde bu gelişmelerden faydalanılmaktadır (4-6).

Bu kapsamda, gen tedavisinde en önemli tekniklerden biri olan Ribonükleik asit (RNA) interferans, doğrudan veya dolaylı olarak genlerde meydana gelen mutasyonlarla ve onkogenlerin aktive olmasıyla bağlantılı olarak ortaya çıkan kanserin, doğrudan buna neden olan genlerin inhibe edilmesiyle tedavi edilebilmesi ve oldukça özgül, bireysel tedavi yöntemleri geliştirmeye uygun olması nedenleriyle üzerinde en çok çalışılan yöntemlerden biri olmuştur (7, 8). Hedefe özgü olan bu yöntem gen tedavisi çalışmalarına yeni bir boyut kazandırmıştır. RNA interferans tekniğinde kullanılan, çift sarmallı küçük bir RNA olan küçük susturucu RNA (small interfering RNA, siRNA), hücreye verilmesinin ardından susturulmak istenen gene ait hedef mesajcı RNA (mRNA)'ya bağlanması ve mRNA'nın parçalanması, böylece kanser ile ilişkilendirilen proteinin sentezinin transkripsiyon sonrasında engellenmesini sağlamaktadır (9). Kanser tedavisinde özgül hedefleme yapabilen siRNA tedavisi doğrudan sorunlu geni hedef almakta, genomik çalışmalar sonucunda da kanserde hangi mutant genin aktif olduğunun belirlenmesi ve bu geni hedefleyen siRNA'nın üretilerek tedavide kullanılması mümkün olmaktadır (10). Akciğer kanseri oluşumunda rol oynadığı bilinen bir grup onkogenin siRNA tedavisiyle susturulduğu ve tedavi edici etkinlik sağlandığı gösterilen çok sayıda çalışma bulunmakla beraber,

az sayıda olsa da, klinik araştırma aşamasında olan çalışmalar da bulunmaktadır (11, 12).

Kanser ile ilişkili olduğu bilinen bu genlerden biri olan RAS geni bir proto-onkogen ailesi olup, sağlıklı hücrelerde sinyal transdüksiyonu, proliferasyon, farklılaşma (diferensiyasyon), adhezyon, apoptoz, migrasyon gibi süreçlerde rol alırken, RAS ailesinde meydana gelen mutasyonlar çok sık görülmektedir. Bu onkogen ailesinin bir alt tipi olan Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogenin (KRAS) akciğer kanserlerinde önemli bir rol oynadığı, özellikle akciğer adenokarsinomasında, olguların önemli oranında bu gen ile ilişkili yolağın etkin olduğu görülmektedir. Bu durum KRAS'ı akciğer kanseri tedavisinde önemli bir hedef haline getirmiştir (13). Ancak yapılan çalışmalar KRAS'ın konvansiyonel yöntemlerle hedeflenemez-inhibe edilemez olduğunu göstermiştir (14). Akciğer kanserinin doğrudan KRAS hedefleyici siRNA ile tedavisi üzerinde oldukça az sayıda çalışma gerçekleştirildiği görülmektedir. Bu çalışmalarda siRNA taşıyıcı vektör olarak viral vektörler veya inorganik nanopartiküller kullanılmıştır. Ancak akciğer kanser hücrelerini aktif hedeflendirme yöntemleriyle hedefleyen, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir yapılı polimerik nanopartiküler taşıyıcı sistemin kullanıldığı bir KRAS hedefli siRNA temelli çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez kapsamında, akciğer kanseri tedavisinde etkinliği değerlendirilmek üzere konvansiyonel yöntemlerle hedeflenemeyen, aynı zamanda akciğer kanserlerinin önemli bir oranından sorumlu mutant KRAS onkogenini susturucu siRNA'nın kullanılması ve tümör bölgesine seçici ve etkin olarak taşınması (aktif ve/veya pasif hedeflendirme ile) ve kanser hücrelerine transfeksiyon etkinliğini arttırması için optimum özelliklere sahip polimerik nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin hazırlanması amaçlanmıştır. Bu nanopartiküllerin hazırlanmasında, toksik olmaması, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması, gen taşınmasına uygun olması, istenen kontrollü salım özelliklerini sağlaması gibi başlıca gerekçelerle, insanda kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanmış olan poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA), biyomateryal olarak kullanılmıştır. Nanopartiküller, kanser hücrelerine aktif hedeflendirilmeleri amacıyla, akciğer kanser hücrelerinde aşırı miktarda eksprese olan farklılaşma kümesi 44 (Cluster of differentiation 44, CD44) yüzey proteininin ligandı olan, biyoparçalanabilir

ve biyouyumlu bir molekül olan hiyalüronik asit ile modifiye edilmiştir. Böylece RNA interferans tekniği ile gen tedavisi ve polimerik nanopartiküllerin gen taşıma ve kanser hücrelerine aktif ve pasif hedeflendirebilme özellikleri birleştirilmiştir. Sonuç olarak, farmasötik ve terapötik açıdan karşılaşılan zorlukların üstesinden gelebilecek özelliklere sahip, sağlıklı hücrelerde bulunan ve mutant olmayan KRAS üzerinde susturucu etki göstermeyip, mutant KRAS taşıyan akciğer kanser hücrelerinde seçici gen susturma sağlayan terapötik sistemlerin geliştirilmesi, sonuçta sağlıklı hücrelerin kanser tedavi sürecinden etkilenmemeleri amaçlanmıştır. Formülasyon değişkenlerinin hazırlanan nanopartiküllerin karakteristikleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ve hazırlanan siRNA taşıyıcı nanopartiküler formülasyonların, *in vitro* karakterizasyon çalışmaları sonrasında, geliştirilen formülasyonlardan fizikokimyasal özellikleri ve siRNA taşıma etkinliği bakımından en uygun bulunanlar hedef akciğer adenokarsinom hücreleri ile sağlıklı akciğer hücrelerindeki etkinlikleri bakımından değerlendirilmiştir.

Ayrıca KRAS mutant hücrelerin nanopartiküllerle muamelesi sonrasında metabolik profillerinde meydana gelen değişimleri görmek amacıyla, kontrol grubu olan sağlıklı akciğer hücreleriyle karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen metabolomik uygulamalar ile kanser hücrelerinin tedavi sonucunda metabolomik profili sağlıklı hücrelerle karşılaşırılarak sonuçları değerlendirilmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen bulguların, akciğer kanserlerinin önemli bir oranından sorumlu olduğu ancak konvansiyonel yöntemlerle hedeflenemediği bilinen bir onkogen olan mutant KRAS'ın akciğer kanseri tedavisindeki yeriyle ilgili son derece kısıtlı araştırmalara önemli bir katkı sağlayacağı değerlendirilmektedir. Elde edilen sonuçların akciğer kanserinde yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yeni bir bakış açısı sağlayacağı değerlendirilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri ve Kanser Biyolojisi

Sigara kullanımı başta olmak üzere, sigara dumanına maruz kalma, hava kirliliği, asbest, egzoz dumanı, krom, kadmiyum, arsenik gibi bazı metallere ve bazı organik kimyasallara maruziyet, genetik faktörler, beslenme ve alkol kullanımı, akciğerde lokalize kronik inflamasyon ve enfeksiyon durumu akciğer kanserinin ortaya çıkmasında önemli risk faktörleridir (3, 15). Hastaların yaklaşık %10'u asemptomatik iken büyük çoğunluğunda teşhis edildiğinde belirli semptomlar görülmektedir. Sürekli öksürük, nefes darlığı, göğüs ağrısı, açıklanamayan kilo kaybı en sık rastlanan semptomlardır (16).

Kanser hücrelerinin histolojik karakteristiklerine göre akciğer kanseri iki ana tipe ayrılmıştır. En sık görülen tip, Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHOAK), tüm akciğer kanserlerinin %85'ini oluşturmaktadır. KHOAK'ın adenokarsinom (%40), skuamoz hücreli karsinom (%40), büyük hücreli karsinom (%10) ve bronşiyoalveoler karsinom olmak üzere dört alt tipi bulunur (17, 18). Sigara kullanımı ile oldukça güçlü bir ilişkisi olan skuamoz hücreli akciğer kanseri, akciğerin merkezindeki bronşiol epitelinin skuamoz hücrelerinin erken evresinde meydana gelir. Akciğer kanserinin en yaygın tipi olan ve sigara kullanımı ile doğrudan ilişkisi olmadığı bilinen adenokarsinom, havayolu epitelinin tip II alveolar hücrelerinde meydana gelir. Skuamoz hücreli kanserin aksine, akciğerin perifer dokularında oluşmaya yatkın bir kanser türüdür. Büyük hücreli karsinom ise akciğerin merkezinde veya lenf nodüllerinde yerleşebilir. Sigara kullanımı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (19).

Akciğer kanserinin daha agresif olan diğer türü, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK), tüm akciğer kanseri olgularının % 15'ini oluşturur. KHAK olgularında kemoterapiye yanıt alınmakla birlikte teşhis edildiğinde çoğunlukla ilerlemiş olduğundan kötü bir prognozu vardır (16). Bu kanser tipinde de olguların çoğunluğu sigara kullanımı ile ilişkilendirilirken az bir kısmının da diğer çevresel faktörler ve genetik faktörler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (3).

Akciğer kanseri, uluslararası TNM evrelendirme sistemine göre (T; tümör boyutunu, N; tümörün lokalize olduğu lenf nodu sayısını, M; metastaz durumunu belirtir) yedi evreye ayrılmıştır (evre IA, evre IB, evre IIA, evre IIB, evre IIIA, evre

IIIB ve evre IV) (20). Akciğer kanserinin tedavisinde kanserin tipi kadar bulunduğu evre de tedavi türü ve planının belirlenmesinde, hastalığın prognozunda ve tedaviye yanıtın ölçülmesinde önem arz etmektedir. Hastalığın teşhisi kanserin tipine, tümörün yerleşim bölgesine, tümörün büyüklüğüne, metastaz durumuna ve hastanın klinik durumuna bağlıdır. Yaygın kullanılan teşhis yöntemleri balgam sitolojisi, bronkoskopi, transtorasik iğne aspirasyonu ve görüntüleme yöntemleridir. Son yıllarda, dışarı verilen nefesin analiz edilmesiyle, teşhis de yeni ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaya başlanmıştır. Nefeste teşhis edilen bir takım uçucu organik maddlerin varlığı (izopren, etan, aldehitler, pentan, aseton, amonyak, dimetilamin, dimetilsülfür ve etil merkaptan gibi) akciğer kanseri ile ilişkilendirilmektedir (21, 22).

Akciğer kanseri çok sayıda genetik ve epigenetik değişimin sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir. Bu değişiklikler ve bunlara bağlı meydana gelen moleküler düzeydeki değişikliklerin tanımlanması, karakterize edilmesi ve kanser ile ilişkilendirilmesi hastalığın erken teşhisi ve tedavisi, özellikle de kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin seçilebilmesi bakımından oldukça önemlidir (4).

Çeşitli mutasyonlar sonucunda onkogenlerin aktive olması, tümör baskılayıcı genlerin inaktive olması, hücre yaşam döngüsünde rol alan genlerin aktivitesinde meydana gelen değişimler, DNA tamirinde rol alan genlerin hasarı, büyüme faktörleri ve reseptörlerinde meydana gelen değişiklikler, akciğer kanserinde etkin rol oynadığı bilinen genetik değişikliklerdir. Tümör protein 53 (p53) ve retinoblastom (Rb) tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), anaplastik lenfoma kinaz (ALK), Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homoloğu (KRAS), c-ros onkogen 1 (ROS1), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2), RET, mezenkimal epitelyal geçiş geni (MET), v-Raf murin sarkoma viral onkogen homoloğu B (BRAF) genlerinde meydana gelen değişimler akciğer kanserlerinde en yaygın görülen biyoişaretleyicilerdir. Bu genlerde meydana gelen değişikliklerin aydınlatılması ile hastalığın teşhisi yanında hedefe yönelik çeşitli tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi de mümkün olmaktadır (23-25).

2.2. Akciğer Kanseri Tedavisinde Konvansiyonel Yöntemler

Akciğer kanseri tedavisinde kanserin tipi ve bulunduğu evreye bağlı olarak en uygun tedavi yöntemi seçilmektedir. Akciğer kanseri tedavisinde başvurulan

konvansiyonel tedavi yöntemleri cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapidir. Bu tedavi yöntemleri tek başına veya birlikte uygulanmaktadır (3). KHOAK'de standart kemoterapinin birinci basamağında sisplatin ve karboplatin gibi platin yapılı kemoterapötik ilaçlar sistemik olarak uygulanır. Tedaviye yanıtın ve hayatta kalımın arttırılması ve tek bir ilaca bağlı şiddetli yan etkilerin azaltılması için kemoterapötiklerin kombine halde kullanımı tercih edilmektedir. Paklitaksel, dosetaksel, vinorelbin, gemsitabin ya da pemetreksed bu amaçla platin türevleriyle (sisplatin ya da karboplatin) birlikte kullanımı yaygındır. İkinci basamak kemoterapide ise dosetaksel, pemetreksed, erlotinib, krizotinib kullanılmaktadır (26). Bu kemoterapötik ilaçların seçici etkiye sahip olmamaları dolayısıyla sistemik kemoterapi sırasında kanser hücrelerinin yanında sağlıklı doku ve hücreler de tahrip olmakta ve toksik etkiler görülmektedir. Bu şiddetli toksik etkiler kemoterapötiklerin uygulanabilir dozunu kısıtlamaktadır. Ayrıca kanser hücrelerinde gelişen spontan mutasyonlar sonucunda ilaçlara karşı Çoklu İlaç Direnci (Multi Drug Resistance, MDR) oluşumu kemoterapide başarıyı düşüren bir diğer önemli etkendir (27). Yüksek dozda radyasyon uygulanması sonucu kanser hücrelerinin öldürülmesi ve tümörün küçültülmesinin amaçlandığı radyoterapi ise akciğer, kalp, özofagus, omurilik gibi risk altındaki diğer organların hasarı doz kısıtlanmasını zorunlu kılmaktadır (2). Tüm bu etmenler akciğer kanseri tedavisinde istenen başarının elde edilememesine neden olmakta ve bilim insanlarını, daha etkili ve seçici olabilecek yeni tedavi yöntemleri geliştirmeye yönlendirmektedir.

2.3. Akciğer Kanserinde Yeni Tedavi Yaklaşımları

Kanser oluşumu, büyümesi ve yayılımından sorumlu mekanizmaların tanımlanması, bu mekanizmaların inakvivasyonuna-modülasyonuna dayanan çeşitli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Moleküler hedeflendirilmiş tedavi (17), kanser hücrelerine karşı koyan immün sistem bileşenlerini modüle etmeye dayanan immünoterapi (28), gen tedavisi (29) ve hedef bölgeye etkin ilaç taşınmasını sağlayan yeni ilaç taşıyıcı sistemler (30, 31) bu yaklaşımların başında gelmektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Akciğer kanseri tedavisinde güncel yaklaşımlar.

Moleküler hedeflendirilmiş tedavi	• Tirozin kinaz inhibitörleri • Monoklonal antikorlar • Anti-anjiyogenikler
İmmünoterapi	• CTLA-4 inhibitörleri • PD-1 ve PD-L1 inhibitörleri
Gen tedavisi	• Kanser oluşumuna neden olan genlerin tamiri • Kanser oluşumuna neden olan genlerin baskılanması-susturulması • Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu
İlaç taşıyıcı yeni sistemler	• Lipozom • Katı Lipit Nanopartikül • Polimerik Nanopartikül • Polimerik Misel • Dendrimer • Karbon Nanotüp

Moleküler hedeflendirilmiş tedavi, kanserde etkin rolü olan yolakların belirli bir basamağında görev alan moleküllere yönelik inhibitörlerin geliştirilmesi ve yolağın bu inhibitör ile hedeflenen molekülün yer aldığı basamakta inaktive edilmesi esasına dayanmaktadır. Hücre yüzeyinde bulunan ve bir tirozin kinaz reseptörü EGFR ve alt sinyal yolağında meydana gelen mutasyonlar akciğer kanserinde en iyi aydınlatılmış ve en sık rastlanan mutasyonlardır. Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) EGFR'yi doğrudan inhibe ederek, kanser hücresinin büyüme-farklılaşma-çoğalma döngüsünde görevli sinyal yolağını dolaylı olarak inhibe eder ve kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurur. Erlotinib (Tarceva®), gefitinib (Iressa®), krizotinib (Xalkori®) ve afatinib (Gilotrif®) bu amaçla geliştirilen ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılan moleküllerdir. Bir diğer yaklaşım ise EGFR'nin monoklonal antikorlar tarafından inhibisyonudur. Cetuksimab ve panitumumab bu amaçla geliştirilen antikorlardır ve EGFR'nin ekstraselüler kısmına bağlanarak etki gösterirler (32) (19) (33). Moleküler hedeflendirilmiş tedavi yaklaşımındaki bir diğer mekanizma ise anjiyogenez inhibisyonudur. Anjiyogenez, gelişmekte-büyümekte olan bir dokuda hücrelerin ihtiyacı olan oksijen ve besini sağlamak amacıyla yeni damarlanmaların oluştuğu bir süreçtir. Embriyogenez ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde etkindir. Ancak kanser hücrelerinin çoğalması ve yayılmasında da rol oynamaktadır. Hücre büyümesi ve çoğalmasının aşırı aktif olduğu kanser dokularında anjiyogenez de artmış aktivite

göstermektedir. Ancak kanser dokularında görülen bu aşırı damarlanma sağlıklı dokulardakinden farklı olmakla birlikte damar yapısı yüksek heterojenlik, yüksek geçirgenlik gösteren tipik özelliklere sahiptir. Tümör anjiyogenezinde çok sayıda endojen faktör rol almaktadır. Bu faktörlerden bazıları; vasküler endoteltyal büyüme faktörü (VEGF), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF-α, TGF-β), anjiyopoietin ve tümör nekroz faktörüdür (TNF-α). Bu süreçte rol alan herhangi bir molekülün inhibe edilmesi ve tümör dokusundaki anjiyogenezin baskılanması tedavide umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmiştir. Anti-anjiyogenik tedavide en çok çalışılan faktör VEGF olmuştur ve çeşitli inhibitör moleküller geliştirilmiştir. Bevacizumab ve ramucirumab bu amaçla geliştirilen ve tedavide kullanımı onaylanmış monoklonal antikorlardır. Klinikte kullanımı onaylanmış, VEGF reseptörünü inhibe ederek etki gösteren bir diğer anti-anjiyogenik molekül ise küçük molekül yapılı bir madde olan nintedaniptir (34-38).

Bir diğer güncel tedavi yaklaşımı olan immünoterapi ise immün sistem bileşenlerinin modüle edilmesi ve kanser hücreleriyle savaşmasını sağlamaya dayanmaktadır. T hücre yüzeyinde bulunan ve immün sistemin geriye regülasyonunu (down-regulation) sağlayan birer yüzey reseptörü olan Programlı Hücre Ölümü Reseptör-1 (PD-1) ve Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Antijen 4 (CTLA-4), tümör hücresi yüzeyinde bulunan ve T hücre yüzeyindeki PD-1 reseptörüne bağlanarak T hücre aktivasyonunu engelleyen Programlı Hücre Ölümü Reseptör Ligandı-1 (PD-L1) kanser immünoterapisinde rol oynayan başlıca yapılardır. İpilimumab, nivolumab, atezolizumab, pembrolizumab ve tremelimumab bu proteinleri bloke etmeye yönelik geliştirilmiş ve başarılı bulunmuş monoklonal antikorlardır. İmmünoterapi denilince akla gelen bir diğer yöntem ise aşıdır. Akciğer kanserinin aşı ile tedavisi amacıyla iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar otolog veya allojenik tümör hücrelerinden hazırlanan tümör hücresi aşıları ve antijen özgül aşılardır (19, 39).

Kanser oluşum mekanizması doğrudan veya dolaylı olarak genlerde meydana gelen mutasyonlarla ve onkogenlerin aktive olmasıyla ilişkilidir (40). Kanser oluşumundan sorumlu genetik değişiklikler onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olmak üzere başlıca iki tür gende meydana gelmektedir (41). Gen tedavisi kanser oluşumuna neden olan genlerin tamiri, baskılanması-susturulması, tümör baskılayıcı

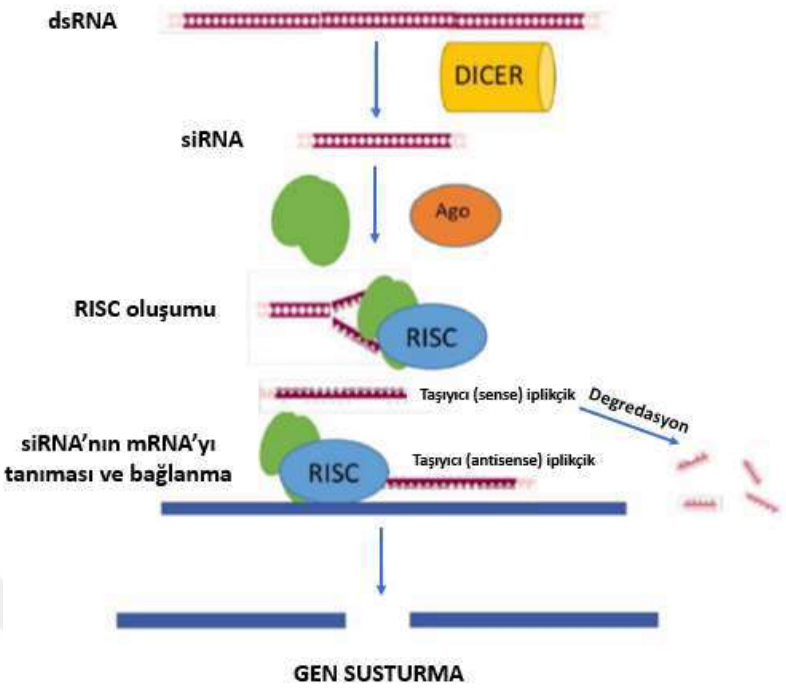
genlerin aktivasyonu ya da yerine konması gibi yöntemleri kapsamaktadır. Gen tedavisinin diğer tedavi yaklaşımlarına üstünlüğü, oldukça özgün olması ve bu yönüyle bireysel tedavi yöntemleri geliştirmeye uygun olmasıdır (42, 43). Bu amaçla geliştirilmiş, preklinik ve klinik çalışmaları gerçekleştirilen çok sayıda terapötik olmakla birlikte, Gendicine® (p53 gen + adenovirüs), Rexin-G® (mutant cyclin G1 gen + retrovirüs), Kymriah® (genetiği değiştirilmiş otolog T-hücresi), Yescarta® çeşitli otoritelerce onaylanmış gen tedavisi ürünleridir.

Nanoteknolojik yaklaşımlarla geliştirilen sistemler ya da diğer adıyla nanopartiküler sistemler akciğer kanserinin tanı ve tedavisinde yeni stratejik yöntemler olarak dikkat çekmektedir. Nanopartiküler sistemler farklı fonksiyonel gruplar ile modifiye edilebilmesi sayesinde, tümör mikroçevresine etkin bir şekilde hedeflenmiş taşınma sağlamasının yanında tümör bölgesine özgün taşımayı da arttırarak hem tanı hem de tedavi etkinliğini arttırma, özgün olmayan ilaç dağılımı sonucu meydana gelen sistemik toksisiteyi azaltma potansiyeline sahiptir. Farklı fonsiyonel gruplarla modifiye edilerek sağlanan aktif hedefleme yanında, nanopartiküler sistemler sahip oldukları 10-1000 nm aralığındaki boyutları sayesinde tümör bölgesinde artmış olan anjiogenik aktivite sonucu artmış permeabilite ve tutulma etkisi ile kanserli dokuya pasif hedefleme yapabilme kabiliyetine de sahiptir. Ayrıca nanopartiküler yaklaşımlar diğer tedavi yaklaşımlarıyla birlikte kullanılarak çok daha etkin tedavi yöntemleri geliştirilebilmektedir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler genel olarak taşıyıcı, etkin madde ve aktif hedefleme ajanından oluşmaktadır. Taşıyıcı sistem organik ya da inorganik polimer, lipit veya farklı bir materyalden meydana gelebilir. Etkin madde bu küresel yapılı taşıyıcı içinde bir çekirdek şeklinde enkapsüle edilmiş olabilir ya da taşıyıcı matriks içinde dağıtılmış olabilir. Aktif hedefleme ajanı ise çoğunlukla nanopartiküler sistemin yüzeyine kimyasal etkileşme ya da adsorpsiyon gibi fiziksel bir etkileşme ile bağlanmıştır. Bir nanopartiküler sistem birden fazla farklı ajan ile bu şekilde değiştirilerek farklı fonksiyonel özelliklere sahip sistemler tasarlanabilmektedir (22, 44). Akciğer kanseri tedavisinde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler sistemik ya da pulmoner yolla uygulanabilmektedir. Özellikle pulmoner uygulama yolu, lokal etki ile sistemik yan etkilerin azalması ve akciğere ulaşan etkin madde miktarının artması üstünlükleri ile dikkat çekmektedir. Bu alanda çok sayıda çalışma olmasına karşın, nanopartiküllerin akciğer toksisitenin, etkililik ve

güvenliliğinin tam olarak aydınlatılamamış olması bu uygulama yolunun klinikte kullanımının önünde engel teşkil etmektedir (45).

2.4. RNA İnterferans Teknolojisi ve siRNA

Gen tedavisinde en önemli tekniklerden biri olan RNA interferans tekniği, 1998 yılında Mello and Fire tarafından keşfedilmiş ve bu bilim insanlarına 2006 Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülünü kazandırmıştır. 2000'li yılların başından beri kanser gen tedavisinde en çok dikkat çeken ve çalışılan bir yöntem olmuştur (12, 46). RNA interferans genel itibariyle çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) hücreye verilmesinin ardından susturulmak istenen gene ait hedef mRNA'ya bağlanması ve mRNA'nın parçalanması, böylece hedef proteinin sentezinin transkripsiyon sonrasında engellenmesi şeklinde gerçekleşen bir olaydır. dsRNA hücre içine girdikten sonra sitoplazmada küçük RNA'ların biyogenezinde yer alan bir RNAaz III endonükleaz olan Dicer enzimi tarafından küçük RNA fragmanlarına parçalanır. Elde edilen, 20-25 nükleotit uzunluğundaki bu RNA fragmanları küçük susturucu RNA (small interfering RNA, siRNA) olarak isimlendirilmektedir. Protein kodlamayan RNA olarak da bilinen bu moleküller çeşitli transfeksiyon yöntemleriyle hücre içine taşındıktan sonra yapısında endonukleaz, ekzonukleaz ve helikaz enzimlerini içeren RNA Tetikli Sessizleştirme Kompleksi (RNA-Induced Silencing Complex, RISC) ile kompleks oluşturur. RISC'in endonükleaz argonot 2 (AGO2) kısmı siRNA'nın taşıyıcı iplikçiğini (sense) parçalayarak uzaklaştırırken hedef mRNA'yı tanıyacak olan diğer siRNA iplikçiği (antisense) RISC'e bağlı kalır. RISC bu iplikçik aracılığı ile hedef mRNA'yı özgül olarak tanıyarak bağlanır ve AGO2 aracılığı ile mRNA parçalanarak inaktive edilmiş olur (Şekil 2.1) (7, 47).



Şekil 2.1. siRNA aracılı gen susturma mekanizmasının şematik gösterimi (48).

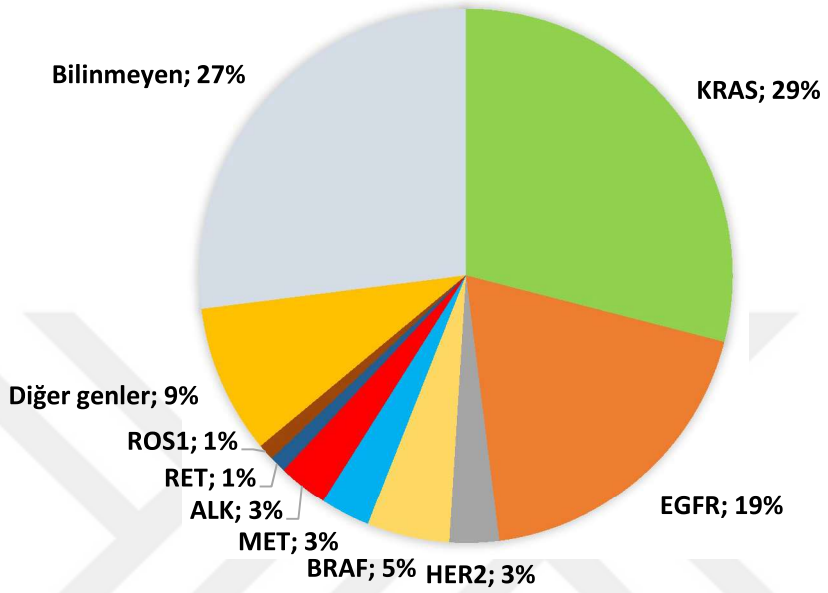
siRNA bu etkisi sayesinde kanser başta olmak üzere pek çok hastalığın tedavisinde umut verici bir terapötik molekül olmuştur (47). Tablo 2.2'de çeşitli kanser türlerinin tedavisinde klinik araştırmaları gerçekleştirilen siRNA terapötikleri yer almaktadır.

Tablo 2.2. Klinik araştırmadaki bazı siRNA tedavileri.

Ürün	Hedef	Endikasyon	Uygulama yolu	Faz	Çalışma Kodu
KRAS G12D siRNA	KRAS	Pankreas kanseri	İntravenöz	Faz I	NCT03608631
Atu027	Protein kinaz N3	Solid tümörler	İntravenöz	Faz I Faz II	NCT00938574 NCT01808638
EphA2 siRNA	EphA2	Solid tümörler	İntravenöz	Faz I	NCT01591356
CALAA-01 (anti-R2 siRNA)	Ribonükleotid Redüktaz (RRM2)	Solid tümörler	İntravenöz	Faz I	NCT00689065
TKM-080301	Polo Benzeri Kinaz 1 (PLK-1)	Kolorektal kanser Pankreas kanseri Mide kanseri Meme kanseri Yumurtalık kanseri Yemek borusu kanserleri	İntravenöz	Faz I	NCT01437007
DCR-MYC	MYC onkogeni	Solid Tümör Maligniteleri, Multipl Miyelom Lenfoma	İntravenöz	Faz I FazII	NCT02110563 NCT02314052
NBF-006	Glutatyon S-Transferaz P	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri Pankreas kanseri Kolorektal kanser	İntravenöz	Faz I	NCT03819387
siG12D LODER	KRASG12D	Pankreas kanseri	İntratümoral implantasyon	Faz II	NCT01188785
CpG-STAT3 siRNA CAS3/SS3	STAT3	Non-Hodgkin lenfoma	İntratümöral	Faz I	NCT04995536
STP705	GF-β1 COX-2	Cilt kanseri	İntralezyonel	Faz II	NCT04844983

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi akciğer kanserinde de akciğer hücrelerinde meydana gelen genetik ve epigenetik mutasyonlar sonucunda bazı onkogenlerin aktive olduğu ve bu genlerin akciğer kanserinin oluşum mekanizmasında rol aldığı bilinmektedir. Bölüm 2.1.'de de bahsedildiği üzere KRAS, EGFR, BRAF, Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz 1 (MEK1), HER2, ALK, ROS1, Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birim Alfa (PI3KCA), MET Proto-Onkogen, Reseptör Tirozin Kinaz (MET), Diskoidin Alan Reseptörü 2 (DDR2), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) genleri akciğer kanserlerinde mutasyonları en sık rastlanan gen gruplarıdır (Şekil 2.2). Bu genler sağlıklı hücrelerde hücre farklılaşması,

proliferasyon, sağ kalım, büyüme, hücre göçü gibi faaliyetlerde fonksiyon gösterirken, mutasyonlar sonucu aşırı aktive olarak kanser hücrelerinin oluşumuna neden olurlar (12, 49).



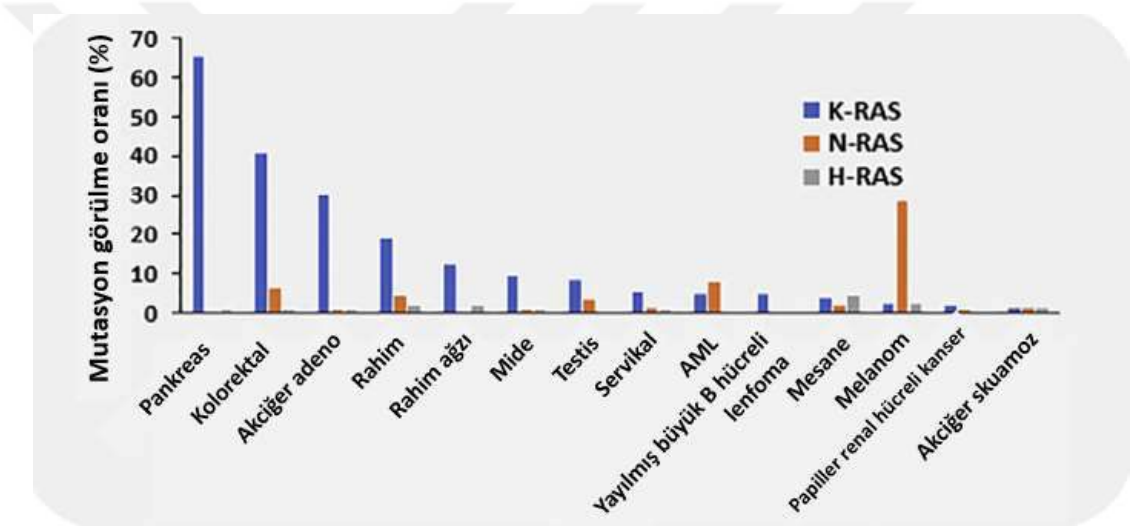
Şekil 2.2. Akciğer kanserinde meydana gelen mutasyonlar (49).

Literatürde bu genleri siRNA temelli RNA interferans tekniği ile hedefleyerek akciğer kanserindeki etkinliğini araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır. *In vitro, in vivo* ya da *ex vivo* olarak gerçekleştirilen bu çalışmalarda akciğer kanseri hücrelerine siRNA taşınması viral ya da viral olmayan çeşitli transfeksiyon ajanları ile gerçekleştirilmektedir (5).

2.5. KRAS Geni ve Akciğer Kanserindeki Rolü

Hücreler büyüme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz için hücre dışından aldıkları sinyalleri sinyal iletim mekanizmaları ile hücre membranından çekirdeğe iletirler. Protoonkogenler bu sinyal iletim yolunda görevli birçok proteini kodlarlar. Hücrenin normal büyüme ve farklılaşmasını destekleyen bu genler herhangi bir nedenle mutasyona uğrarlarsa onkogenlere dönüşürler. Ras proteini de bu genler tarafından kodlanan ve sinyal iletiminde görev yapan bir proteindir. Sağlıklı bir hücrede hücre büyümesi ve farklılaşması, sinyal iletimi gibi hücrenin yaşamsal fonksiyonlarında oldukça önemli roller oynayan Ras ve Ras-ilişkili proteinlerin

mutasyonu, invazyon ve metastazı arttırmak ve apoptozisi azaltmak yoluyla sıklıkla kanserlerin oluşumuna neden olmaktadır. Ras protein ailesinde meydana gelen mutasyonlar oldukça sık görülmekte ve tüm kanserlerin %20 ile %30'una neden olmaktadır. Uygun olmayan aktivasyonunun; hücrelerin sinyal iletimi, proliferasyon ve malign dönüşümde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Çeşitli genlerdeki mutasyonlar ve RAS geninin mutasyonları buna neden olabilir. Ras ailesinin HRAS, NRAS ve KRAS olmak üzere 3 alt tipi bulunmaktadır. Ras proteinlerinin, özellikle de Kras proteininin akciğer kanserlerinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Akciğer adenokarsinomasında, olguların önemli oranında bu yolağın etkin olduğu görülmektedir (Şekil 2.2 ve 2.3) (50-53).



Şekil 2.3. Çeşitli kanser türlerinde RAS gen mutasyonlarının görülme sıklığı (54).

RAS gen mutasyonu sonucunda bu proteinin GTPaz enzim aktivitesi bozulmakta ve GTP hidrolizi engellenmekte, bunun sonucunda normal dışı aktivitelere sahip Ras-GTP formları birikerek Ras'a bağlı alt sinyal yolağının aktivitesinde artışa ve hücre çoğalmasında tetiklenmeye neden olmaktadır. KRAS uzun süredir KHOAK'ın tedavisinde önemli bir terapötik hedef olarak araştırılsa da kansere neden olan mutasyonlar KRAS'ı, GTPaz aktivitesini bozarak onkojenik hale getirmesi ve protein yüzeyinin küçük moleküllerin bağlanmasına uygun yapıda olmaması gibi nedenlerle Kras onkoproteinleri yakın zamana kadar konvansiyonel tedavi yaklaşımlarıyla hedeflenemez (undruggable target) olarak kabul edilmiştir (13, 55-57). Üstelik akciğer kanseri olgularının önemli bir oranında görülen KRAS mutasyonu, EGFR'yi hedefleyen tirozin kinaz inhibitörlerine (Gefitinib (Iressa®), Erlotinib

(Tarceva®)) karşı direnç gelişimine neden olmakta ve tedavi edici etkinliklerini yok etmektedir (58). Bu görüşe karşı olarak, son dönemlerde KRAS mutant kanserlerde mutasyonun oluştuğu G12C (glycine 12 to cysteine) kodonunu özgül olarak inhibe eden küçük moleküler yapılı inhibitörler keşfedilmiş ve Faz I-II klinik araştırma çalışmaları devam etmektedir (59, 60). Ancak G12C mutasyonu akciğer kanserlerinde en yaygın görülen mutasyon olsa da KRAS mutasyonları oldukça heterojenik bir yapıya sahiptir (61). Bir diğer yaklaşım ise KRAS'ın alt ve üst sinyal yolaklarında yer alan proteinlerin hedeflenmesiyle KRAS'ın dolaylı olarak düzenlenmesidir. Ancak KRAS sinyal yolağının oldukça karmaşık bir yapıya sahip olması nedeniyle bu yaklaşımın klinik olarak yeterli etkinlikte sağlanamayacağı bilinmektedir (56). Bu bilgiler ışığında, konvansiyonel yöntemlerle doğrudan hedeflenmesi oldukça zor olan KRAS mutant KHOAK olgularında, tedavi yöntemi olarak RNA interferans tekniğinin kullanılması önemli ve etkili bir seçenek olarak görülmektedir (62-64). Zarredar ve arkadaşları, bir EGFR inhibitörü olan sapitinib ile KRAS siRNA'nın *in vitro* A549 akciğer adenokarsinom hücrelerinde kombine uygulama sonrası etkinliğini araştırmış, her iki terapötik madde birlikte uygulandığında sinerjistik etki göstererek ayrı ayrı uygulandıkları duruma göre hücre sağ kalımını daha etkin bir derecede baskıladığını göstermiştir (5).

2.6. siRNA Taşıyıcı Sistem Yaklaşımları

siRNA, patojenik moleküler yolakları yıkarak etki gösteren çok etkili bir terapötik moleküldür. siRNA ile başarılı bir gen susturma tedavisinin sağlanması hem etkili ve hedef mRNA'ya özgü sekansın tasarlanıp üretilmesi hem de hedef dokuya ve hücreye bu siRNA'nın etkinliğini kaybetmeden, hedef dışı etkileri en aza indirerek, özgül olarak taşınabilmesine bağlıdır. Ancak başarılı bir şekilde tasarlanmış ve üretilmiş olsa bile uygulanması sonrası hücre dışında ve hücre içinde gerçekleşen birtakım olaylar siRNA'nın etkinliğini engellemekte veya azaltmaktadır. Kanda enzimatik degradasyona uğraması, serum proteinlerine özgül olmayan bağlanma göstermesi, hızlı renal filtrasyona uğraması, mononükleer fagositik sistem tarafından klirensi tümör dokusuna ulaşmadan önce karşılaşılan zorluklardır. Tümör dokusuna ulaştıktan sonra ise hücreler tarafından özgül olmayan alımı, nispeten büyük boyut ve negatif yüzey yükünden dolayı hücreye transfeksiyonunun zorluğu, lizozomal

parçalanmaya uğraması gibi engelleyici faktörler terapötik etkinliğini düşürmekte ve klinikte kullanımını sınırlandırmaktadır (47, 65, 66). Bu nedenle siRNA'nın hücre membranından geçişini ve terapötik etkinliğini arttırmak için çeşitli taşıma yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla farklı viral taşıyıcı sistemler ve viral olmayan taşıma yaklaşımları geliştirilmiştir. Gen taşıyıcı sistem olarak ilk kullanılan vektörler, viral vektörler olmuştur. Aktarılan genin aşırı ekspresyonu ve gen transfeksiyon etkinliğinin oldukça yüksek olması dolayısıyla *in vivo* çalışmalarda ve klinik araştırmalarda retrovirüs ve adenovirüs gibi vektörler en çok tercih edilen taşıyıcılar olsa da immün yanıt oluşturma riski, güvenilirlik problemleri, çalışma zorluğu, yüksek maliyet, hücre tipine özgü hedeflendirilmiş taşınma sağlanamaması gibi önemli sakıncaları bulunmaktadır. Bu nedenle transfeksiyon etkinliği daha düşük olmasına rağmen viral olmayan yöntemler güvenilirlik, tekrarlanabilirlik ve maliyet bakımından daha üstün bulunmaktadır. Viral olmayan yöntemler ile gen aktarımı için elektroporasyon, doğrudan enjeksiyon veya partikül bombardımanı ya da genin membrandan geçişini arttıracak kimyasal maddelerle (katyonik lipit ve polimerler) kompleks oluşturması, reseptör aracılı endositoz gibi yöntemler kullanılmaktadır (67). Tüm bu yaklaşımların dışında son yıllarda en çok dikkat çeken ve öne çıkan gen taşıyıcı sistem yaklaşımı ise nanopartiküler sistemlerdir (68).

2.6.1. Nanopartiküler siRNA Taşıyıcı Sistemler

Son yıllarda üzerinde en çok çalışılan viral olmayan gen transfeksiyon yöntemi olan nanoteknolojik taşıyıcı sistemler oldukça umut vermektedir. Nanoboyutlu gen taşıyıcı sistemler hem hücrelere transfeksiyonu sağlamakta hem de siRNA'nın tedavi edici etkinliğin önünde engel teşkil eden özelliklerini iyileştirmekte, böylece tedavi edici etkinliği arttırmaktadır. Nanoteknolojik sistemlerin siRNA taşıyıcı sistem olarak üstünlükleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir (48);

- Kanda serum nükleazları tarafından enzimatik degredasyona hassas olan siRNA'nın stabilitesini arttırmak,

- Hücreler tarafından özgül olmayan alımın önüne geçmek,

- Mononükleer fagositik sistem tarafından hızlı klirensi nedeniyle oldukça kısa olan yarılanma ömrünü (5-60 dakika) arttırmak,

- Nispeten büyük boyut ve negatif yüzey yükünden dolayı zor ve kısıtlı olan hücre transfeksiyonu etkinliğini arttırmak,

- Nanotaşıyıcı sistemlerin, kanser dokusundaki artmış geçirgenlik ve tutulma etkisi (Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR) ile pasif hedefleme özelliğinden yararlanılarak daha düşük konsnatrasyonlarda etkinlik sağlamak ve sistemik etkileri azaltmak,

- Nanotaşıyıcı sistemlerin aktif hedefleme özelliklerinden yararlanarak kanser hücrelerine seçici etkiyi arttırmak.

Bu amaçla kullanılan nanoteknolojik gen taşıyıcı sistemler aşağıda sıralanmakta olup en sık kullanılanlar Şekil 2.4'te şematize edilmiştir.

- Lipit ve gen molekülü arasında elektrostatik etkileşme ile oluşan lipit-gen kompleksleri (lipopleks) (69),

- Polimer ve gen molekülü arasında elektrostatik etkileşme ile oluşan polimer-gen kompleksleri (polipleks) (70),

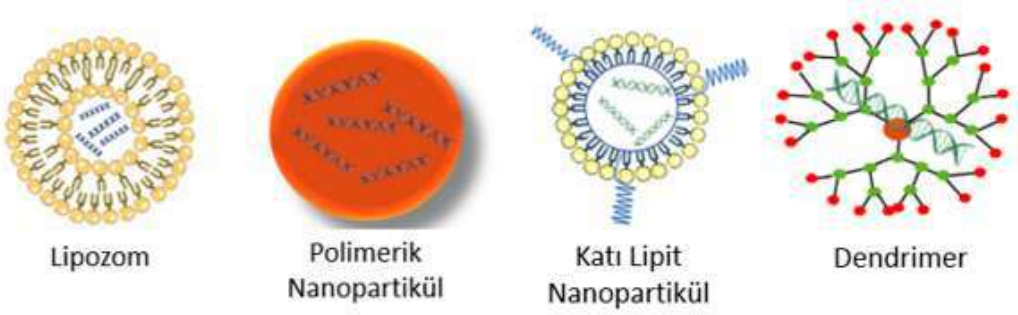
- Lipozomlar ya da katı lipit nanopartiküller gibi lipit yapılı nanopartiküler sistemler (71-73),

- Polimerik nanopartiküller, polimerik miseller ve dendrimerler gibi polimerik yapılı sistemler (74-76),

- Altın nanopartiküller, demir oksit nanopartiküller gibi metal yapılı nanopartiküller (77, 78),

- Kuantum dotlar, karbon nanotüpler, silika nanopartiküller gibi inorganik yapılı sistemler (79, 80),

- Protein nanopartiküller yer almaktadır (81).



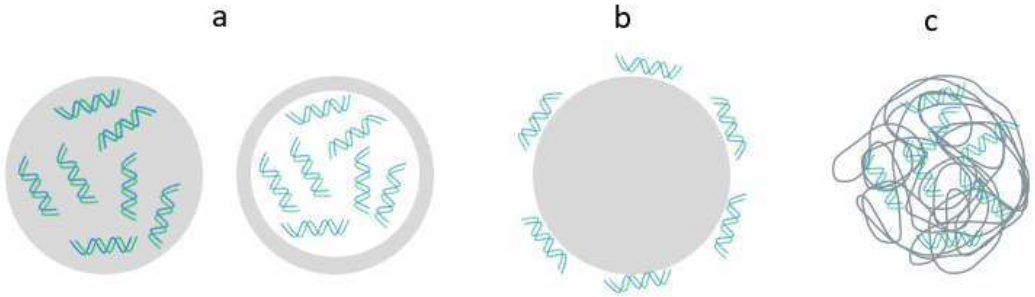
Şekil 2.4. siRNA taşınmasında kullanılan nanopartiküler sistemler (48).

2.6.2. siRNA Taşıyıcı Sistem Olarak Polimerik Nanopartiküller

Polimerik ve lipit yapılı nanoteknolojik taşıyıcı sistemlerin pek çok kanser türünün gen tedavisinde lokal veya sistemik olarak kullanıldığı çok sayıda klinik araştırma bulunmaktadır. KHOAK tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen 3p21gfus1 (fus 1) tümör baskılayıcı gen, intravenöz olarak kullanılmak üzere lipozomal taşıyıcı ile formüle edilmiş (DOTAP: Cholesterol-Fus1 Liposome Complex) ve faz I klinik araştırmaları tamamlanmıştır (82). Ancak akciğer kanserine yönelik gen tedavisinde klinik araştırmaların sayısının son derece az olduğu görülmektedir.

Polimerik nanopartiküller partikül büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir, doğal ya da sentetik polimerlerden üretilen nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Taşıdığı etkin maddenin istenen bölgeye hedeflendirilmesi, salımının kontrolünü ve sürekli olmasını sağlamak, *in vitro* ve *in vivo* stabilitesini arttırmak amaçlarıyla kullanılmaktadır. Aktif veya pasif hedeflendirme neticesinde tedavi etkinliğinin arttırılması, sistemik toksik ve yan etkilerin azaltılması, tedavi edici dozun azaltılması, farmakokinetik özelliklerin iyileştirilmesi, hastanın tedaviye uyuncunun arttırılması gibi önemli üstünlükler sağlamaktadır. Polimerik nanopartiküller diğer taşıyıcı sistemlerle kıyaslandığında, biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahip olmaları ve taşıdığı etkin maddenin stabilitesini arttırmaları ve dolaşımda uzun süre kalabilmeleri, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olmaları, üretim tekniklerinin nispeten kolay olması, homojen şekil ve boyutta üretilebilmesi, yüksek etkin madde yükleme kapasitesi gibi üstünlüklere sahiptir (83, 84). Gen taşıyıcı sistem olarak hazırlanan polimerik nanopartiküller ile ilgili yapılan çalışmalarda polimer olarak polilaktikasit (PLA) (85), PLGA (86), polietilenimin (PEI) (87), poli(L-lizin) (PLL) (88), kitosan (89), polialkilsiyanoakrilat (PACA) (90) kullanıldığı görülmektedir. Polimerik nanopartiküller ile gen molekülünün taşınması üç şekilde gerçekleşebilmektedir (Şekil 2.5);

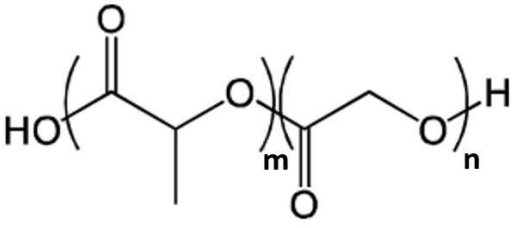
1- Molekülün polimerik matriks ya da rezervuar içinde enkapsüle edilmesi,
2- Molekülün elekrostatik etkileşme ile nanopartikül yüzeyine adsobsiyonu,
3- Polimer ve gen molekülü arasında kompleks oluşturulması veya polimer ile kondensasyon (91).



Şekil 2.5. Gen taşıyıcı polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi. Matriks ya da rezervuar sistemler (a), elektrostatik etkileşme ile yüzeye adsorpsiyon (b), polimer-gen kompleksi (c).

2.6.3. siRNA Taşıyıcı Sistem Olarak Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) Nanopartiküller

FDA tarafından insanda kullanımı onaylanmış bir polimer olan PLGA, PLA ve poliglikolik asitin (PGA) çeşitli oranlarda polimerize olması ile oluşan alifatik, poliester yapılı bir kopolimerdir (Şekil 2.6). Toksik olmaması, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması, gen taşınmasına uygun olması, istenen kontrollü salım özelliklerini sağlaması gibi gerekçelerle polimerik gen taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında oldukça uygun bir materyaldir. PLGA nanopartiküllerin siRNA taşıyıcı sistem olarak kullanılması ilk defa 2006'da Yuan ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Model siRNA olarak yeşil floresan protein (green fluorescent protein, GFP) susturucu siRNA kullanılmış ve PLGA nanopartikülleri ile hücreye başarılı bir taşıma sağlanmıştır (92) (93). Bu çalışma PLGA nanopartiküllerin siRNA iletiminde kullanılması konusunda diğer araştırmaların da önünü açmıştır. Tablo 2.3'te literatürde yer alan, kanser tedavisine yönelik siRNA taşınmasında kullanılan bazı PLGA nanopartiküler sistemler özetlenmektedir.



Şekil 2.6. PLGA'nın moleküler yapısı (94).

Tablo 2.3. siRNA taşınmasında kullanılan PLGA nanopartiküller.

siRNA	Nanopartiküler Taşıyıcı Sistem	Uygulama	Referans
ERK2 siRNA (siERK2)	PLGA nanopartikül	Vajinal mukoza	(95)
Akuaporin-1 siRNA	siRNA-kitosan kompleksi enkapsüle edilmiş PLGA nanopartikül	Karaciğer kanseri	(96)
p53 siRNA	Kolesterol ve DOTAP içeren PLGA-PEG nanopartikül	Osteosarkom	(97)
Fokal adezyon kinaz (FAK) siRNA	Hiyalüronik asit-PLGA nanopartikül	Over kanseri	(98)
MDR1 ve BCL2 siRNA	PLGA nanopartikül	Over kanseri	(99)
P-gp siRNA	C_{16}-S-S-PEI-PLGA nanopartikül	Çoklu ilaç direnci gösteren meme kanseri	(100)
EGFP siRNA	PLGA nanopartikül içeren nanokompozit mikropartikül	Akciğer kanseri	(101)
BCL2 siRNA	EGF ile modifye edilmiş mPEG-PLGA-PLL nanopartikül	Akciğer kanseri	(102)
Lusiferaz hedefli siRNA	PEI-PLGA nanopartikül	Meme kanseri	(103)
Osteopontin siRNA (siOPN)	PEI-PLGA nanopartikül	Meme kanseri	(104)
EGFR siRNA	Angiopep-2-modifiye PLGA nanopartikül	Glioma	(105)
STAT3 siRNA	PEI-PLGA nanopartikül	Akciğer kanseri	(106)

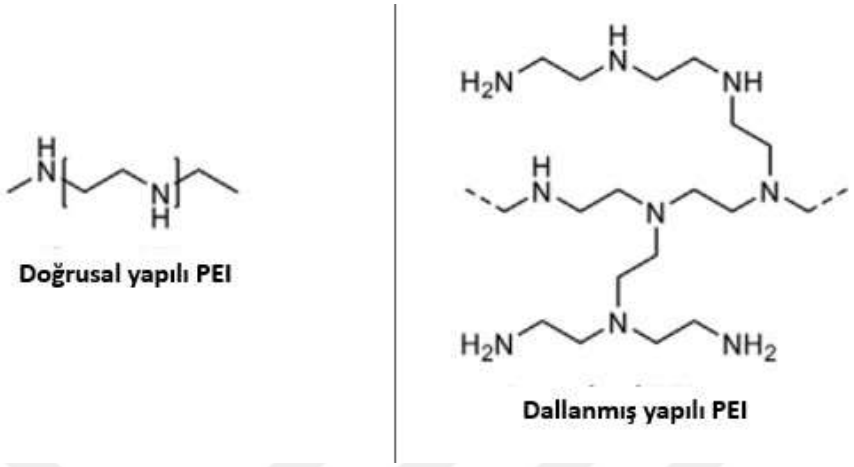
PLGA nanopartiküller başlıca dört farklı yolla hazırlanabilmektedir. Bu yöntemler çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma, nanoçöktürme (çözücü yer değiştirme), emülsiyon oluşturma-çözücü difüzyon ve tuzla çöktürmedir. Literatürdeki çalışmalarda en yaygın kullanılan yöntem, siRNA gibi suda çözünebilen moleküllerin enkapsülasyonu için uygun olması dolayısı ile çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemidir (107, 108). Bu yöntem etkin maddenin sulu çözeltisinin polimerin organik çözeltisine ilave edilmesiyle hazırlanan primer emülsiyonun daha yüksek hacimli, yüzey etkin madde içeren su fazına eklenmesiyle çoklu emülsiyon oluşturulması ile gerçekleştirilir. Homojenizasyon işlemleri mekanik karıştırma, ultrasonik homojenizasyon ile karıştırma, yüksek basınçlı sıvı homojenizatörden geçirme gibi farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir (107, 109).

PLGA ile hazırlanmış nanopartiküller gen taşıyıcı polimer olarak birçok üstünlüğe sahiptir ancak anyonik özellikte olan siRNA ile kompleks oluşturabilme ve negatif yüzey yüküne sahip hücre membranından geçerek transfeksiyonun sağlanabilmesi için, hazırlanmaları sırasında katyonik özelliğe sahip uygun yardımcı maddelerin kullanımını gerektirmektedir. Bu amaçla gerekleştirilen çalışmalarda PEI (110, 111), PLL (112), kitosan (113) gibi katyonik özellikli polimerler veya dioleoiltrimetilamonyumpropan (DOTAP) (101) gibi katyonik lipitler kullanılmış ve bu şekilde siRNA taşıma ve hücreye giriş etkinliğinin arttırıldığı gösterilmiştir.

2.6.4. Polietilenimin (PEI)

PEI doğrusal ya da dallanmış yapıda bulunabilen organik bir polimerdir (Şekil 2.7). Sahip olduğu yüksek yük yoğunluğu dolayısıyla gen molekülleri ile başarılı kompleks oluşturma, gen yükleme ve transfeksiyon etkinliğinin oldukça yüksek olması yanında, sahip olduğu protonlanmamış amin grupları sayesinde hücre içine girdikten sonra endolizozomal pH'ı tamponlaması ve lizozomal degradasyon meydana gelmeden sitoplazmada gen salımını sağlaması gibi özellikleri nedeniyle transfeksiyon ajanı olarak gen taşınmasına yönelik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (114). Ancak yüksek konsantrasyonlarda neden oldukları toksik etkiler kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Çeşitli molekül ağırlıklarına sahip ticari türevleri bulunmakla birlikte gen transferi için en uygun molekül ağırlığı aralığının 5 ile 25 kDa olduğu

bilinmektedir. Molekül ağırlığı artıkça transfeksiyon etkinliği artmakla birlikte hücresel toksisitesi de artmaktadır (115).



Şekil 2.7. Polyethylenimine (PEI)'in moleküler yapısı (116).

PEI'nin siRNA taşınmasında kullanımı farklı yaklaşımlar ile gerçekleştirilebilmektedir.

- PEI'nin katyonik yükü aracılığı ile anyonik yüklü siRNA ile elektrostatik etkileşmeye girerek kompleks yapı (gen-polimer kompleksi, polipleks) oluşturması,

- PEI'nin başka bir polimerle kovalent bağ ile bağlanarak kopolimerize edilmesi,

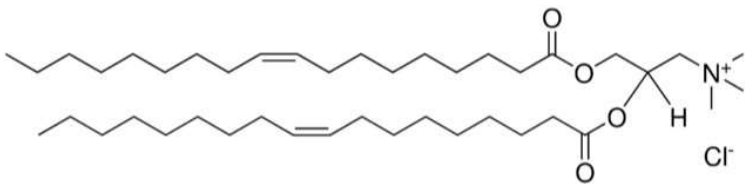
- Başka bir polimer ile hazırlanan nanopartikülün yüzeyinin PEI ile kaplanması ya da matriksi içine eklenerek modifiye edilmesi en çok kullanılan üç yaklaşımdır (117, 118).

Literatüde, PLGA nanopartiküllerin siRNA taşıma ve transfeksiyon etkinliklerinin arttırılması amacıyla PEI'nin yardımcı polimer olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda PEI farklı yöntem ve yaklaşımlar ile kullanılmıştır. Katas ve ark. PLGA'ya farklı oranlarda PEI ekleyerek emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PLGA nanopartiküller hazırlamış, siRNA ise nanopartiküllere yüzeye adsorpsiyon yöntemi ile yüklenmiştir (119). Patil ve ark. ise iki farklı yöntem kullanmış, birinci yöntemde çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile, siRNA'yı PEI-PLGA polimer karışımına ekleyerek nanopartikülü hazırlamış ve siRNA'yı nanopartikül içine enkapsüle etmişlerdir. Diğer yöntemde ise önce siRNA-PEI kompleksi oluşturulmuş, daha sonra bu kompleks

emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PLGA nanopartikül içine enkapsüle edilmiştir. İki farklı yöntem ile hazırlanan nanopartiküllerin siRNA enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %80 ve %96 olarak raporlanmıştır (103).

2.6.5. Dioleoiltrimetilamonyumpropan (DOTAP)

Katyonik lipitler, siRNA ve diğer nükleik asitlerin taşınmasında en yaygın kullanılan viral olmayan vektörlerdir. Katyonik lipitler lipozom ya da katı lipit nanopartikül gibi nanopartiküler taşıyıcı sistem olarak ya da nükleik asit ile kompleks oluşturarak lipopleks şeklinde kullanılabildikleri gibi polimerler ile birlikte kullanılarak polimer-lipit hibrit nanopartiküller olarak da hazırlanabilmektedirler. Bu amaçla en yaygın kullanılan lipitler 1,2-dioleoil-3-trimetilamonyumpropane (DOTAP) ve 1,2-di-ooktadesenil-3-trimetilamonyumpropan (DOTMA)'dır (120, 121). DOTAP (Şekil 2.8), transfeksiyon kapasitesinin daha yüksek olması, daha kolay biyodegredasyona uğrayabilmesi ve buna bağlı olarak daha az toksik olması nedenleriyle siRNA taşınmasında en çok tercih edilen lipittir (122). PLGA gibi polimerler ile hazırlanan, biyouyumluluk, yüksek stabilite gibi üstünlüklere sahip polimerik nanopartiküller, DOTAP gibi yüksek siRNA taşıma ve transfeksiyon etkinliğine sahip lipitler ile modifiye edilerek siRNA taşıma kapasitesi arttırılmış, toksik etkisi azaltılmış hibrit sistemler tasarlanabilmektedir. Özellikle PLGA nanopartiküller gibi anyonik yüzey yüküne sahip taşıyıcılar için nanopartikülün katyonik özellikteki DOTAP ile modifiye edilmesi, nanopartiküle siRNA taşıma fonksiyonu kazandırılması açısından önemli bir yaklaşımdır (123).



Şekil 2.8. Dioleoiltrimetilamonyumpropan (DOTAP)'ın moleküler yapısı (124).

Colombo ve ark. PLGA polimerine %15 oranında DOTAP ekleyerek, çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile polimer-lipit hibrit nanopartiküller hazırlamışlar ve model siRNA olarak kullandıkları yeşil floresan protein siRNA'yı taşıma kapasitesini değerlendirmişlerdir. DOTAP eklenerek hazırlanan formülasyonların (%66,1) sadece PLGA ile hazırlanan formülasyona

(%9,3) kıyasla çok daha yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu, H1299 isimli KHOAK hücrelerinde hedef geni susturma etkinliğinin arttırıldığı gösterilmiştir (125). Jensen ve ark. inhaler kullanıma yönelik olarak, 0 ile %25 arasında değişen oranlarda DOTAP ile modifiye edilmiş PLGA nanopartikülleri aynı yöntem ile hazırlamış, yeşil floresan protein siRNA için enkapsülasyon etkinliğinin artan DOTAP miktarı ile arttığını, H1299 hücrelerinde gen susturma etkinliğinin de artan DOTAP miktarı ile arttığını belirtmişlerdir (101). Wu ve ark. PLGA'ya belirli bir oranda DOTAP eklenerek hazırlanan hibrit nanopartiküller ile DOTAP-siRNA lipoplekslerin siRNA taşıma etkinliklerini ve toksisitelerini karşılaştırmıştır. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin siRNA enkapsülasyon etkinliğinin lipoplekslerden oldukça düşük olmakla birlikte farelerde intratrakeal uygulama sonrası akciğerde meydana gelen, DOTAP'tan kaynaklanan inflamatuvar yanıtı azalttığını göstermişlerdir (126).

2.7. siRNA Taşıyıcı Polimerik Nanopartiküllerde Aktif Hedeflendirme Yöntemleri

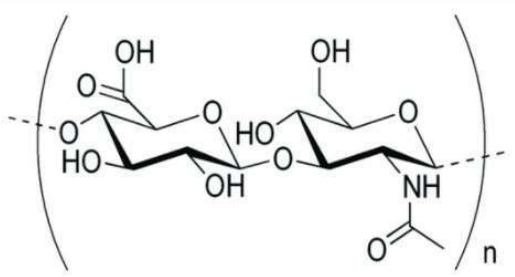
Nanopartiküler sistemlerin kanser bölgesine hedeflendirilmesinde, pasif hedeflendirme ve aktif hedeflendirme olmak üzere iki temel mekanizma bulunmaktadır. Pasif hedeflendirme tümör dokusu ve nanopartiküler sistemlerin kendilerine özgü yapılarından meydana gelen, artmış permeabilite ve retensiyon etkisi ile sağlanmaktadır (127). Aktif hedeflendirme yöntemleri ise tümör dokusuna ve kanser hücrelerine daha etkin ve daha özgül bir hedefleme sağlamak için geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin çeşitli şekillerde modifiye edilerek tümör mikroçevresinde ilaç salımına daha duyarlı hale getirilmesi ya da çeşitli moleküllerin nanopartiküllerin yüzeyine bağlanarak kanser hücrelerinde aşırı eksprese olan reseptör, protein gibi yapılara artmış bağlanma göstermesi esaslarına dayanmaktadır. Bu amaçla küçük moleküller kullanılabildiği gibi, peptit, protein, antikor gibi makromoleküller de kullanılabilmektedir (128). Konvansiyonel kemoterapötik moleküllerde olduğu gibi siRNA'nın da kanser hücrelerine özgül olarak taşınması, sağlıklı hücrelerde istenmeyen etkilerin oluşmasının engellenmesi ve anti-kanser etkinliğin artırılması bakımından oldukça önemlidir. Konvansiyonel kemoterapötik ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemlerde uygulanan aktif hedeflendirme yaklaşımları, siRNA taşıyıcı nanopartiküller için de uygulanabilmektedir. Bu amaçla geliştirilen aktif hedeflendirme yöntemleri aşağıda belirtilmektedir;

- Tümör mikroçevresine duyarlı taşınma; pH-duyarlı nanopartiküler sistemler, enzim-duyarlı nanopartiküler sistemler, redoks-duyarlı nanopartiküler sistemler (129, 130).
- Reseptör aracılı taşınma; lüteinleştirici hormon salgılayan hormon reseptörü, folat reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptörü, CD44 reseptörü, transferrin reseptörü gibi özellikle akciğer kanser hücrelerinde aşırı eksprese olan reseptör ligandları ile nanopartiküllerin modifiye edilmesiyle elde edilen sistemler (121, 131).
- Aptamer hedefli taşınma (74).

2.7.1. Hiyalüronik Asit

Nanopartiküllerin tümör hücresine yüksek ilgi gösteren maddeler ile modifiye edilmesiyle tümör dokusuna özgül hedefleme sağlayan, yüksek etkinlikli sistemler tasarlanmaktadır. Akciğer kanserlerinde hücre yüzeyinde yüksek derecede eksprese olduğu bilinen bazı yüzey reseptörleri lüteinleştirici hormon salgılayıcı hormon reseptörü, folat reseptörü, transferrin reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptörü ve CD44 yüzey reseptörüdür (132).

Hiyalüronik asit (HA) veya hyaluronan, biyoparçalanabilir, immünojenik olmayan, toksik olmayan, suda çözünür bir doğal yapılı anyonik bir polisakkarittir (Şekil 2.9). HA hücrelerde adezyon, motilite, proliferasyon, farklılaşma ve hücre migrasyonu gibi süreçlerde rol alır. Etkisini hücre yüzeyindeki CD44 reseptörü ile etkileşerek göstermektedir. Akciğer kanseri dahil olmak üzere çoğu kanser hücrelerinde aşırı eksprese olan CD44 yüzey proteinin ligandıdır ve literatürde çeşitli kanser türlerinde hedefleme ajanı olarak çok sayıda uygulaması mevcuttur (69, 133-135). HA'nın ekstraselüler matriksin doğal bileşenlerinden olması, biyoparçalanabilir ve biyouyumlu olması hedefleyici ligand olarak kullanımında önemli tercih sebepleridir. Nanopartiküler sisteme dahil edilmesiyle tümöre aktif hedefleme yapabilmesinin yanısıra reseptör aracılı endositoz aracılığıyla hücre içine giren siRNA miktarını arttırmasının da mümkün olduğu değerlendirilmektedir.



Şekil 2.9. Hiyalüronik asitin moleküler yapısı (136).

Zhang ve ark. siRNA taşıyıcı kitosan nanopartiküllerin yüzeyini elektrostatik etkileşme aracılığıyla HA ile modifiye etmiş, *in vitro* ve *in vivo* akciğer kanseri modellerinde etkinlik değerlendirmesi yapmışlardır. HA ile aktif hedeflendirilen nanopartiküllerin *in vitro* ortamda akciğer kanseri hücrelerine transfeksiyon etkinliğinin arttığı, hedef geni susturma etkinliğinin de hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalarda, hedeflendirilmemiş nanopartiküllerden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (137).

2.8. Polimerik Nanopartiküllerin Karakterizasyonları

Polimerik nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, yüzey yükü, partikül şekli, yüzey yapısı gibi karakteristik özellikleri stabilite, ilaç taşıma kapasitesi, *in vitro* ve *in vivo* performansı, toksisitesi gibi pek çok önemli özelliğini doğrudan etkilemektedir. Ayrıca belirli bir formülasyon ve hazırlama yöntemiyle üretilen nanopartiküler sistemlerin homojen yapı ve özelliklere sahip olması, üretim tekrarlanabilirliği ve dolayısıyla etkinlik ve güvenilirlik açısından önemli ve gereklidir. Bu nedenle polimerik nanopartiküllerin hazırlama sonrasında iyi bir şekilde karakterize edilmeleri son derece önemlidir. Polimerik nanopartiküllerin yapısı kullanılan polimer ve yardımcı maddelerin türü ve miktarı, hazırlama yöntemi ve dış ortam koşullarından oldukça etkilenmektedir. Bu değişkenler optimize edilerek istenen özelliklere sahip, üretim tekrarlanabilirliği yüksek nanopartiküler sistemler elde edilebilmektedir. Ancak polimerik nanopartiküler sistemler için henüz diğer farmasötiklerde olduğu gibi standardize edilmiş karakterizasyon yöntemleri ya da yetkili otoritelerce düzenlenmiş protokoller bulunmamaktadır. Nanopartiküllerin karakterize edilmesi gereken önemli özellikleri ve en yaygın kullanılan analiz yöntemleri aşağıda sıralanmaktadır (138, 139);

- *Partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve morfolojik yapı*; dinamik ışık saçılımı, atomik kuvvet mikroskobu, foton korelasyon spektroskopisi, elektron mikroskopisi.

- *Kimyasal bileşenleri ve kristal özellikleri*; atomik absorbsiyon spektroskopisi, X-ışını kristalografisi,

- *Yüzey analizi*; X-Işını fotoelektron spektroskopi, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi.

- *Yüzey yükü, zeta potansiyel*; lazer doppler mikroelektroforezi.

- *İlaç-polimer etkileşmeleri*; diferansiyel taramalı kalorimetre.

- *İlaç yükleme etkinliği ve salım özellikleri*; yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, UV spektrofotometri.

- *pH*

- *Stabilite*; partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, ilaç içeriği, pH gibi özelliklerin analizi.

2.9. siRNA Yüklü Nanopartiküllerde Gen Susturma Etkinliği Tayin Yöntemleri

2.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Gen düzeylerindeki değişimlerin kanser başta olmak üzere pek çok hastalıkta belirleyici etmen olduğu bilinmektedir. Bu sebeple gen düzeylerindeki değişimlerin kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilebilmesi oldukça önemlidir. Gen tedavisi yöntemlerindeki hızlı gelişmeler ile birlikte, gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin tayini yalnızca biyolojik ya da patolojik bir durumun tespiti için değil tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de oldukça önemli hale gelmiştir. Gen ekspresyon düzeylerinin tayini için çeşitli teknolojik platformlar geliştirilmiştir. Northern blot, polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR), RNA dizileme (RNA Sequencing, RNAseq) ve DNA mikrodizilim kullanılan dört temel teknoloji olup alt tipleri bulunmaktadır. Her yöntemin üstünlük ve sakıncaları olmakla birlikte kullanım amacına göre en uygun yöntem seçilmektedir (140, 141).

PCR teknolojisi, 1984 yılında keşfedilişinden günümüze kadar gelişerek, gen moleküllerinin kalitatif ve kantitatif tayininde en yaygın kullanılan yöntem olmuştur. DNA polimeraz aracılığı ile bir nükleik asit molekülünün belirli bir segmentinin bir tüpte çoğaltılması işlemidir. Hedef ya da şablon DNA, oligonükleotit primerler,

nükleotitler, DNA polimeraz enzimi, florokrom boyalar ve reaksiyon tamponları bu tekniğin temel bileşenlerdir. PCR'ın çok sayıda farklı çeşitleri geliştirilmiş olmakla birlikte en yaygın kullanılan teknik gerçek zamanlı kantitatif PCR (real time quantitative PCR, RT-qPCR)'dır. İki aşamalı olup RNA'dan ters transkriptaz enzimi aracılığı ile tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın sentezlenmesi, daha sonra cDNA'nın standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarından oluşmaktadır (142, 143).

2.9.2. Western-Blot Yöntemi

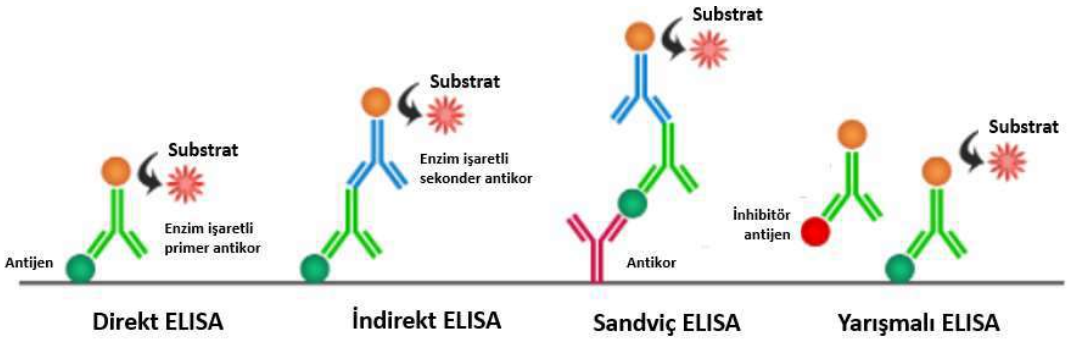
Proteinler insan vücudunun temel bileşenlerinden olup hayati fonksiyonların yerine getirilmesinde görev almaktadır. Genlerin ifadesi proteinler aracılığı ile meydana gelir. Translasyon süreci ile bir mRNA'nın taşıdığı kod belirli bir proteinin üretimi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle belirli genlerdeki değişimlerle karakterize hastalıkların tanısı, RNAi gibi bir gen tedavisinin sonuçlarının izlenmesi ve daha pek çok alanda proteinlerin yüksek doğrulukta kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilmeleri oldukça önemlidir. Protein tayininde en çok kullanılan yöntemler yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), absorpsiyon spektrofotometrisi, kütle spektrofotometrisi, bikinkoninik asit yöntemi (BCA), Kjeldahl yöntemi, Bradford yöntemi, poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), Western-Blot yöntemi ve enzime bağlı immünosorbent deneyidir (ELISA) (144).

Protein analizinde en çok kullanılan yöntemlerden biri olan Western-Blot, kompleks bir karışım içinden özgül proteinlerin ayrıştırılması ve miktar tayini amacıyla kullanılmaktadır. Proteinlerin elektroforez aracılığı ile jel ortamında yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması, ayrılan proteinlerin elektrik alan uygulanarak bir membrana aktarılması, özgül antikorlar ile işaretlenerek görüntülenmesine dayanmaktadır (145). Jel elektroforezin hazırlanmasında çoğunlukla poliakrilamit kullanılmaktadır. Jelde proteinlerin katottan anoda doğru ilerlemesi için sodyum dodesil sülfat (SDS) ile örnek içindeki tüm proteinlere anyonik özellik kazandırılır. Standart numuneleriyle birlikte jele yüklenen protein örneklerinin elektrik akımı uygulanarak bir kutuptan diğerine molekül ağırlıklarına bağlı olarak farklı hızlarda ilerlemeleri ve böylece birbirlerinden ayrılarak jelde bantlar oluşturmaları sağlanır. Bu bantların gözlemlenmesi örneklere jele yüklemeden önce eklenen bromfenol mavisi gibi bir boyar madde ile sağlanmaktadır. Jelde yürütme

işlemi tamamlandıktan sonra elektrik alan altında jeldeki proteinlerin katottan anoda hareket olacak şekilde bir nitroselüloz veya poliviniliden florür (PVDF) membrana geçmeleri sağlanır. Membran yüzeyi, herhangi bir özgül olmayan protein-antikor bağlanmasının önüne geçmek amacıyla BSA ya da süt tozu gibi bir protein ile bloke edilir. Ardından analiz edilmek istenen proteine özgü antijen (primer antijen) ile membran inkübe ediler. Bağlanma süresi sona erdiğinde yıkama sonrası membran enzim bağlı (genellikle Horseradish Peroksidaz (HRP) kullanılır) ikincil antikor ile inkübe edilir. İkincil antikor bağlanması da sona erdiğinde yıkama sonrası membran üzerine, ikincil antikora bağlı enzimin substratı olan ve enzim-substrat etkileşmesi sonrası ışıma yaparak görüntülemeyi sağlayacak olan kemilüminesans madde eklenir ve uygun bir görüntüleme cihazında ışıma görüntülenir. Işımaların yoğunluğunun ölçülmesi ve ilgili proteinin oluşturduğu bant yoğunluğunun negatif kontroller ile karşılaştırılmasıyla göreceli bir protein ölçümü sağlanmaktadır (145-147). Western-Blot tekniği siRNA ile gen susturma çalışmalarında hem transfeksiyon etkinliğinin hem de susturma etkinliğinin protein düzeyinde gösterilmesi için en çok kullanılan yöntemdir (148, 149).

2.9.3. Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA)

Protein analizinde yaygın kullanılan kantitatif yöntemlerden biri olan ELISA protein (antijen) ile antikor arasındaki özgül bağlanmaya dayalı bir yöntemdir. Hedef proteinin veya özgül antikorun katı ve sabit bir yüzeye adsorpsiyon yöntemiyle sabitlenmesi, enzim konjuge edilmiş özgül antikorun ortama eklenmesi ve antijen-antikor bağlanması için inkübasyonu, bağlanmayan antikorun yıkama ile ortamdan uzaklaştırılması, ortama substrat eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan sinyalin kolorimetrik, florometrik ya da luminesans ölçümüne dayalı yöntemlerle okunması aşamalarından oluşmaktadır. Doğrudan, dolaylı, sandviç ve yarışmalı olmak üzere farklı ELISA teknikleri geliştirilmiştir (Şekil 2.10) (150, 151). ELISA hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve pikogram düzeyine kadar duyarlı ölçüm yapılabilen bir yöntem olması nedeniyle siRNA bağlı gen susturma etkinliğinin protein ekspresyonu düzeyinde ölçülmesinde kullanılabilen, Western-Blot tekniğine alternatif bir yöntemdir (152).



Şekil 2.10. ELISA yöntemlerinin şematik gösterimi (153).

2.10. Metabolomik Çalışmalar

Omik teknolojisi, bir organizmayı meydana getiren molekülleri tanımlayan yöntemler bütünüdür. Genlerin (genomik), mRNA'nın (transkriptomik), proteinlerin (proteomik) ve metabolitlerin (metabolomik) evrensel yöntemlerle, yüksek doğruluk ve kesinlikle kapsamlı olarak tayin edilmesini amaçlar. Omik teknolojileri, normal fizyolojik süreçleri aydınlatmanın yanında hastalıkların tanısı ve seyrinin izlenmesi, tedavi yöntemleri geliştirilmesi ve tedavilere yanıtların izlenmesi için kullanılmaktadır. Omik teknolojiler özellikle bireysel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli potansiyele sahiptir (154, 155).

Metabolom canlı bir organizmada bulunan metabolitlerin tamamını ifade etmektedir (156). Metabolomik ise belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda bulunan, molekül ağırlığı 1000 Da'nın altında olan küçük moleküllü metabolitlerin saptanması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesidir. Diğer omik teknolojiler organizmada olabilecek olayların bilgisini verirken metabolomik, yaşayan organizmanın fenotipinin anlık resmini göstermektedir. Bir organizmanın kimyasal parmak izi olarak da nitelendirilmektedir (157). Bu nedenle herhangi bir etmene maruz kalan organizmanın bundan nasıl etkilendiğini aydınlatabilme bakımından en uygun omik teknolojisidir (158).

Metabolomik çalışmalar birbirini takip başlıca üç aşamadan oluşmaktadır; numune hazırlama, numunelerin analiz ve verilerin analizi. Numunelerin hazırlanması metabolomik çalışmanın hangi biyolojik materyalden gerçekleştirileceği ve belirli hedef metabolitlerin tayini (hedeflenmiş metabolomik) ya da genel bir tarama (hedeflenmemiş metabolomik) yapılması durumlarına göre değişebilmektedir. Örneklerin toplanması, saklanması, ekstrakte edilmesi ve işlenerek analize hazır hale

getirilmesi aşamalarını kapsamaktadır. Metabolomik çalışmalar için kullanılacak analitik yöntemler, karmaşık biyolojik matrikslerden yüzlerce metaboliti aynı anda, yüksek hassasiyet, doğruluk ve kesinlikte tayin edebilecek özellikte olmalıdır. Nükleer manyetik rezonans (NMR), gaz kromatografisi (GC), HPLC ve kütle spektrofotometrisi (MS) metabolomik analizlerde başlıca kullanılan yöntemlerdir. Yüzlerce metabolitin her biri farklı bir kimyasal yapıya, polar/apolar, asit/baz gibi karakteristiklere sahip olacağı için hazırlanan numunelerin analizinin tek bir analitik yöntem ile yapılması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle bu yöntemler tek başına değil birlikte uygulanacak şekilde kullanılmaktadır. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), sıvı kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC-qTOF-MS) ve gaz kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (GC-qTOF-MS) en yaygın kullanılan tekniklerdir (159).

Akciğer kanserinde biyoişaretçilerin belirlenmesi, hastalığın tanısı, ilerlemesinin izlenmesi ve tümör yapısının karakterize edilmesi amaçlarıyla metabolomik yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma olmakla birlikte, tedaviye yanıtın izlenmesi için metabolomik analizlerin kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Tedavi öncesi ve sonrası yapılan metabolomik profillemeler ile hangi metabolitin varlığının tedaviye yanıtta etkili olabileceği, herhangi bir tedavinin uygulanması sonrasında hangi metabolitte değişim olduğu ve bunu iyileşme süreci ile ilişkisi olup olmadığı değerlendirilebilmektedir. Bu değerlendirmeler bireye özgü ve hedefe özgü etkin tedavi yöntemleri geliştirmek konusunda oldukça umut vericidir (160, 161).

Metabolomik, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin biyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde de umut vaat eden bir yaklaşımdır. Nanopartiküler sistemlerin toksik etkilerinin değerlendirilmesi (162-164), bir ilacın konvansiyonel yöntem ile uygulanması ile nanopartiküler sistem aracılığıyla uygulanması arasındaki biyolojik etkinlik farklılıklarının değerlendirilmesi (165, 166), farklı nanopartiküler sistemler arasındaki etkinlik farklılıklarının değerlendirilmesi için kullanılabilmektedir (167).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler

1,2-dioleoil- 3-trimetilamonyum-propan (DOTAP)	Avanti, ABD
A549 hücre hattı	CCL-185™, ATCC, ABD
Anti-KRAS antikor	FineTest, Çin
Asetonitril (LC-MS saflıkta)	Merck, Almanya
BEAS- 2B hücre hattı	CRL-9609™, ATCC, ABD
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Capricorn Scientific GmbH, Almanya
Fetal sığır serumu	Capricorn Scientific GmbH, Almanya
Formik asit	Merck, Almanya
Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (tablet formunda)	Sigma Aldrich, ABD
Gen özgül primer prob	NZYTech, Portekiz
Hiyalüronik asit ELISA Kiti	Bioassay Technology, Çin
iQuant™ RNA Tayin Kiti	ABP Biosciences, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
KRAS ELISA Kiti	Bioassay Technology, Çin
Metanol	Merck, Almanya
N-metil- N-trimetilsililtrifloroacetamit+trimetilkloros ilan (MSTFA + %1 TMCS	Thermo Fischer, ABD
NuPAGE™ Bis-Tris Gels poliakrilamit jel	Invitrogen, ABD
Nükleaz ari saf su	Dharmacon, ABD
ON-TARGETplus GAPD Kontrol siRNA havuzu (insan)	Dharmacon, ABD
Penisilin / Streptomisin	Capricorn Scientific GmbH, Almanya
Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (50:50) (MA: 38.000-54.000)	Sigma Aldrich, ABD

Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (50:50) (MA: 7.000-17.000)	Sigma Aldrich, ABD
Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (75:25) (MA: 4.000-15.000)	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenimin (PEI), dallanmış (Ma ~25,000)	Sigma Aldrich, ABD
Polivinil alkol (Ma 9.000-10.000)	Sigma Aldrich, ABD
qPCR nükleik asit boyası	Wizbiosolution, Kore
Ribonükleaz A (sığır pankreasından elde edilmiş)	Sigma Aldrich, ABD
siGENOME insan KRAS siRNA	Dharmacon, ABD
siGLO Yeşil Transfeksiyon İndikatörü	Dharmacon, ABD
siRNA tamponu	Dharmacon, ABD
Sodyum Hyaluronat (MA: 8.000-15.000)	Contipro, Çek Cumhuriyeti
Saf Su (LC-MS saflıkta)	Merck, Almanya
Tripsin-EDTA	Sigma Aldrich, ABD
RIPA tamponu	Santa Cruz, ABD
WesternBreeze® kemilüminesans deteksiyon kiti	Invitrogen, ABD
Yeşil RNA jel boyası	Invitrogen, ABD

3.2. Kullanılan Cihazlar

C18 için ön kolon (Phenomenex 50 mm × 2.1 mm, 5 µm) 100A	Merck, Almanya
C18 kolon (Luna Omega 1.6µm Polar C18 100A 50x2.1mm)	Merck, Almanya
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Thermo Scientific, ABD
Mikroplaka okuyucu, Versamax	Molecular Devices, ABD
Floresan mikroskop	Leica, Almanya
FT-IR spectrometre cihazı	PerkinElmer,ABD

Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) (GC-MS QP-2010 Ultra)	Shimadzu, Japan
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), Tecnai G 2 Spirit Biotwin	FEI, ABD
Hassas Terazi	Shimadzu, Japonya
HILIC kolon (ZIC-pHILIC 50 mm 2.1 mm, 53µm)	Merck, Almanya
HILIC kolon için ön kolon (ZIC-pHILIC)	Merck, Almanya
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	IKA, Almanya
iBlot® Blotlama Sistemi	Invitrogen, ABD
Karbondioksit inkübatörü	Sanyo, Japonya
Karbondioksitli inkübatör	Sanyo, ABD
Laminar hava akımlı hücre kültürü kabini	Clean Air, Hollanda
Liyofilizatör	Labconco, ABD
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayin cihazı, (Zetasizer Nano-ZS)	Malvern Instruments, UK
PCR cihazı	Applied Biosystems, ABD
pH metre	Hanna Instruments, ABD
Santrifüj cihazı	Hettich, Almanya
Qubit™ 4 Florometre	Thermo Fisher, ABD
Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-qTOF-MS sistem)	Agilent, ABD
Soğutuculu santrifüj cihazı	Ohaus, ABD

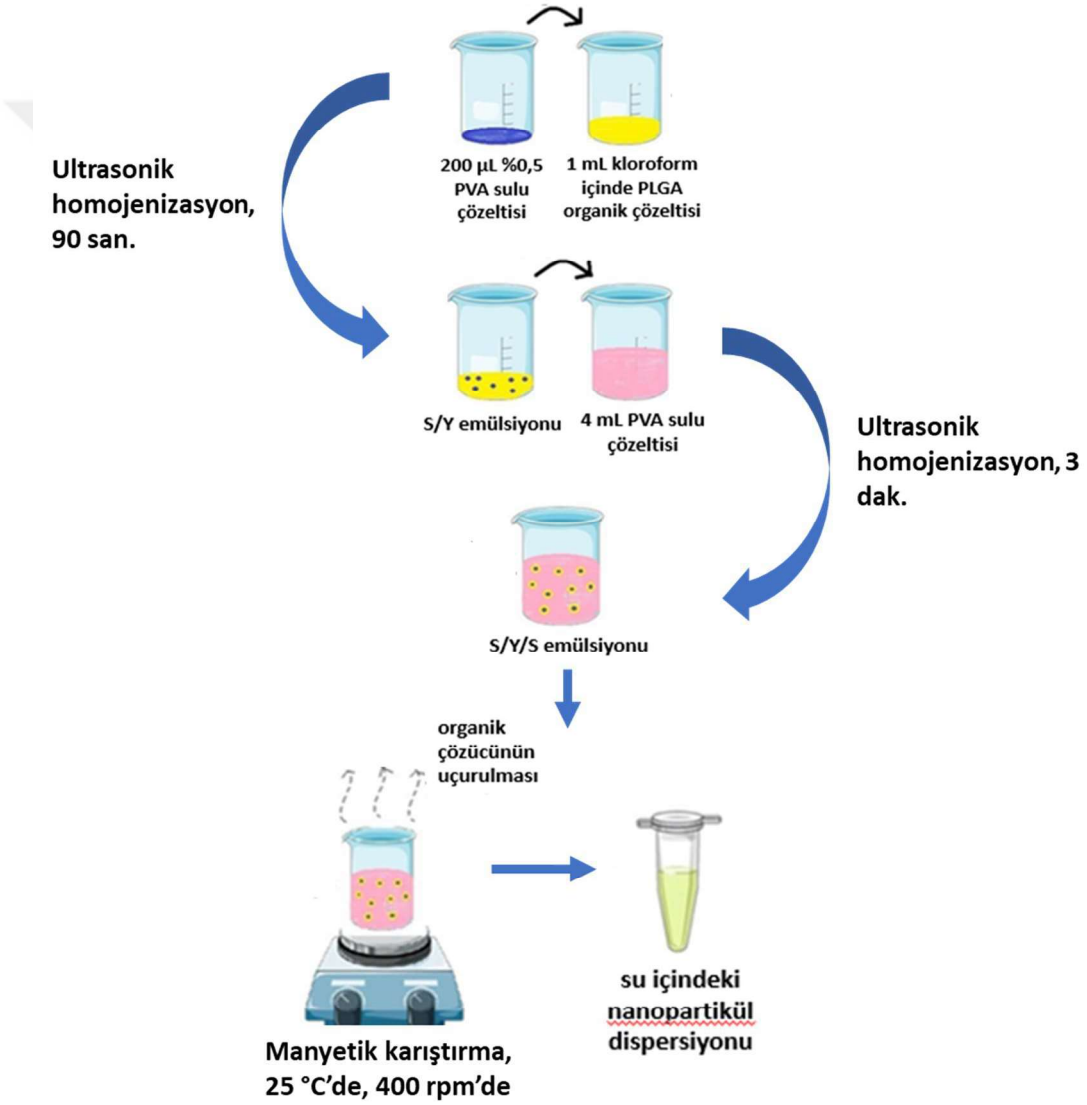
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Quanta 400F Field Emission	FEI, ABD
Ultra Hassas Terazi	Shimadzu, Japonya
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, ABD
Ultrasonik banyo	Advantage Lab, Almanya
Ultrasonik prob	Bandelin D-12207, Almanya
UV Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Vorteks	IKA, Almanya
X-Ray Fotoelektron Spektroskopi Cihazı (XPS), PHI 5000 VersaProbe	ULVAC-PHI, ABD
Yatay çalkalayıcı su banyosu	Memmert, Almanya

3.3. Polimerik Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları

Polimerik nanopartikül hazırlanmasında en yaygın kullanılan yöntem olan çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Yöntem değişkenlerinin belirlenmesi literatür çalışmalarının taranması ve yapılan ön çalışmalar ile literatürde kullanılan yöntem ve parametrelerin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (103, 168, 169). Yöntem Su/Yağ/Su (S/Y/S) tipi emülsiyon oluşturulması ve sonrasında organik fazın ortamdan uzaklaştırılmasıyla nanosüspansiyon elde edilmesi prensibine dayanmaktadır. Polimerin farklı molekül ağırlığı ve laktik asit:glikolik asit oranlarına sahip türevleri, farklı konsantrasyonları ve yüzey etkin maddenin farklı konsantrasyonları kullanılarak optimum formülasyon bileşenlerinin seçilmesi hedeflenmiştir.

PLGA'nın üç farklı türevinin organik çözücüde farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır. Yüzey etkin madde olarak düşük konsantrasyon (%0,5 a/h) ve hacimdeki polivinil alkol (PVA) (Ma 9.000-10.000 Da) sulu çözeltisi, organik çözelti üzerine eklenip ultrasonik homojenizatörde (Bandelin, Almanya), buz banyosu içerisinde 90 saniye karıştırılarak S/Y primer emülsiyonu hazırlanmıştır. Bu

emülsiyon farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PVA'nın sudaki çözeltisine eklenerek yine buz banyosu içinde, 3 dakika boyunca ultrasonik homojenizatörde karıştırılarak S/Y/S çift emülsiyonu elde edilmiştir. Takiben manyetik karıştırıcıda 4 saat karıştırma ile organik çözücü uçurulmuştur. Nanopartiküller 13.500 rpm'de, 20 dakika santrifüj (Hettich, Almanya) ile çöktürüldükten sonra liyofilizatörde (Labconco, ABD) dondurarak-kurutma işlemi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanma yöntemi Şekil 3.1'de şematize edilmiş, kullanılan formülasyon değişkenleri Tablo 3.1'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma tekniği ile nanopartiküllerin hazırlanması.

Tablo 3.1. Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyon değişkenleri.

Polimer tipi	PLGA (% a/h)	PVA (% a/h)
PLGA 50:50 (MA: 38.000-54.000)	2	1
PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000)	3	1,5
PLGA 75:25 (MA: 4.000-15.000)	4	2

PEI ve DOTAP ile modifiye katyonik nanopartiküllerin hazırlanması siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ilişkin ön formülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen formülasyon değişkenleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan PEI ve DOTAP miktarları literatür çalışmaları göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. 20 mg PLGA (%2 a/h) ve değişen miktarlarda PEI (dallanmış, Ma 25.000) veya DOTAP, 1 mL kloroform içinde çözülmüş ve elde edilen organik faz, primer emülsiyonun hazırlanması için %0,5 (a/h)'lik PVA çözeltisi ile ultrasonik homojenizatör kullanılarak karıştırılmıştır. Ardından bu primer emülsiyon dış su fazını oluşturacak olan 4 mL %1 (a/h)'lik PVA çözeltisine eklenerek tekrar ultrasonik homojenizatörde karıştırılmış ve S/Y/S çift emülsiyonu elde edilmiştir. Nanopartiküllerin elde edilmesi için organik fazın uzaklaştırılması sonrası 13.500 rpm'de, 30 dakika olmak üzere 3 kez santrifüj ve yıkama işlemleri uygulanmıştır. Formülasyon değişkenleri Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te özetlenmiştir.

Tablo 3.2. PEI ile modifiye katyonik nanopartikül formülasyonlarına ait değişkenler.

PEI (µg)	PLGA (% a/h) *	PVA (% a/h) *
300	2	1
500	2	1
1000	2	1

*Ön formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen optimum formülasyona ait bileşenler (PLGA %2 (a/h), PVA %1 (a/h), PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da)) kullanılmıştır.

Tablo 3.3. DOTAP ile modifiye katyonik nanopartikül formülasyonlarına ait değişkenler.

DOTAP (µg)	PLGA (% a/h) *	PVA (% a/h) *
1500	2	1
3000	2	1
6500	2	1

*Ön formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen optimum formülasyona ait bileşenler (PLGA %2 (a/h), PVA %1 (a/h), PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da)) kullanılmıştır.

3.4. siRNA Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum formülasyon değişkenleri kullanılarak siRNA taşıyan nanopartiküller hazırlanmıştır. 250 µL siRNA tamponu (5x siRNA tamponundan DNAaz-RNAaz içermeyen su ile seyreltilmiş 1x siRNA tamponu) ortamındaki 13,3 µg siRNA (siGENOME Human KRAS siRNA, Dharmacon, ABD) (1 nmol), polimerin (PLGA, 50:50 MA: 7.000-17.000 Da) kloroform içindeki %2 (a/h)'lik çözeltisi üzerine eklenip ultrasonik homojenizatörde, buz banyosu içerisinde 90 saniye karıştırılarak S/Y emülsiyonu hazırlanmıştır. Bu emülsiyon %1 (a/h) konsantrasyondaki yüzey etkin maddenin (PVA) sulu çözeltisine eklenerek buz banyosu içinde, üç dakika boyunca ultrasonik homojenizatörde karıştırılarak S/Y/S çift emülsiyonu elde edilmiştir. Oda sıcaklığında (25°C) manyetik karıştırıcıda 4 saat karıştırılarak organik çözücü uzaklaştırılmıştır ve takiben nanopartiküller soğutuculu santrifüjde 13.500 rpm ve 4°C'de, 20 dakika santrifüj ile çöktürüldükten sonra liyofilizatörde dondurarak-kurutma işlemi uygulanmıştır.

PEI ya da DOTAP içeren siRNA yüklü nanopartiküller ise ön formülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen formülasyon değişkenleri kullanılarak hazırlanmıştır

(103, 168). PLGA ve katyonik madde (PEI veya DOTAP), 1 mL kloroform içinde çözülmüş ve elde edilen organik faz, primer emülsiyonun hazırlanması için 250 µL siRNA çözeltisi ile ultrasonik homojenizatörde 90 saniye boyunca buz banyosu içerisinde karıştırılmıştır. Bu emülsiyon %1 (a/h) konsantrasyondaki yüzey etkin maddenin (PVA) sulu çözeltisine eklenerek buz banyosu içinde, üç dakika boyunca ultrasonik homojenizatörde karıştırılarak S/Y/S çift emülsiyonu elde edilmiştir. Oda sıcaklığında (25°C) manyetik karıştırıcıda 4 saat karıştırılarak organik çözücü uzaklaştırılmıştır ve takiben nanopartiküller soğutuculu santrifüjde 13.500 rpm ve 4°C'de, 20 dakika santrifüj ile çöktürüldükten sonra liyofilizatörde dondurarak-kurutma işlemi uygulanmıştır. Formülasyon bileşenleri Tablo 3.4'te özetlenmiştir.

Tablo 3.4. siRNA içeren nanopartiküle ilişkin formülasyon bileşenleri.

PLGA (% a/h)	PVA (% a/h)	DOTAP (µg)	PEI (µg)	siRNA (µg)
2	1	1500	1000	13,3

3.5. Hiyalüronik Asit Kaplı Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküllerin aktif hedefleme ajanı ile kaplama işlemi elektrostatik adsorpsiyon prensibi ile gerçekleştirilmiştir (168, 169). DOTAP ve PEI ile modifiye edilerek pozitif yüzey yükü kazandırılmış nanopartiküllerin yüzeyi, anyonik özellikteki hiyalüronik asit ile elektrostatik etkileşme yöntemiyle kaplanmıştır. Ön formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen optimum formülasyon değişkenleri kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin 20 mg'ı liyofilizasyon işlemi ardından 0,5; 1 veya 2 mg HA içeren 5 mL fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) ortamında disperse edilmiş ve oda sıcaklığında 4 saat boyunca sürekli karıştırma altında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından nanopartiküller soğutuculu santrifüjde 13.500 rpm ve 4°C'de, 20 dakika santrifüj ile çöktürüldükten sonra liyofilizatörde dondurarak-kurutma işlemi uygulanmıştır.

3.6. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1. FT-IR Analizi

Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonunu değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile infrared spektrumları, Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı'nda Bruker IFS 66/S (Bruker, ABD) ile kaydedilmiştir. IR spektrumları oda sıcaklığında potasyum bromür (KBr) pellet içinde 4000-400 cm^{-1} aralığında gerçekleştirilmiştir. KBr ağırlığının örnek ağırlığına oranı yaklaşık 100 olarak ayarlanmıştır.

3.6.2. Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi ve Zeta Potansiyel Tayini

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyelleri Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, İngiltere) cihazında sulu ortamda ölçülmüştür. Partikül büyüklüğü dağılımı tayinindeki temel esas, dinamik ışık saçılımı ile partiküllerin süspansiyon içinde Brownian hareketi yapmasına bağlı gelişen hareketlerinin ölçümüdür (170). Büyük boyutlu partiküllerin küçük olanlardan daha fazla ışık saçması sonucu büyüklük açısından hassas bir ölçüm yapılabilmekte ve özellikle agregasyon durumlarında stabil olmayan sistemler kolaylıkla ve hassas bir şekilde tespit edilebilmektedir. Zeta potansiyel ölçümü ise, partiküllerin yüklerine bağlı olarak, uygulanan elektriksel alan altındaki hareket hızlarının ölçülmesine dayanmaktadır (171). Hazırlanan nanopartiküllerin su içinde seyreltik dispersiyonları hazırlanmış ve partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümüne uygun küvetlerde ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.6.3. Morfolojik Değerlendirme

Hazırlanan siRNA yüklü olmayan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve yüzey yapılarının karakterizasyonu Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (138). Nanopartikül örnekleri, pirinç levha üzerinde çift tarafa yapışkan bantla sabitlenerek, altın-palladyum ile kaplama işlemleri sonrasında SEM cihazına (Quanta 400F Field Emission, FEI, ABD) yerleştirilmiştir.

Örneklerin incelenmesi sırasında 20kV'luk voltaj uygulanmış ve örneklerin SEM fotoğrafları çekilmiştir.

Ayrıca, hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve yüzey yapılarının karakterizasyonu Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM) ile de incelenmiştir. Nanopartikül formülasyonlarının ultra saf su içindeki dispersiyonlarının bir damlası (10 µL) karbon film kaplı bakır ızgara üzerine damlatılmış ve atmosfer koşullarında kuruması sağlandıktan sonra TEM cihazında (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin, FEI, ABD) görüntüleme yapılmıştır.

X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) katı materyallerin yüzeyleri hakkında kimyasal bilgi elde etmek için kullanılan gelişmiş bir yüzey analiz yöntemidir (172). Yöntem, katı örnekleri uyaran bir x-ışın demeti kullanarak fotoelektronların saçılmasını sağlar. X-ışını fotoelektron spektrometresi (PHI 5000 VersaProbe, ABD) ile nanopartiküllerin yüzey analizi gerçekleştirilmiştir.

SEM, TEM ve XPS analizleri Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.6.4. Hiyalüronik Asit Bağlanma Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Nanopartikül yüzeyine bağlanan hiyalüronik asitin miktar tayini için sandviç-ELISA yöntemi kullanılmıştır (173). Hiyalüronik asit ELISA kit (Bioassay Technology, Çin) ile ürün protokülüne uygun olarak analiz gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin HA ile yüzey modifikasyonu amacıyla formülasyonların hazırlanması sonrası, 13.500 rpm'de 30 dakika santrifüj uygulanarak nanopartiküller çöktürülmüş ve süpernatandaki, bağlanmayan HA'nın miktar tayini ELISA ile gerçekleştirilmiştir. 20-320 $ng.mL^{-1}$ aralığında seyreltilen standartlar ve nanopartiküllerden elde edilen örnekler, kit yönergesine uygun olarak HA antikoru ile kaplı kuyucuklara eklenmiş, üzerlerine sırasıyla biotin konjuge antikor ve streptavidin-HRP eklenmiş, 37°C'de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara HRP substratı eklenmiş ve karanlık ortamda, 37°C'de 10 dakika inkübasyon sonrası durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Örneklerin absorbansları mikroplaka okuyucuda 450 nm'de okunmuştur. Analiz üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş, elde edilen kalibrasyon doğrusu denkleminde

örneklerin absorbans değerinden konsantrasyonları hesaplanmıştır. Bağlanma etkinlikleri Eşitlik 3.1 kullanılarak yüzde (%) cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{HA Bağlanma Etkinliği (\%)} = (H1-H2)\ /H1 \times 100 \qquad (3.1.)$$

H1: Formülasyona eklenen HA miktarı (mg)
H2: Süpernatandaki bağlanmayan HA miktarı (mg)

3.6.5. siRNA Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

siRNA'nın nanopartiküllere enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi için siRNA yüklü nanopartiküller 13.500 rpm'de 30 dakika ultrasantrifüj ile çöktürülmüş, elde edilen süpernatandan nanopartiküllere enkapsüle olmayan siRNA'nın tayini gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini için 5-100 ng'a kadar yüksek duyarlılıkta ölçüm yapılabilen, florometrik yönteme dayalı iQuantTM RNA HS Assay Kit (ABP Biosciences, ABD) kullanılmış, üreticinin yönergelerine göre siRNA'nın floresan boyama işlemi gerçekleştirilmiştir (125, 174). Floresan işaretlemeden sonra örnekler Qubit™ 4 florometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında okunmuştur. Ayrıca, enkapsülasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için gen moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntem olan Agaroz Jel Elektroforez yöntemi de uygulanmıştır (175). Bu amaçla siRNA yüklü nanopartiküllerin ultrasantrifüj ile çöktürülmesi sonrası elde edilen süpernatan %1 (a/h)'lik agaroz jel içerisine tatbik edilerek elektrik akımı altında siRNA'nın elektroforetik mobilitesi ölçülmüştür. Nanopartiküllere yüklenmeyen siRNA'nın jelde bant oluşumu ile gözlenmesi beklenmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarının siRNA enkapülasyon etkinliği Eşitlik 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{siRNA Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = (K1-K2)\ /K1 \times 100 \qquad (3.2.)$$

K1: Formülasyona eklenen siRNA miktarı (µg)
K2: Nanopartiküllere yüklenmeden kalan, süpernatandaki siRNA miktarı (µg)

3.6.6. Nanopartiküllerden *in vitro* siRNA Salım Çalışmaları

Nanopartiküllerin *in vitro* ortamda salım profilinin belirlenmesinde pratik ve düşük maliyetli ve basit bir yöntem olan tüp yöntemi kullanılmıştır (103, 125, 174). Liyofilize nanopartiküllerin 2'şer mg'ı, 1 mL pH 7,4 PBS içinde dağıtılmış ve 37˚C sıcaklığa ayarlanmış yatay çalkalayıcı su banyosunda (Memmert, Almanya) inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında 100 µL örnek alınarak (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 saat) yerine 100 µL taze tampon eklenmiş ve santrifüj ile nanopartiküllerin çöktürülmesinin ardından (13.500 rpm ve 4 ℃ 'de, 20 dakika) süpernatandaki salınan siRNA'nın tayini Qubit™ 4 florometre ile Bölüm 3.6.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6.7. *In vitro* Serum ve RNAaz Stabilite Testleri

Nanopartiküllerin siRNA'yı ribonükleaz (RNAaz) enziminden koruyucu etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, hazırlanan formülasyonların serum içerisinde ve RNAaz muamelesi karşısında stabiliteleri incelenmiştir. Bunun için yaklaşık 1 mg nanopartikül (yaklaşık 665 ng siRNA içeren) ve eşdeğer miktarda taşıyıcısız siRNA 10 µL, pH 5.0 asetat tamponunda dağıtılmış ve üzerine 1 µL RNAaz (5 $ng.mL^{-1}$) çözeltisi eklenmiş ve vorteks ile karıştırıldıktan sonra 37˚C sıcaklığa ayarlanmış yatay çalkalayıcı su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Her bir örnekleme zaman noktası için ayrı deney örnekleri hazırlanmıştır. Belirli zaman noktalarında (0, 1, 4, 6, 8, 24 saat) alınan 10 µL'lik örnekler üzerine 2 µL, 120 mM EDTA çözeltisi eklenip reaksiyon durdurulmuştur (174). Serum stabilitesinin değerlendirilmesi için 5 mg nanopartikül 1 mL, %10 fetal sığır serumu (FBS) içinde dağıtılmış ve 37˚C sıcaklığa ayarlanmış yatay çalkalayıcı su banyosunda inkübasyona bırakılmış, belirli zaman noktalarında (10, 20, 30, 60 dak., 4, 24 saat) 100 µL'lik örnekler toplanmıştır (104). Her iki deneyde toplanan örneklerden santrifüj ile çöktürülen nanopartiküllere siRNA ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Bunun için nanopartiküller 400 µL kloroform içinde çözülmüş ve üzerine 500 µL siRNA tamponu eklenip 90 dakika karışması sağlanmıştır. Santrifüj ile sulu ve organik faz ayrımı sağlanmış ve sulu faz (süpernatan) toplanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilip kalıntı kloroform uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen örnekler jele yüklenerek elektroforez uygulanmıştır.

3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Akciğer kanseri modeli olarak kullanılmak üzere mutant KRAS taşıyan A549 insan adenokarsinom hücre hattı ve seçiciliğin değerlendirilebilmesi amacıyla kontrol grubu olarak da mutant olmayan (wild type) KRAS taşıyan sağlıklı akciğer epitelyal hücre hattı BEAS-2B donmuş olarak temin edilmiştir (ATCC, ABD). Donmuş hücreler 37˚C'de su banyosunda çözdürüldükten sonra laminar kabin altında pipetle çekilerek 9 mL besiyeri içeren santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 1200 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatan atılmış ve üzerine serum içeren besiyeri eklenerek kültür kapları içine alınmıştır. 10 mL besiyeri içinde 24 saat inkübasyon ardından besiyeri atılarak taze ortam ilave edilmiştir. Hücreler tripan mavisi ile boyanarak canlılıkları mikroskop altında gözlemlenmiştir. Her iki hücre hattının da çoğaltılmasında antibiyotiklerle desteklenen (100 $U.mL^{-1}$ penisilin, 100 $U.mL^{-1}$ streptomisin), %10 oranında FBS içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri kullanılmış, 37°C'de, %5 CO_2 içeren nemli atmosferli ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler üç günde bir (%75-80 doluluğa ulaştığı süre) pasajlanmıştır. Bunun için, inkübatörden çıkarılan hücreler öncelikle mikroskop altında incelenmiştir, takiben kabin altına getirilerek eski besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler 2-3 mL %0,25 Tripsin-EDTA ile muamele edilip inkübatörde 10 dakika bekletilerek yüzeyden kalkmaları sağlanmıştır. Yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine serumlu besiyeri ilave edilerek santrifüj tüpüne alınmış ve santrifüj edilmiştir (1200 devir/dakika, 5 dakika), süpernatan atılıp taze besiyerinde yeniden süspande edilen hücreler yeni kültür kaplarına eşit olarak dağıtılmış ve yeniden faz kontrast mikroskopta incelendikten sonra daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere inkübatöre kaldırılmıştır.

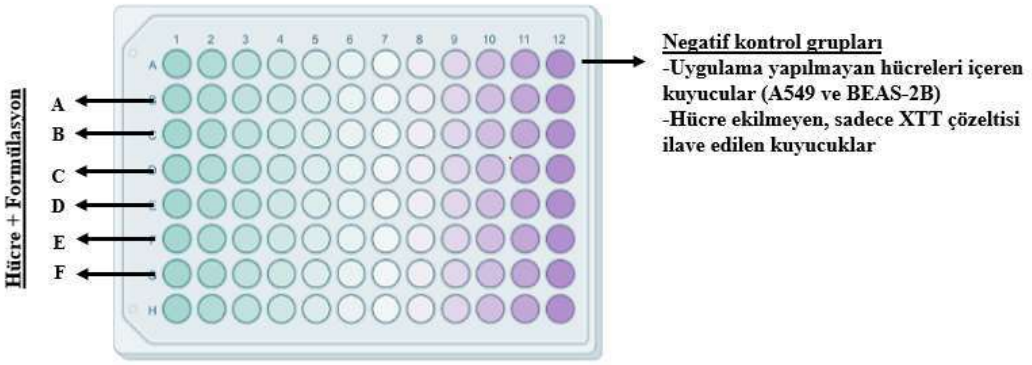
3.8. *In vitro* Sitotoksisite Çalışmaları

Nanopartikül formülasyonlarının insan akciğer adenokarsinom hücre hatlarının (A549) proliferasyonu üzerindeki etkilerinin saptanabilmesi için kolorimetrik bir yöntem olan XTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür]) yöntemi kullanılmıştır (176). Canlı hücreler tarafından sarı renkli tetrazolyum, mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. Oluşan formazan kristalleri ek bir çözünme işlemine gerek duyulmadan, ortamda oluşan renk, spektrofotometrik olarak absorbans

ölçümü ile belirlenmektedir. Dolayısıyla bu yöntem, herhangi bir terapotik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Çalışmamızda, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna yaklaşık 4×10^4 - 6×10^4 hücre %10 FBS içeren DMEM ortamı içinde ekilmiştir. %75-80 doluluğa ulaşan hücreler farklı derişimlerde seyreltilmiş, siRNA içeren ve içermeyen, optimum formülasyon değişkenleri ile hazırlanmış nanopartikül formülasyonları ve pozitif kontrol olarak taşıyıcısız siRNA ile muamele edilip 72 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Kuyucuk başına 5 $mg.mL^{-1}$ XTT çözeltisinden 10 µL eklenip 4 saat inkübasyonun ardından absorbanslar 590 nm'de plaka okuyucuda (Molecular Devices, ABD) okunmuş ve kontrol grubunun absorbansıyla karşılaştırılarak % hücre canlılığı Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır. XTT deneyi üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Deneyin planı Şekil 3.2'de şematize edilmiştir.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = A_{(\text{örnek})} - A_{(\text{pozitif kontrol})} \,/\, A_{(\text{negatif kontrol})} - A_{(\text{pozitif kontrol})} \times 100 \qquad (3.3.)$$

A: 590 nm'deki absorbans değeri.



Şekil 3.2. XTT deneyinin şematik gösterimi. A: siRNA çözeltisi, B: PLGA NP ve siRNA-PLGA NP, C: DOTAP PLGA NP ve siRNA-DOTAP PLGA NP, D: PEI-PLGA NP ve siRNA-PEI-PLGA NP, E: HA-DOTAP-PLGA NP ve HA-siRNA-DOTAP PLGA NP, F: HA-PEI-PLGA NP ve HA-siRNA-PEI-PLGA NP.

3.9. Transfeksiyon Çalışmaları

siRNA yüklü nanopartiküllerin *in vitro* transfeksiyon etkinliklerinin değerlendirilmesinden önce, siRNA'nın hücreye giriş ve etkinliğinin

değerlendirilmesi amacıyla transfeksiyon etkinliğinin ilk olarak, çıplak siRNA ile transfeksiyon ajanı kullanılarak belirlenmesi için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara yaklaşık $3x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkünbasyon sonrasında transfeksiyon işlemlerine başlanmıştır. DharmaFECT (Dharmacon, ABD) transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. Çalışma üretici firmanın yönergesi doğrultusunda takip edilmiştir. Transfeksiyon işlemini takiben, transfeksiyon etkinliğinin test edilmesi için RT-PCR kullanılmıştır. Hücrelerden total RNA; RNA ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda izole edilmiştir. Tek zincirli cDNA 1 µg total RNA'dan ters transkriptaz kullanılarak sentezlenmiştir. Bu işlem Superscript II üreticisinin yönergeleri doğrultusunda 100 U Superscript II, 0.25 µg random primer, 0.5 mM dNTPs, 5 mM DTT, 32 U RNAaz inhibitörü varlığında 60 dakika 42°C'de son hacim 20 µl olacak şekilde RT tamponu içinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerde kontaminasyon olmadığı Superscript II kullanılmadan hazırlanmış negatif kontrol örnekler ile doğrulanmıştır. RT-PCR analizi 96 kuyucuklu plaklar ve SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak Via 7 (Applied Biosystems) sekans deteksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonu (25 µl) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda 1:5 oranında seyreltilmiş; 5 µl örnek varlığında üçlü kontrol sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Her deneyde araştırılan genin değeri, iç kontrol genin (housekeeping gene; GAPDH) değerine oranlanarak normalize edilmiştir.

3.10. Hücrelerde Apoptoz ve Nekrozun Değerlendirilmesi

Hücre ölümleri morfolojik ve biyolojik olarak değerlendirildiğinde apoptotik ve nekrotik olarak ayrılmaktadır. Apoptoz programlı hücre ölümü, nekroz ise hasar yolu ile ölümü ifade etmektedir. Nekroz rastlantısal olarak ortaya çıkan, patolojik ve programsız hücre ölümüdür, çoğunlukla fiziksel hücre hasarı, enfeksiyon, toksinler, UV ışığı gibi zararlı faktörlerden dolayı oluşur. Apoptoz ise fizyolojik ve patolojik sebeplerden olmaktadır (177). siRNA taşıyıcı nanopartiküllerle muamele sonrasında hücrelerin hangi sürece girdiğini belirlemek ve siRNA taşıyıcı nanopartiküllerle kontrol gruplarının hücreler üzerindeki öldürücü etkilerini ve bu etkilerin mekanizmalarını karşılaştırmak amacıyla Apoptosis/ Necrosis Detection Kit (ABP Biosciences, ABD) kullanılmıştır. 6 kuyucuklu plakalara yaklaşık $3x10^5$

hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen hücrelere formülasyonların uygulanması ve 72 saat inkübasyonu sonrasında ürün yönergesine uygun şekilde boyama yapılmış ve floresan mikroskopta hücre ölümü morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu nanopartiküller (siRNA içermeyen nanopartiküller), kontrol siRNA (taşıyıcısız siRNA) ve siRNA taşıyıcı nanopartikül formülasyonlarının hücreler üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

3.11. Gen Susturma Etkinliğinin Değerlendirilmesi

3.11.1. PCR Analizi

Formülasyonların hedef KRAS genini susturma etkinliğinin değerlendirilmesinde revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu PCR (RT-PCR) kullanılmıştır. Bu teknikle, hücrelerden izole edilen, susturulması hedeflenmiş mRNA'nın ekspresyon derecesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara yaklaşık $3x10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübasyon sonrasında transfeksiyon işlemlerine başlanmıştır. Bu amaçla, KRAS siRNA içeren formülasyonlar ile hücreler 72 saat muamele edilmiştir. Transfeksiyon işlemini takiben, hücrelerden total RNA; RNA ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda izole edilmiştir. Tek zincirli cDNA 1 µg total RNA'dan ters transkriptaz kullanılarak sentezlenmiştir. Bu işlem Superscript II üreticisinin yönergeleri doğrultusunda 100 U Superscript II, 0.25 µg random primer, 0.5 mM dNTPs, 5 mM DTT, 32 U RNAaz inhibitörü varlığında 60 dakika 42°C'de son hacim 20 µl olacak şekilde RT tamponu içinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerde kontaminasyon olmadığı Superscript II kullanılmadan hazırlanmış negatif kontrol örnekler ile doğrulanmıştır. Gerçek zamanlı PCR analizi 96 kuyucuklu plaklar ve SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak Via 7 (Applied Biosystems) sekans deteksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonu (25 µl) üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda 1:5 oranında seyreltilmiş; 5 µl örnek varlığında üçlü kontrol sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Her deneyde araştırılan genin değeri, iç kontrol genin (housekeeping gene; GAPDH) değerine oranlanarak normalize edilmiştir. Kullanılan primer çiftlerinin tamamı Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5. RT-PCR deneylerinde kullanılacak olan primer dizileri.

Primer	5' Sekans 3'	Uzunluk	Tm
KRAS	F: AGCTGTATCGTCAAGGCACT	20	59,10
	R: AGGTACTGGTGGAGTATTTGATAGT	25	58,80
GAPDH	F: ATGGGCAGCCGTTAGGAAA		61,6
	R: GCATCGCCCCACTTGATTTT		60,9

F: İleri primerin sekansı, R: Revers primerin sekansı.

3.11.2. ELISA Deneyi

Hücrelerin hazırlanan formülasyonların uygulanması sonrasında KRAS protein ekspresyon düzeylerinin tayini için sandviç-ELISA yöntemi kullanılmıştır. 6 kuyucuklu plakalarda, her kuyucukta 3 x 10^5 hücre olacak şekilde çoğaltılan hücreler KRAS siRNA yüklü nanopartikül formülasyonları ile transfekte edilmek üzere formülasyonlar eklenerek 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon işlemi tamamlandıktan sonra hücreler proteaz inhibitör karışımı içeren radyoimmünopresipitasyon tayin tamponu (RIPA) ile lizis işlemine tabi tutulmuştur. Hücre lizatları 12.000 rpm'de 20 dakika sanrifüj uygulanarak çöktürülmüş, süpernatanlar (protein içeriği) toplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan örnekler Human KRAS ELISA kit (Bioassay Technology, China) kullanılarak ürün yönergesine uygun olarak analiz gerçekleştirilmiştir. Absorbanslar mikroplaka okuyucuda (Versamax, Molecular Devices, ABD) okunmuştur.

3.11.3. Western-Blot Analizi

siRNA yüklü nanopartiküllerin KRAS genini susturma etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılan bir diğer yöntem Western-Blot'tur (145). 6 kuyucuklu plakalarda, her kuyucukta 3 x 10^5 hücre olacak şekilde çoğaltılan hücreler KRAS siRNA yüklü nanopartikül formülasyonları ile transfekte edilmek üzere formülasyonlar eklenerek 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transfeksiyon işlemi tamamlandıktan sonra hücreler proteaz inhibitör karışımı içeren radyoimmünopresipitasyon tayin tamponu (RIPA) ile lizis işlemine tabi tutulmuştur. Hücre lizatları 12.000 rpm'de 20 dakika sanrifüj uygulanarak çöktürülmüş,

süpernatanlar (protein içeriği) toplanmıştır. Daha sonra WesternBreeze® Chemiluminescent Western-Blot kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak sırasıyla aşağıdaki işlem basamakları gerçekleştirilmiştir;

1-Örnekler polikarilamid jel içinde elektroforeze tabi tutularak proteinler ayrıştırılmıştır,

2- Jel üzerinde birbirinden ayrılan proteinler iBlot 2 Dry Blotting (Invitrogen, ABD) sistemi kullanılarak nitroselüloz membran üzerine transfer edilmiştir,

3-Protein transferi tamamlandıktan sonra membran sırayla bir saat boyunca primer antikor ve 30 dakika boyunca sekonder antikor ile inkübasyona bırakılmıştır (her iki uygulamanın da sonrasında yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmış, yıkama işlemleri üç kere tekrarlanmıştır),

4-Kemiluminesan özellikli substrat madde eklenerek reaksiyonun gerçekleşmesi için 5 dakika beklenmiştir,

5- ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, ABD) jel görüntüleme cihazında görüntüleme yapılmıştır.

KRAS protein ekspresyon düzeyi kontrol protein (housekeeping) olarak kullanılan β-aktin düzeyi ile karşılaştırılmıştır.

3.12. Metabolomik Analizler

Tez kapsamında metabolomik analizler, iki farklı analitik platform (GC-MS ve LC-qTOF-MS) kullanılarak, mutant KRAS (A549) ve mutant olmayan KRAS (BEAS-2B) taşıyan hücre hatlarını tedaviden sonra, mutant KRAS taşıyan hücre hatlarının normal metabolomik profile dönüp dönmediğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Metabolomik analizler numune hazırlama, metabolitlerin analizi ve elde edilen verilerin analizleri olmak üzere başlıca üç aşamadan oluşmaktadır.

3.12.1. Numunelerin Hazırlanması

6 kuyucuklu plakalara ekilen ve %100 doluluğa ulaşmış A549 ve BEAS-2B hücre hatları, formülasyonların uygulanmasından 72 saat sonra inkübatörden çıkarılmış ve bekletilmeden 5 mL izotonik sodyum klorür çözeltisi ile hızlı bir şekilde yıkanmıştır. Hücreler üzerine 1 mL metanol:su (9:1, h/h) çözeltisinden eklenmiş ve hafif bir şekilde çalkalandıktan sonra sıvı azot içine konarak hücrelerin dondurulması

sağlanmıştır. Sıvı azot içinde bekletilen hücreler, hücre kazıyıcı yardımıyla kazınarak 2 mL'lik tüplere alınmıştır. Hücrelerin kazındığı kuyucuklara 1 mL daha metanol:su (9:1, h/h) çözeltisi eklenerek işlemler tekrarlanmıştır. 4°C'de 15.000 rpm'de hücreler çöktürüldükten sonra süpernatant 15 mL'lik ependorf tüpe transfer edilmiş ve üzerine 2 mL kloroform ve 6 mL metanol eklenerek 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. Kloroform ve su fazının ayrılması için örnekler santrifüjlenmiş ve metabolitlerin bulunduğu su fazı -80°C'ye kaldırılarak analiz edilinceye kadar saklanmıştır.

3.12.2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Analizi

-80°C'de saklanmış olan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra vakumlu santrifüjde uçurularak kurutulmuştur. Kurumuş örnekler üzerlerine 20 µL metoksiamin hidroklorür çözeltisi (piridin içinde, 20mg.mL^{-1}) eklenerek etüvde 30°C'de 90 dakika tutulmuş ve metoksillendirilmiştir. Takiben oda sıcaklığında numuneler üzerine 80 µL N- metil-N-trimetilsilil trifloroasetamit+trimetilklorosilan (MSTFA + %1 TMCS) eklenmiş ve etüvde 37°C'de 30 dakika bekletilerek türevlendirilmiştir (178). Türevlendirilen numuneler silillenmiş GC-MS viallerine aktarılmış ve sonrasında DB5-MS (%5 difenil/ %95 dimetilpolisiloksan) kolon kullanılarak GC-MS (GC-MS QP-2010 Ultra, Shimadzu, Japonya) sistemi ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz koşulları Tablo 3.6'da özetlenmektedir. Elde edilen kompleks kromatogramlar ayrıştırıldıktan sonra piklerin alıkonma zamanları *MS-DIAL* yazılımı kullanılarak düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Metabolitlere ait pikler alıkonma indeksli Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri kullanılarak tespit edilmiştir (179, 180).

Tablo 3.6. GC-MS analiz koşulları ve cihaz değişkenleri.

Kolon	DB5-MS kolon (30 m+10 m ön kolon; 0.25 mm iç çap ve 0.25 µm film kalınlığı)
Fırın sıcaklık programı	Fırın sıcaklığı artışı 60°C'den (1 dak tutulur) 325°C'ye 10°C /dak artışla (10 dak tutulur)
Enjeksiyon hacmi	1 µL
Taşıyıcı gaz akış hızı	Helyum, 1 mL.dak^{-1}
MS transfer hattı geçiş sıcaklığı	290ºC
Çözücü gecikme süresi	5.90 dakika
Kütle aralığı	50-650 Dalton

GC-MS temelli metabolomik analizler sonucunda elde edilen veri matrisleri *Excel* (Microsoft, ABD) çalışma dosyasına aktarılmış ve toplam pik alan normalizasyon teknikleri kullanılarak normalize edilmiştir. Verilerdeki eksik değerler, metabolit grubu içindeki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur. Takiben bu veri matrisi *SIMCA-P+* (Umetrics AB, İsveç) programına aktarılarak; temel bileşen analizi (PCA) ve kısmi en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri ile incelenmiş, grupların ayırılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları tespit edilmiştir.

3.12.3. Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-qTOF-MS) Analizi

-80°C'de saklanmış olan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra vakumlu santrifüjde uçurularak kurutulmuştur. Örnekler su:asetonitril (50:50, h/h) karışımı ile tekrar çözündürülmüştür. Metabolitlerin analizleri C18 (100 x 2,1 mm, 2,7 μm) ve HILIC (150 x 2,1 mm, 5 μm) kolonlar kullanılarak ve hareketli faz olarak %0,1 (h/h) formik asit içeren su (Hareketli faz A) ve %0,1 (h/h) formik asit içeren asetonitril (Hareketli faz B) kullanılarak, Tablo 3.7'de verilen koşullarda gradient elüsyon ile gerçekleştirilmiştir. Analizler negatif ve pozitif iyonizasyon modunda qTOF-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. (Tablo 3.8). Elde edilen karmaşık kromatogramlar *MSDIAL* (RIKEN, Japonya) yazılımı kullanarak ayrıştırılmış ve piklerin alıkonma zamanları düzeltilerek veri matrisleri oluşturulmuştur. Oluşan veri matrisindeki piklerin tanımlanması için havuz edilerek oluşturulan kalite kontrol numunelerine farklı enerji (10, 20 ve 40 eV) düzeyleri uygulanarak MS/MS spektrumları elde edilmiştir. Spektrumlar *METLIN* veri bankası taranarak tanımlanmıştır.

Tablo 3.7. LC-qTOF-MS temelli metabolomik analiz için gradient elüsyon programı.

C18		HILIC	
Zaman (dak)	**% Hareketli faz B***	**Zaman (dak)**	**% Hareketli faz B***
0	10	0	80
1	20	1	80
14	80	14	20
15	90	15	20
15.1	10	15.1	80
20	10	20	90

*%0,1 formik asit içeren asetonitril

Tablo 3.8. LC-qTOF-MS cihaz değişkenleri.

	Pozitif iyonizasyon	**Negatif iyonizasyon**
Kütle aralığı	50-1700 amu	50-1700 amu
Tarama hızı (spektrum/sn)	2	2
Püskürtme voltajı (kV)	3500	3500
Skimmer voltajı (V)	65	65
Gaz sıcaklığı (°C)	325	325
Gaz akışı (L/dak)	10	10
Nebulizer (psig)	45	45

3.12.4. Veri Analizi

GC-MS ve LC-qTOF-MS'den elde edilen veri matrisleri ayrı ayrı *Excel* dosyasına aktarılarak kullanılan iç standartlara göre normalize edilmiştir. Verilerdeki eksik değerler metabolit grubu içindeki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur. Her iki analitik cihazdan elde edilen ve tanımlanan metabolitlerin pik alanları *Excel* dosyasına aktarılarak her iki veri seti birleştirilmiş, daha sonra bu veri matrisi *SIMCA-P+* programına aktarılarak PCA ve PLS-DA yöntemleri ile grupların ayırılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur. Bu verilerden yararlanarak mutant KRAS taşıyan A549 hücrelerinin tedavi sonucunda

metabolomik profilinin mutant olmayan KRAS taşıyan BEAS-2B hücrelerinin profiline ne kadar yaklaştığı değerlendirilmiştir.

3.13. İstatistiksel Analiz

Formülasyonların *in vitro* karakterizasyonunda: partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel sonuçlarının karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak rapor edilmiştir. Deney grupları Student's t-test veya one-way ANOVA testleri ile karşılaştırılarak $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Hesaplamalar için *Graphpad prism® ver.5* yazılımı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. siRNA Yüklü Olmayan Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayini

siRNA yüklü olmayan nanopartiküller çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmıştır (Bkz. Bölüm 3.3). Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri açısından incelenmesi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.1-4.9'da gösterilmektedir. Şekil 4.1-4.3'te yüklü olmayan PLGA nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü dağılımlarından örnekler verilmektedir.

Tablo 4.1. PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da) ile hazırlanan %2 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

Formülasyon bileşenleri		**Partikül büyüklüğü (nm)**		**PDI**		**Zeta potansiyel (mV)**	
PLGA (% a/h)	**PVA (% a/h)**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**
2	1	194,67	0,15	0,08	0,02	-6,50	0,68
2	1,5	201,40	2,20	0,09	0,02	-4,55	0,06
2	2	202,50	0,51	0,07	0,04	-3,75	0,10

Tablo 4.2. PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da) ile hazırlanan %3 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

Formülasyon bileşenleri		**Partikül büyüklüğü (nm)**		**PDI**		**Zeta potansiyel (mV)**	
PLGA (% a/h)	**PVA (% a/h)**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**
3	1	243,93	3,35	0,06	0,01	-5,62	0,31
3	1,5	208,53	1,06	0,05	0,03	-2,95	0,23
3	2	214,20	2,51	0,06	0,03	-1,96	0,10

Tablo 4.3. PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da) ile hazırlanan %4 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

Formülasyon bileşenleri		**Partikül büyüklüğü (nm)**		**PDI**		**Zeta potansiyel (mV)**	
PLGA (% a/h)	**PVA (% a/h)**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**
4	1	224,83	2,11	0,06	0,01	-3,60	0,25
4	1,5	228,77	0,91	0,03	0,03	-3,34	0,23
4	2	252,50	1,14	0,07	0,02	-1,66	0,24

Tablo 4.4. PLGA 50:50 (MA: 38.000-54.000 Da) ile hazırlanan %2 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

Formülasyon bileşenleri		**Partikül büyüklüğü (nm)**		**PDI**		**Zeta potansiyel (mV)**	
PLGA (% a/h)	**PVA (% a/h)**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**
2	1	202,80	1,80	0,03	0,03	-4,43	0,34
2	1,5	203,33	0,93	0,07	0,11	-2,68	0,25
2	2	210,40	1,04	0,07	0,01	-2,08	0,11

Tablo 4.5. PLGA 50:50 (MA: 38.000-54.000 Da) ile hazırlanan %3 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

Formülasyon bileşenleri		**Partikül büyüklüğü (nm)**		**PDI**		**Zeta potansiyel (mV)**	
PLGA (% a/h)	**PVA (% a/h)**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**	**ort.**	**SS**
3	1	280,50	0,93	0,07	0,01	-4,54	0,13
3	1,5	290,25	26,20	0,06	0,02	-3,21	0,06
3	2	295,80	55,80	0,07	0,02	-1,21	0,06

Tablo 4.6. PLGA 50:50 (MA: 38.000-54.000 Da) ile hazırlanan %4 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

Formülasyon bileşenleri		Partikül büyüklüğü (nm)		PDI		Zeta potansiyel (mV)	
PLGA (% a/h)	PVA (% a/h)	ort.	SS	ort.	SS	ort.	SS
4	1	278,00	31,60	0,06	0,02	-2,54	0,20
4	1,5	308,20	62,60	0,05	0,02	-3,31	0,08
4	2	360,88	77,10	0,04	0,01	-1,23	0,20

Tablo 4.7. PLGA 75:25 (MA: 4000-15.000 Da) ile hazırlanan %2 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

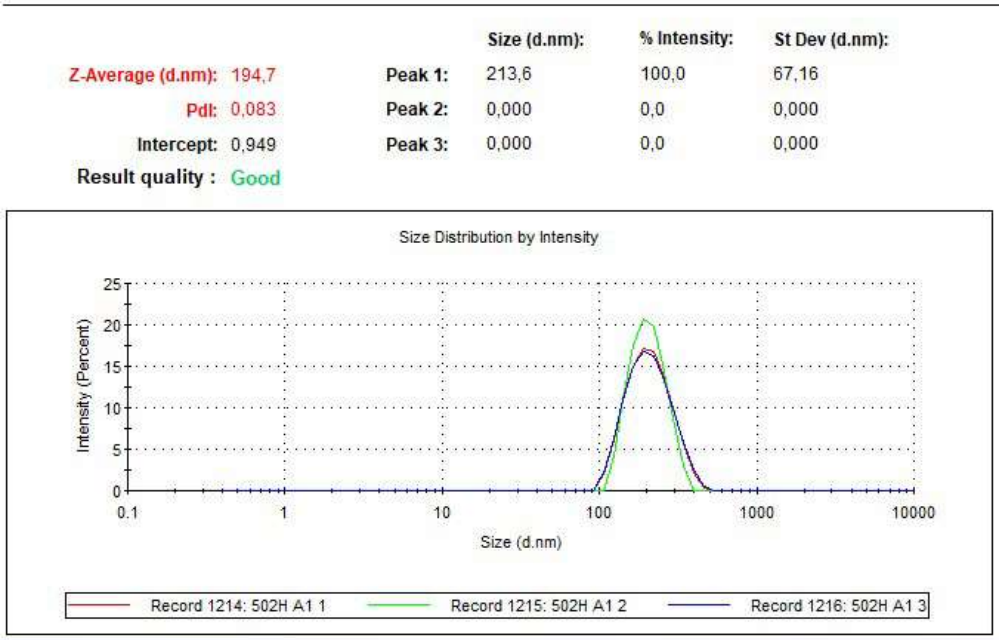
Formülasyon bileşenleri		Partikül büyüklüğü (nm)		PDI		Zeta potansiyel (mV)	
PLGA (% a/h)	PVA (% a/h)	ort.	SS	ort.	SS	ort.	SS
2	1	210,60	3,00	0,09	0,03	-2,77	0,55
2	1,5	203,07	0,32	0,07	0,01	-2,11	0,15
2	2	244,56	6,20	0,08	0,01	-1,53	0,27

Tablo 4.8. PLGA 75:25 (MA: 4000-15.000 Da) ile hazırlanan %3 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

Formülasyon bileşenleri		Partikül büyüklüğü (nm)		PDI		Zeta potansiyel (mV)	
PLGA (% a/h)	PVA (% a/h)	ort.	SS	ort.	SS	ort.	SS
3	1	219,70	2,17	0,05	0,03	-1,91	0,25
3	1,5	241,90	0,95	0,05	0,03	-0,97	0,15
3	2	251,03	3,85	0,07	0,01	-0,81	0,20

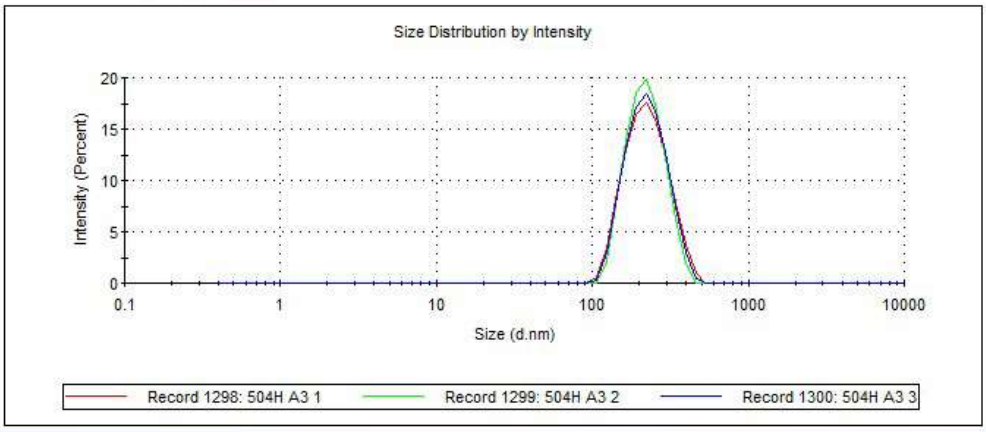
Tablo 4.9. PLGA 75:25 (MA: 4000-15.000 Da) ile hazırlanan %4 (a/h) PLGA içeren siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

Formülasyon bileşenleri		Partikül büyüklüğü (nm)		PDI		Zeta potansiyel (mV)	
PLGA (% a/h)	PVA (% a/h)	ort.	SS	ort.	SS	ort.	SS
4	1	249,10	2,51	0,05	0,03	-5,26	0,30
4	1,5	251,60	0,85	0,08	0,02	-3,88	0,31
4	2	264,60	0,80	0,09	0,02	-4,03	0,08



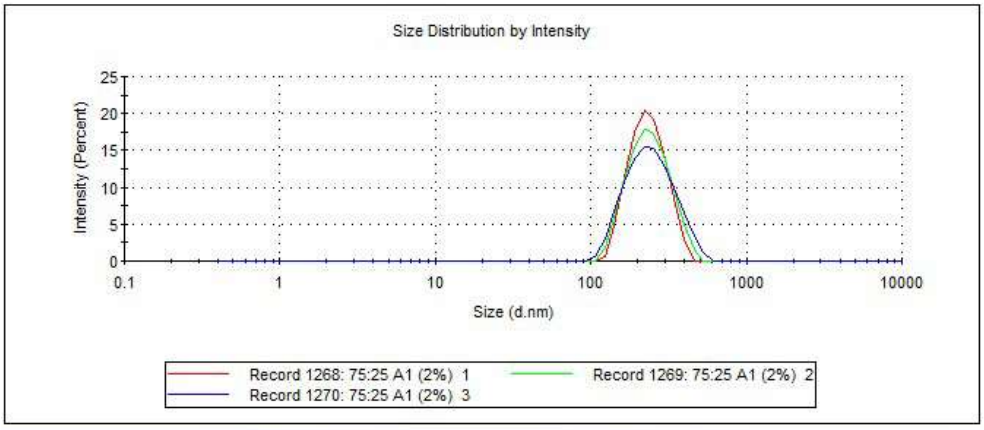
Şekil 4.1. siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü dağılımı (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h), PLGA 50:50 MA:7.000-17.000 Da).

		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 211,0	Peak 1:	231,0	100,0	71,37
PdI: 0,081	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,952	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



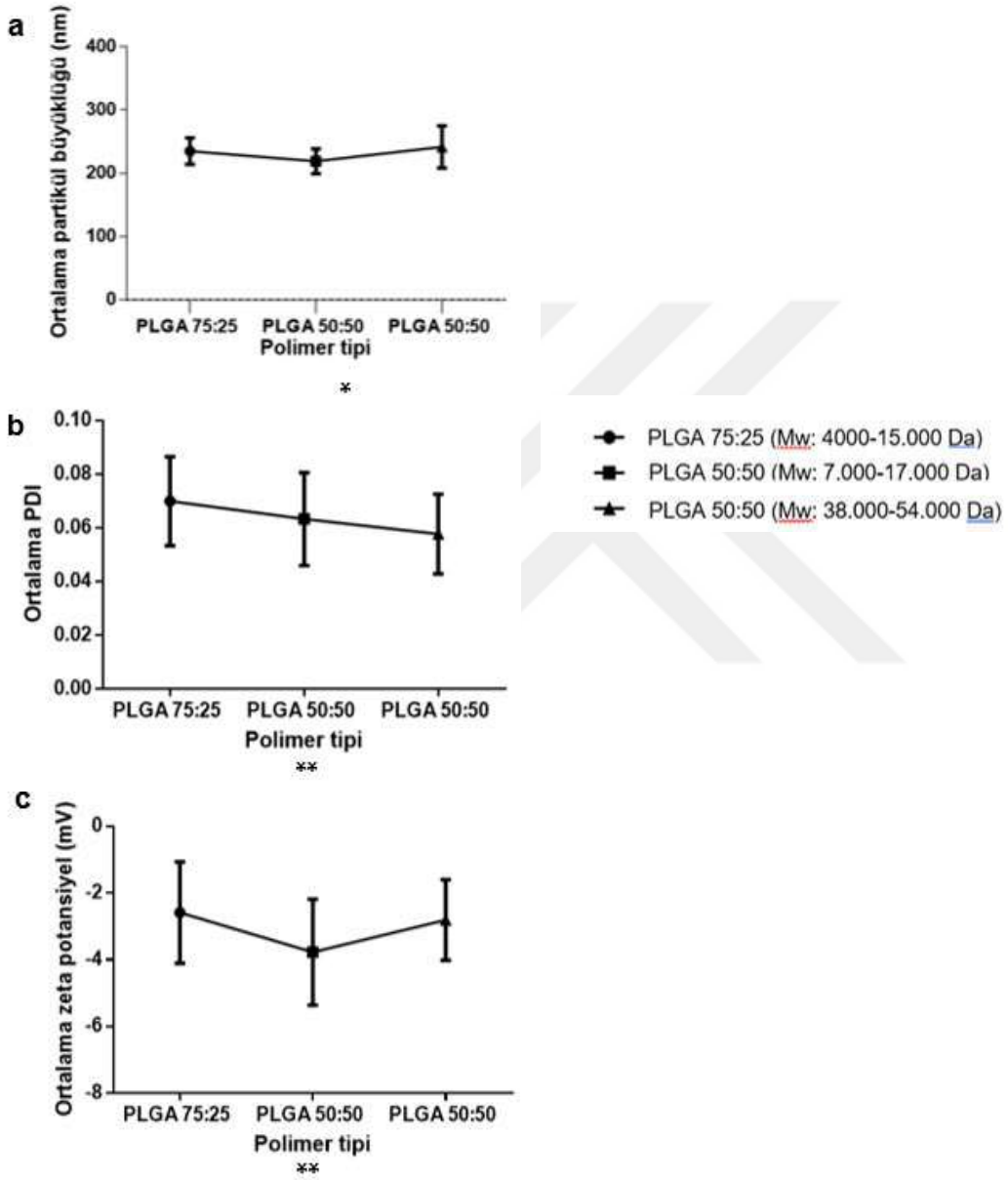
Şekil 4.2. siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü dağılımı (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %2 (a/h), PLGA 50:50 MA:38.000-54.000 Da).

		Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 222,5	Peak 1:	237,9	100,0	61,98
PdI: 0,063	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,953	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality : Good				



Şekil 4.3. siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü dağılımı (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h), PLGA 75:75 MA:4.000-15.000 Da).

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında farklı polimer ve PVA konsantrasyonları ile hazırlanan nanopartiküllerin (bkz. Tablo 4.1-4.9) kullanılan polimer tipine bağlı olarak partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerlerindeki değişim Şekil 4.4.'te gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Nanopartiküllerin kullanılan polimer tipine bağlı olarak (a) Ortalama partikül büyüklüğü, (b) Polidispersite indeksi (PDI) ve (c) Zeta potansiyel değişimleri (n=3, *p <0,05, **p>0,05).

Negatif zeta potansiyele sahip nanopartiküllere pozitif yüzey yükü kazandırmak amacıyla PEI ve DOTAP ile modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Katyonik özellikteki nanopartiküllerin hazırlanmasında ön formülasyon çalışmaları

sonucunda belirlenen optimum formülasyon değişkenleri (PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da), PLGA %2 (a/h), PVA %1 (a/h) kullanılmıştır. Katyonik nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.10 ve 4.11'de sunulmaktadır.

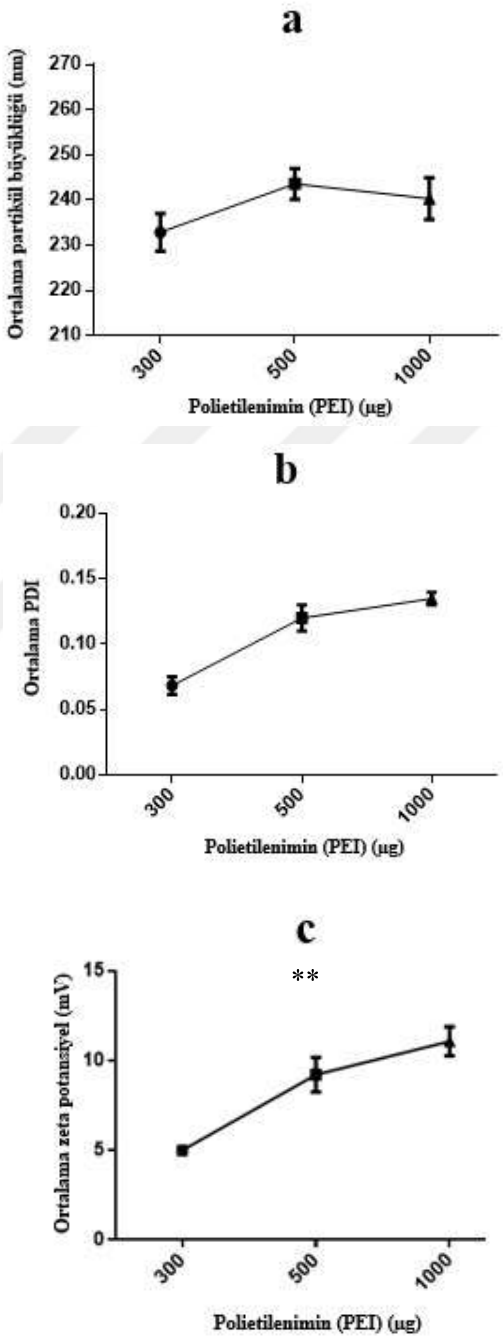
Tablo 4.10. PEI ile modifiye edilmiş nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

PLGA (% a/h)	PVA (% a/h)	PEI (µg)	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
2	1	300	232,87 ± 5,92	0,07 ± 0,01	5,0 ± 0,31
2	1	500	243,61 ± 4,84	0,12 ± 0,01	9,22 ± 1,36
2	1	1000	240,32 ± 6,55	0,13 ± 0,01	11,08 ± 1,16

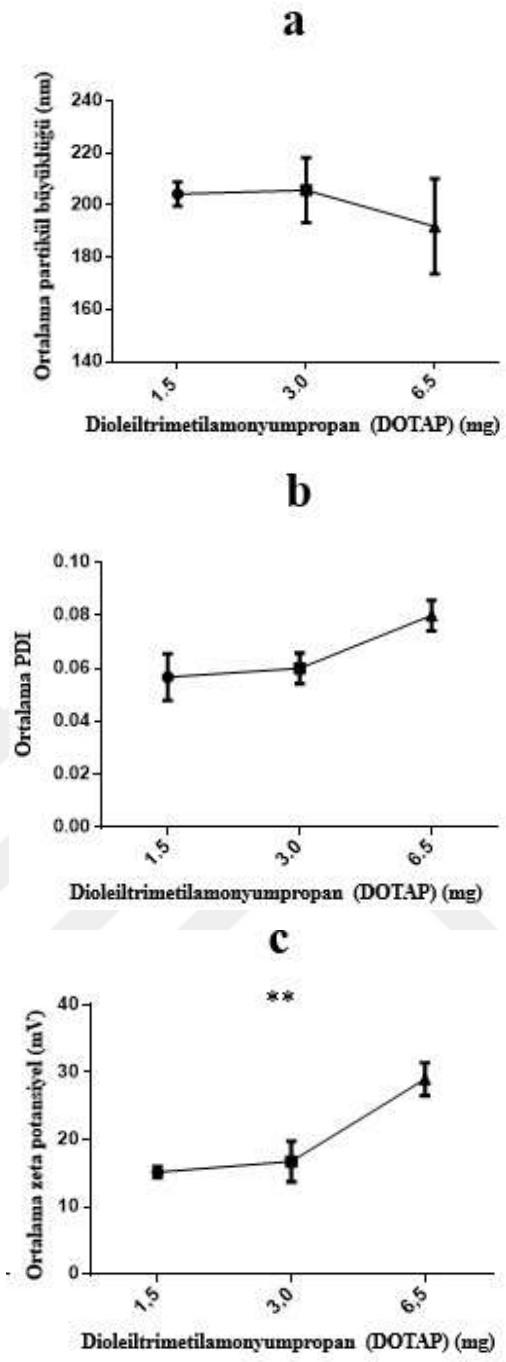
Tablo 4.11. DOTAP ile modifiye edilmiş nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama ± SS).

PLGA (% a/h)	PVA (% a/h)	DOTAP (µg)	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
2	1	1500	204,36 ± 7,92	0,06 ± 0,01	15,14 ± 1,45
2	1	3000	205,78 ± 21,63	0,06 ± 0,01	16,73 ± 1,36
2	1	6500	191,88 ± 31,61	0,08 ± 0,01	28,97 ± 4,22

PLGA 50:50 (MA: 7.000-17.000 Da) %2 (a/h) ve PVA %1 (a/h) kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin (bkz. Tablo 4.10, 4.11) artan katyonik madde (PEI veya DOTAP) konsantrasyonuna bağlı olarak partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değişimleri Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Nanopartiküllerin PEI miktarına bağlı olarak (a) Ortalama partikül büyüklüğü, (b) Polidispersite indeksi (PDI) ve (c) Zeta potansiyel değişimleri (n=3, **p <0,05).



Şekil 4.6. Nanopartiküllerin DOTAP miktarına bağlı olarak (a) Ortalama partikül büyüklüğü, (b) Polidispersite indeksi ve (c) Zeta potansiyel değişimleri (n=3, ** p <0,05).

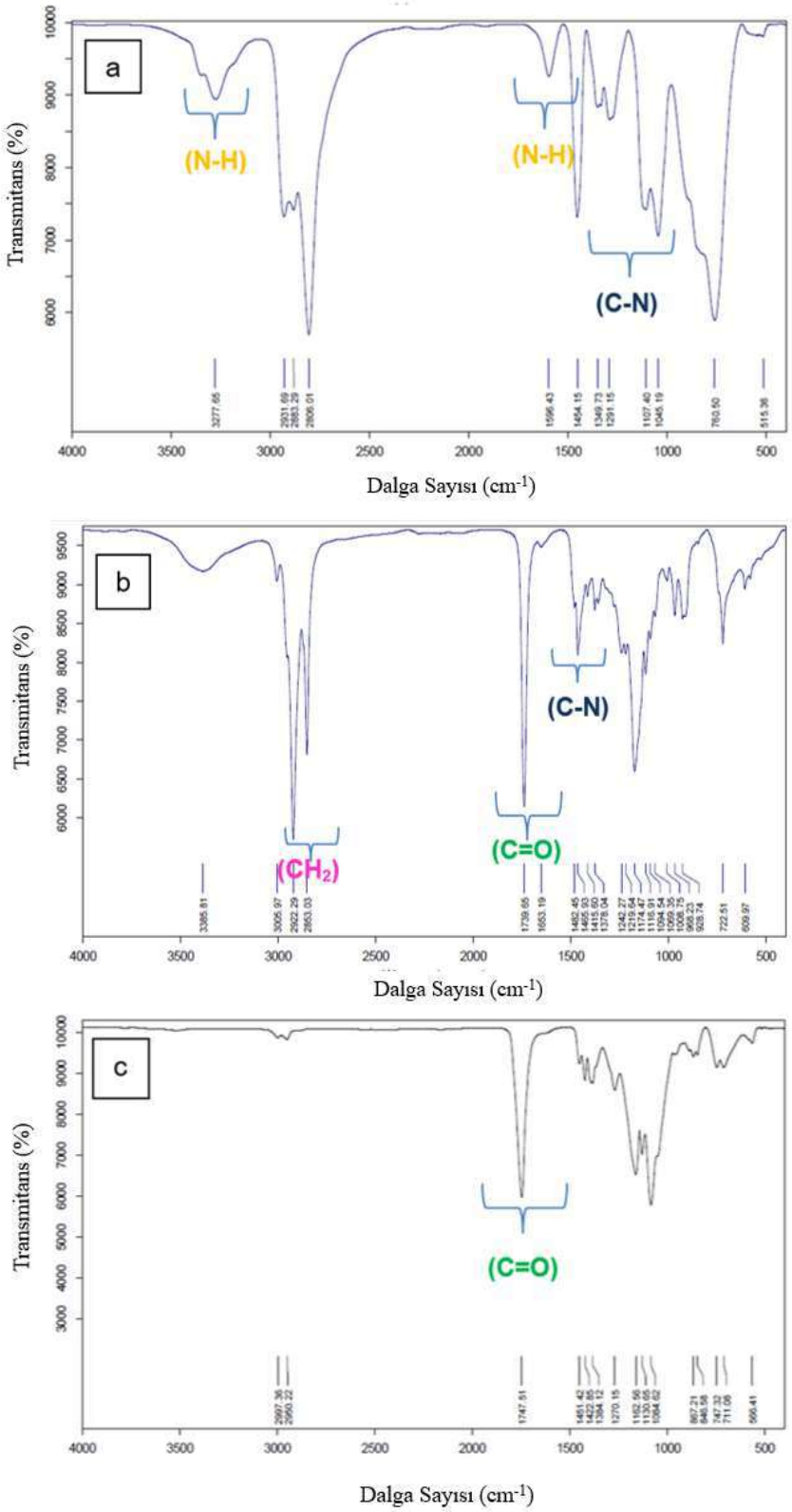
Düşük partikül büyüklüğü ve yüksek katyonik zeta potansiyel sayesinde siRNA yüklü nanopartiküllerin hücreye girişini arttırmak amacı doğrultusunda siRNA yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılacak optimum formülasyon bileşenleri belirlenmiştir. PEI ile hazırlanan nanopartikül formülasonlarına ait sonuçlar değerlendirildiğinde 1 mg PEI kullanılarak hazırlanan formülasyon ile, partikül

büyüklüğünde diğer formülasyonlara göre anlamlı bir değişiklik olmaksızın en yüksek zeta potansiyel değeri elde edilmiştir (11,08 ± 1,16 mV). DOTAP ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları değerlendirildiğinde ise farklı DOTAP miktarlarıyla hazırlanan formülasyonlar arasında partikül büyüklüğü bakımından anlamlı bir değişiklik yokken en yüksek zeta potansiyel 6,5 mg DOTAP ile elde edilmiştir (28,97 ± 4,22 mV). Ancak PEI ve DOTAP'ın nanopartiküllerde siRNA taşıma kapasitesini nasıl etkilediğinin karşılaştırılabilmesi için her iki katyonik madde ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyellerin yakın olması istenmektedir. Bu nedenle 10-15 mV aralığında pozitif zeta potansiyelin elde edildiği, PEI ve DOTAP'ın sırasıyla 1 mg ve 1,5 mg'ı ile hazırlanan formülasonlar, siRNA yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında ve PEI ve DOTAP'ın siRNA'nın nanopartiküllere enkapsülasyonu ve hücre düzeyindeki etkinlik karşılaştırması çalışmalarında kullanılmak üzere nihai formülasyonlar olarak belirlenmiştir.

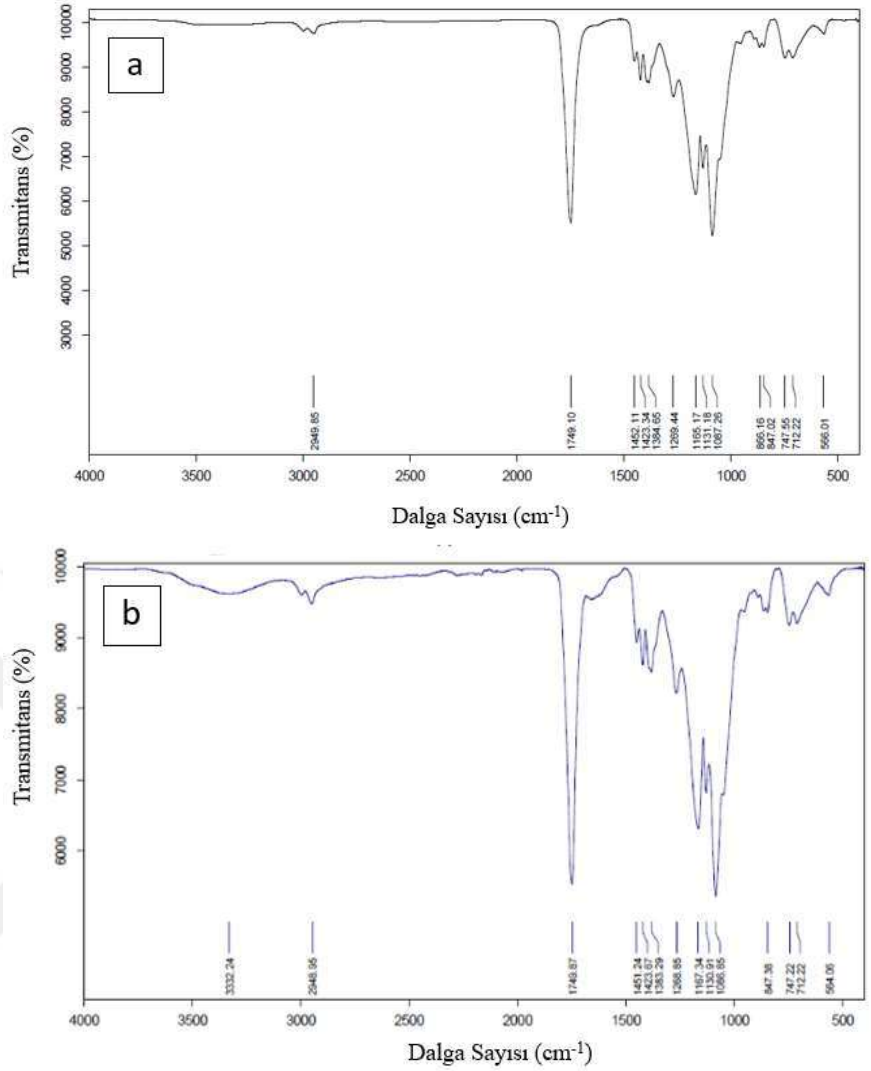
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizi

Formülasyon bileşenlerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4.7'de, siRNA yüklü olmayan nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları Şekil 4.8'de gösterilmektedir. Nanopartikül formülasyon bileşenlerine ait FT-IR spektrumları incelendiğinde PEI'ye ait spektrumda (Şekil 4.7-a) karakteristik olarak, 3270 cm^{-1} civarında N-H bağlarına ait gerilme titreşimleri, 1590 cm^{-1} civarında N-H bağlarına ait eğilme titreşimleri ve 1350-1000 cm^{-1} aralığında C-N bağlarına ait gerilme titreşimleri pikleri görülmektedir (181). DOTAP'a ait spektrumda (Şekil 4.7-b), 2922 cm^{-1} ve 2853 cm^{-1}'de metilen gruplarına ait C-H gerilme titreşimleri, 1739 cm^{-1}'de ester grubuna ait karbonil bağ gerilmesi (C=O) ve 1480 cm^{-1} civarında trimetilamonyum baş grubundan kaynaklı C-N bağ gerilmesine ait zayıf pikler karakteristik olarak görülmektedir (182, 183).

PEI ile modifikasyon sonrasında (Şekil 4.8-b), PLGA nanopartiküllerde görülen C=O karbonil bağ gerilmesinden kaynaklı pikin şiddetinde değişiklik olmadığı, 3300 cm^{-1} civarında görülen geniş ve zayıf pikin N-H bağ gerilmesinden kaynaklı olduğu değerlendirilmektedir (181). DOTAP ile modifikasyon sonrasında (Şekil 4.8-c), PLGA nanopartiküllerde, 1739 cm^{-1} de görülen C=O karbonil bağ gerilmesinden kaynaklı pikin şiddetinin bir miktar arttığı, bu artışın ise DOTAP'a ait karbonil grubundan kaynaklandığı değerlendirilmektedir (182, 183).



Şekil 4.7. (a) Polietilenimin (PEI)'e ait FT-IR spektrumu, (b) Dioleoiltrimetilamonyumpropan (DOTAP)'a ait FT-IR spektrumu, (c) PLGA'ya ait FT-IR spektrumu.



Şekil 4.8. PEI ve DOTAP ile modifiye nanopartiküllere ilişkin FT-IR spektrumlar, (a) PLGA NP, (b) PEI-PLGA NP, (c) DOTAP-PLGA NP, (Formülasyon: Polimer %2 (a/h); PVA %1 (a/h); PEI miktarı:1 mg; DOTAP miktarı: 1,5 mg; PLGA 50:50 (MA:7.000-17.000 Da)).

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Current Drug Delivery, 2021, *18*, 103-120

REVIEW ARTICLE

Recent Advances in Treatment of Lung Cancer: Nanoparticle-based Drug and siRNA Delivery Systems



Ayse Gencer[1], Ceren Duraloglu[1], Sena Ozbay[2], Turkmen T. Ciftci[3], Samiye Yabanoglu-Ciftci[2] and Betul Arica[1,*]

[1]*Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey;* [2]*Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey;* [3]*Department of Radiology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara, Turkey*

ARTICLE HISTORY

Received: December 01, 2019
Revised: January 08, 2020
Accepted: March 19, 2020

DOI:
10.2174/1567201817999200730211718

Abstract: Lung cancer is the second most diagnosed cancer in both men and women worldwide. Considering the high mortality rate of lung cancer and inadequacy of conventional treatment methods such as surgical resection, chemotherapy and radiotherapy; new treatment strategies are an emerging area of interest. Nanoparticle-based drug and small interfering RNA delivery systems such as lipid, polymeric, inorganic, micellar and dendrimer nanoparticles are designed to enhance the bioavailability, stability and retention of anti-cancer drugs in the targeted regions of the lung. These nanoparticle-based delivery systems increase the active ingredient half-life and targeting efficiency while reducing the required dose of the drug. Hence, they have many advantages such as higher therapeutic efficacy and reducedside effects and adverse events. Combinations of active ingredients, anti-cancer agents and small interfering RNA can be formulated into nanoparticle-based delivery systems that can be administered by various routes including inhalation and intravenous. In this review, the development of lipidic and polymeric nanoparticle-based drug and small interfering RNA delivery systems used in the treatment of lung cancer is discussed.

Keywords: Lung cancer, drug delivery, gene delivery, nanotechnology, siRNA, lipid and polymer-based nanocarriers.

1. INTRODUCTION

Lung cancer, which is the most common type of cancer, has the highest mortality rate among all cancer types, leading to the death of 1.8 million people in 2018 [1]. Although the majority of lung cancer incidences are due to smoking and using tobacco products, air pollution, chronic infections and environmental toxins such as radon and asbestos can cause lung carcinogenesis [2]. Lung cancer patients do not typically exhibit signs and symptoms in the early stages and, consequently, they are generally diagnosed at an advanced stage [3]. Based on the microscopic appearance of lung cancer cells, lung cancer is divided into two major types: Small Cell Lung Cancer (SCLC) and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) [4]. Depending on the type and stage at the time of diagnosis, treatment options include chemotherapy, radiotherapy and surgery [5]. While chemotherapy and radiation therapy are the first line regimens for SCLC, surgery is the first treatment option for the early stage of NSCLC and 5-year survival increases by 50-90%. Radiotherapy and chemotherapy are the main viable treatment for patients at the early stage NSCLC who are not amenable to surgical resection.

The development of molecular targeted therapeutics, using monoclonal antibodies can be attributed to a better understanding of the underlying molecular mechanisms of lung cancer. Patients with advanced NSCLC have a potentially actionable molecular target. If the patient is not eligible for molecular targeted therapy, platinum-based therapy is the first-line treatment [6]. However, current therapies have disadvantages as they affect both tumor and normal cells. When they are administered at curative doses, conventional anti-cancer agents have some secondary effects on normal tissues such as cardiotoxicity, cytotoxicity, neurotoxicity and nephrotoxicity. Furthermore, chemotherapeutics with poor water solubility have limited bioavailability [7, 8], which could be favorably improved by nanoparticle based therapeutic systems that could also solve toxicity problems. Nanoparticle formulations tend to accumulate more in tumor cells than in normal tissues through their Enhanced Permeability and Retention (EPR) [9]. Moreover, nanoparticles are characterized by a high therapeutic effi-

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, P.O. Box: 06100, Ankara, Turkey; Tel/Fax: +90 3123054370;
E-mail: byegin@yahoo.com

1875-5704/21 $65.00+.00

© 2021 Bentham Science Publishers

Current Drug Delivery

cacy, low toxicity and the ability to deliver poorly soluble drugs [10].

Recently, small interfering RNAs (siRNAs) have attracted much attention as innovative nucleic acid medicines for the treatment of cancer. siRNAs can regulate gene expression by inhibiting it *via* post-transcriptional mechanisms that promote cleavage at a specific area of a target messenger RNA (mRNA). Although these molecules appear to be candidates for the treatment of several diseases including cancer, challenges still remain such as nonspecific off-target, immune stimulation problems, instability and low success rate of delivery *in vivo* [7, 11].

Combination of nanoparticle-based drug and siRNA delivery systems has emerged as an innovative strategy for cancer treatment. In this review, the development of drug- and siRNA- loaded lipid and polymeric nanoparticle-based delivery systems used in the treatment of lung cancer is discussed.

1.1. Conventional Treatment Strategies and Disadvantages

The recommended first-line treatment for early-stage lung cancer patients involves surgical tumor resection and radiotherapy. However, most lung cancer patients are diagnosed with the disease that occur at an advanced stages and surgery is not suitable for such patients. Therefore, systemic chemotherapy is a preferable treatment regimen intended to prolong survival and increase the quality of life [12].

Platinum-based chemotherapeutics combined with taxanes are administered systemically as part of conventional treatments for patients with advanced lung cancer. Paclitaxel is an anti-cancer agent that blocks cell proliferation by assembling and stabilizing microtubules, but it has poor water solubility. Although adjuvants such as Cremophor EL can be used to deliver paclitaxel, it exhibits some toxicity and can cause several adverse effects. To overcome its toxicity and side effects, an albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane®) was developed and has been recently approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for NSCLC in combination with carboplatin. Although Abraxane® has increased efficacy and reduced toxicity, there is no significant improvement in the overall survival of this agent. Another type of chemotherapeutic agent, doxorubicin as an anthracycline antibiotic compound that has serious side effects.

Gemcitabine, an antimetabolite drug, inhibits cell proliferation by interfering DNA synthesis and it triggers several side effects including myelosuppression, neutropenia, thrombocytopenia and anemia. These conventional chemotherapeutic agents affect both normal and cancer cells, ultimately causing numerous adverse effects. Another problem with the conventional therapy is the development of resistant to chemotherapeutic agents by cancer cells, which results in tumor recurrence and metastasis [12]. Moreover, one of the most important factor that decreases the success of chemotherapy is the formation of Multidrug Resistance (MDR) against drugs as a result of spontaneous mutations of cancer cells [13].

Radiotherapy is the other treatment strategy used with chemotherapy for patients with inoperable condition. High dose radiation has the aim of killing cancer cells and reducing the tumor However high dose radiation has deleterious effects on the lungs, heart, esophagus and spinal cord, leading to dose restriction [14].

There is an urgent need for new therapeutic strategies because of the disadvantages of conventional treatment methods. The most popular and prominent strategies are i) molecular targeted therapy (such As Epidermal Growth Factor Receptor [EGFR] inhibitors and antiangiogenics based on inhibition of oncogenic proteins responsible for development, growth and spread of cancer; ii) immunotherapy (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein [CTLA]-4, Programmed cell Death [PD]-1, and PD-1 Ligand 1 [PD-L1] inhibitors) based on modulation of immune system components to fight cancer cells; iii) gene therapy and nanotechnology-based targeted drug delivery systems [3].

1.2. Advantages of Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems

Targeting delivery of drugs to cancer cells *via* nanocarriers is an effective approach. Nano-based formulations consist of a carrier such as lipids, polymeric nanoparticles, inorganic nanoparticles or dendrimers and targeting moieties such as antibodies, nucleic acids and high affinity ligands. Nano-carrier systems provide a major advantage of the specific delivery of larger amounts of chemotherapeutic agents to target tissues compared with the free drug [12].

This review considers the latest improvements in lipid/polymeric-based nanoparticles as therapeutic nanocarriers for lung cancer therapy.

2. LIPID-BASED NANOCARRIERS

Lipid-based Nanoparticles (LNPs) including liposomes and Solid Lipid Nanoparticles (SLN) have peculiar physicochemical properties such as good biocompatibility and less toxicity that make them feasible vehicles for drug delivery. These nanoparticles are made of uniform lipid bilayers or solid cores that can transport hydrophobic and hydrophilic drugs. Certain chemical modifications of lipid nanosystems make it possible for them to escape the immune system, leading to improved water solubility of the drug [15].

2.1. Liposomes

Liposomes are small vesicles characterized by the presence of a lipid bilayer that is primarily composed of amphipathic phospholipids enclosing an interior aqueous space (Fig. **1**). Various liposome-based nanoparticles have been approved by the FDA for lung cancer treatment and others are still undergoing clinical trials [16]. Some novel liposomal particulate systems under clinical trials are shown in Table **1**.

Liposomes can be formulated from either non-charged or positively/negatively charged phospholipids that can be administered intraperitoneally (i.p.), intravenously (i.v.), or intranasally. Various methods are used in the preparation of liposomes, but the most common are thin film hydration, membrane extrusion-film dispersion and ethanol injection methods. These methods achieve a high encapsulation efficiency of 75-99%. Various targeting delivery strategies use

[121] Tangsangasaksri, M.; Takemoto, H.; Naito, M.; Maeda, Y.; Sueyoshi, D.; Kim, H.J.; Miura, Y.; Ahn, J.; Azuma, R.; Nishiyama, N.; Miyata, K.; Kataoka, K. siRNA-loaded polyion complex micelle decorated with charge-conversional polymer tuned to undergo stepwise response to intra-tumoral and intra-endosomal pHs for exerting enhanced RNAi efficacy. *Biomacromolecules,* **2016**, *17*(1), 246-255.
http://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01334 PMID: 26616636

[122] Huschka, R.; Barhoumi, A.; Liu, Q.; Roth, J.A.; Ji, L.; Halas, N.J. Gene silencing by gold nanoshell-mediated delivery and laser-triggered release of antisense oligonucleotide and siRNA. *ACS Nano,* **2012**, *6*(9), 7681-7691.
http://dx.doi.org/10.1021/nn301135w PMID: 22862291

[123] Zhang, C.; Tang, N.; Liu, X.; Liang, W.; Xu, W.; Torchilin, V.P. siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene. *J. Control. Release,* **2006**, *112*(2), 229-239.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.01.022 PMID: 16545478

[124] Zhang, M.; Wang, Q.; Wan, K.W.; Ahmed, W.; Phoenix, D.A.; Zhang, Z.; Elrayess, M.A.; Elhissi, A.; Sun, X. Liposome mediated-CYP1A1 gene silencing nanomedicine prepared using lipid film-coated proliposomes as a potential treatment strategy of lung cancer. *Int. J. Pharm.,* **2019**, *566*, 185-193.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.078 PMID: 31051230

[125] Muralidharan, R.; Babu, A.; Amreddy, N.; Srivastava, A.; Chen, A.; Zhao, Y.D.; Kompella, U.B.; Munshi, A.; Ramesh, R. Tumor-targeted nanoparticle delivery of HuR siRNA inhibits lung tumor growth *in vitro* and *in vivo* by disrupting the oncogenic activity of the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cancer Ther.,* **2017**, *16*(8), 1470-1486.
http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0134 PMID: 28572169

[126] Zheng, S.; Wang, X.; Weng, Y.H.; Jin, X.; Ji, J.L.; Guo, L.; Hu, B.; Liu, N.; Cheng, Q.; Zhang, J.; Bai, H.; Yang, T.; Xia, X.H.; Zhang, H.Y.; Gao, S.; Huang, Y. siRNA knockdown of RRM2 effectively suppressed pancreatic tumor growth alone or synergistically with doxorubicin. *Mol. Ther. Nucleic Acids,* **2018**, *12*, 805-816.
http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2018.08.003 PMID: 30153565

[127] Weng, Y.; Xiao, H.; Zhang, J.; Liang, X.J.; Huang, Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol. Adv.,* **2019**, *37*(5), 801-825.
http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.012 PMID: 31034960

[128] Titze-de-Almeida, S.S.; Brandao, P.R.P.; Faber, I.; Titze-de-Almeida, R. Leading RNA interference therapeutics part 1: silencing hereditary transthyretin amyloidosis, with a focus on patisiran. *Mol. Diagn. Ther.,* **2020**, *24*(1), 49-59.
PMID: 31701435

[129] Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature,* **1998**, *391*(6669), 806-811.
http://dx.doi.org/10.1038/35888 PMID: 9486653

[130] Zamora-Avila, D.E.; Zapata-Benavides, P.; Franco-Molina, M.A.; Saavedra-Alonso, S.; Trejo-Avila, L.M.; Reséndez-Pérez, D.; Méndez-Vázquez, J.L.; Isaias-Badillo, J.; Rodríguez-Padilla, C. WT1 gene silencing by aerosol delivery of PEI-RNAi complexes inhibits B16-F10 lung metastases growth. *Cancer Gene Ther.,* **2009**, *16*(12), 892-899.
http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2009.35 PMID: 19461674

[131] Kamlah, F.; Eul, B.G.; Li, S.; Lang, N.; Marsh, L.M.; Seeger, W.; Grimminger, F.; Rose, F.; Hänze, J. Intravenous injection of siRNA directed against hypoxia-inducible factors prolongs survival in a Lewis lung carcinoma cancer model. *Cancer Gene Ther.,* **2009**, *16*(3), 195-205.
http://dx.doi.org/10.1038/cgt.2008.71 PMID: 18818708

[132] Bonnet, M.E.; Gossart, J.B.; Benoit, E.; Messmer, M.; Zounib, O.; Moreau, V.; Behr, J.P.; Lenne-Samuel, N.; Kedinger, V.; Meulle, A.; Erbacher, P.; Bolcato-Bellemin, A.L. Systemic delivery of sticky siRNAs targeting the cell cycle for lung tumor metastasis inhibition. *J. Control. Release,* **2013**, *170*(2), 183-190.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.015 PMID: 23727288

[133] Chatterjee, A.; Chattopadhyay, D.; Chakrabarti, G. miR-17-5p downregulation contributes to paclitaxel resistance of lung cancer cells through altering beclin1 expression. *PLoS One,* **2014**, *9*(4), e95716.
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095716 PMID: 24755562

[134] Wang, J.; Pan, X.L.; Ding, L.J.; Liu, D.Y.; Da-Peng Lei, ; Jin, T. Aberrant expression of Beclin-1 and LC3 correlates with poor prognosis of human hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS One,* **2013**, *8*(7), e69038.
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069038 PMID: 23935917

[135] Lo, Y.L.; Sung, K.H.; Chiu, C.C.; Wang, L.F. Chemically conjugating polyethylenimine with chondroitin sulfate to promote CD44-mediated endocytosis for gene delivery. *Mol. Pharm.,* **2013**, *10*(2), 664-676.
http://dx.doi.org/10.1021/mp300432s PMID: 23281918

[136] Liu, W.; Lo, Y.L.; Hsu, C.; Wu, Y.T.; Liao, Z.X.; Wu, W.J.; Chen, Y.J.; Kao, C.; Chiu, C.C.; Wang, L.F. CS-PEI/Beclin-siRNA downregulate multidrug resistance proteins and increase paclitaxel therapeutic efficacy against NSCLC. *Mol. Ther. Nucleic Acids,* **2019**, *17*, 477-490.
http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2019.06.017 PMID: 31336235

[137] Xu, C-X.; Jere, D.; Jin, H.; Chang, S-H.; Chung, Y-S.; Shin, J-Y.; Kim, J-E.; Park, S-J.; Lee, Y-H.; Chae, C-H.; Lee, K.H.; Beck, G.R., Jr; Cho, C.S.; Cho, M.H. Poly(ester amine)-mediated, aerosol-delivered Akt1 small interfering RNA suppresses lung tumorigenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.,* **2008**, *178*(1), 60-73.
http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200707-1022OC PMID: 18310482

[138] Okuda, T.; Kito, D.; Oiwa, A.; Fukushima, M.; Hira, D.; Okamoto, H. Gene silencing in a mouse lung metastasis model by an inhalable dry small interfering RNA powder prepared using the supercritical carbon dioxide technique. *Biol. Pharm. Bull.,* **2013**, *36*(7), 1183-1191.
http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00167 PMID: 23811567

[139] Yu, H.; Zou, Y.; Jiang, L.; Yin, Q.; He, X.; Chen, L.; Zhang, Z.; Gu, W.; Li, Y. Induction of apoptosis in non-small cell lung cancer by downregulation of MDM2 using pH-responsive PMPC-b-PDPA/siRNA complex nanoparticles. *Biomaterials,* **2013**, *34*(11), 2738-2747.
http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.042 PMID: 23352573

[140] Mao, C.Q.; Xiong, M.H.; Liu, Y.; Shen, S.; Du, X.J.; Yang, X.Z.; Dou, S.; Zhang, P.Z.; Wang, J. Synthetic lethal therapy for KRAS mutant non-small-cell lung carcinoma with nanoparticle-mediated CDK4 siRNA delivery. *Mol. Ther.,* **2014**, *22*(5), 964-973.
http://dx.doi.org/10.1038/mt.2014.18 PMID: 24496383

[141] Conti, D.S.; Brewer, D.; Grashik, J.; Avasarala, S.; da Rocha, S.R. Poly(amidoamine) dendrimer nanocarriers and their aerosol formulations for siRNA delivery to the lung epithelium. *Mol. Pharm.,* **2014**, *11*(6), 1808-1822.
http://dx.doi.org/10.1021/mp4006358 PMID: 24811243

[142] Zhang, Z.; Yang, X.; Zhang, Y.; Zeng, B.; Wang, S.; Zhu, T.; Roden, R.B.S.; Chen, Y.; Yang, R. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. *Clin. Cancer Res.,* **2006**, *12*(16), 4933-4939.
http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2831 PMID: 16914582

[143] Wang, C.; Ding, C.; Kong, M.; Dong, A.; Qian, J.; Jiang, D.; Shen, Z. Tumor-targeting magnetic lipoplex delivery of short hairpin RNA suppresses IGF-1R overexpression of lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **2011**, *410*(3), 537-542.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.019 PMID: 21683689

[144] Conde, J.; Tian, F.; Hernández, Y.; Bao, C.; Cui, D.; Janssen, K-P.; Ibarra, M.R.; Baptista, P.V.; Stoeger, T.; de la Fuente, J.M. *In vivo* tumor targeting *via* nanoparticle-mediated therapeutic siRNA coupled to inflammatory response in lung cancer mouse models. *Biomaterials,* **2013**, *34*(31), 7744-7753.
http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.041 PMID: 23850099

[145] Sandra, F.; Khaliq, N.U.; Sunna, A.; Care, A. Developing protein-based nanoparticles as versatile delivery systems for cancer therapy and imaging. *Nanomaterials (Basel),* **2019**, *9*(9), E1329.
http://dx.doi.org/10.3390/nano9091329 PMID: 31527483

[146] Lee, E.J.; Lee, S.J.; Kang, Y.S.; Ryu, J.H.; Kwon, K.C.; Jo, E.; Yhee, J.Y.; Kwon, I.C.; Kim, K.; Lee, J. Engineered proteinticles

for targeted delivery of siRNA to cancer cells. *Adv. Funct. Mater.,* **2015**, *25*(8), 1279-1286. http://dx.doi.org/10.1002/adfm.201403680

[147] Choi, K.M.; Kim, K.; Kwon, I.C.; Kim, I.S.; Ahn, H.J. Systemic delivery of siRNA by chimeric capsid protein: tumor targeting and RNAi activity *in vivo*. *Mol. Pharm.,* **2013**, *10*(1), 18-25. http://dx.doi.org/10.1021/mp300211a PMID: 22663765

[148] Cormode, D.P.; Naha, P.C.; Fayad, Z.A. Nanoparticle contrast agents for computed tomography: a focus on micelles. *Contrast Media Mol. Imaging,* **2014**, *9*(1), 37-52. http://dx.doi.org/10.1002/cmmi.1551 PMID: 24470293



Journal of Microencapsulation

Micro and Nano Carriers

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/imnc20

Efficacy of siRNA-loaded nanoparticles in the treatment of K-RAS mutant lung cancer *in vitro*

Ayse Gencer, Ipek Baysal, Emirhan Nemutlu, Samiye Yabanoglu-Ciftci & Betul Arica

To cite this article: Ayse Gencer, Ipek Baysal, Emirhan Nemutlu, Samiye Yabanoglu-Ciftci & Betul Arica (2022): Efficacy of siRNA-loaded nanoparticles in the treatment of K-RAS mutant lung cancer *in vitro*, Journal of Microencapsulation, DOI: 10.1080/02652048.2022.2061058

To link to this article: https://doi.org/10.1080/02652048.2022.2061058

Published online: 18 Apr 2022.

Submit your article to this journal

Article views: 42

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=imnc20

JOURNAL OF MICROENCAPSULATION
https://doi.org/10.1080/02652048.2022.2061058

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

Check for updates

Efficacy of siRNA-loaded nanoparticles in the treatment of K-RAS mutant lung cancer *in vitro*

Ayse Gencer[a], Ipek Baysal[b], Emirhan Nemutlu[c], Samiye Yabanoglu-Ciftci[d] and Betul Arica[a]

[a]Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey; [b]Vocational School of Health Services, Hacettepe University, Ankara, Turkey; [c]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey; [d]Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey

ABSTRACT

To design and develop K-RAS silencing small interfering RNA (siRNA)-loaded poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles and evaluate their efficacy in the treatment of K-RAS mutant lung cancer. The nanoparticles prepared by the double emulsion solvent evaporation method were characterized by TEM, FTIR and XPS analyzes and evaluated *in vitro* by XTT, PCR, ELISA, and Western-Blot. Metabolomic analyzes were performed to evaluate the changes in metabolic profiles of the cells after nanoparticles treatment. The nanoparticles were obtained with a particle size less than 250 nm, a polydispersity index around 0.1, a surface charge of (−12) – (+14) mV, and 80% of the siRNA encapsulation. The nanoparticles didn't affect cell viability of the cells after 72 hours. In cancer cells, KRAS expression was decreased by up to 50%, protein levels were decreased by more than 90%. The formulated siRNA delivery nanoparticles can be promising treatment in lung cancer.

ARTICLE HISTORY
Received 1 November 2021
Accepted 29 March 2022

KEYWORDS
K-RAS; lung cancer; metabolomic; poly (D; L-lactic-co-glycolic acid); polymeric nanoparticle; siRNA

1. Introduction

According to the latest reports of the World Health Organisation (WHO), lung cancer is the third cancer type in incidence and the first cancer type in mortality among all cancer types worldwide and it is estimated that incident cases will reach 2.52 million in 2025 (Ferlay *et al.* 2020).

In the treatment of lung cancer, the most appropriate method is selected depending on the type and stage of cancer. Conventional treatment methods are surgical resection, chemotherapy, and radiotherapy. These treatment methods are applied alone or in combination (Lemjabbar-Alaoui *et al.* 2015). Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common type of lung cancer (85% of all cases) Adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, large cell carcinoma and bronchioalveolar carcinoma are the subtypes of NSCLC. Serious side and toxic effects resulting from the non-selectivity of chemotherapeutics affect healthy cells as well as cancer cells during systemic therapy. Therefore, the quality of life of the patients is adversely affected. More importantly, these side effects limit the applicable dosage of chemotherapeutics. Another important factor reducing the success of chemotherapy is the development of multi-drug resistance (MDR) as a result of spontaneous mutations of cancer cells (Özgüroğlu 2003). Radiotherapy, which aims to kill cancer cells and reduce tumour tissue by applying high-intensity radiation, may cause damage to organs such as the lung, heart, oesophagus, and spinal cord. Therefore, dose restriction is required (Sonke and Belderbos 2010). All these factors lead to the failure of lung cancer treatment. Thus, scientists working in the field of cancer aim to develop new treatment strategies that can be more effective and selective.

There are several promising approaches for cancer treatment based on the inhibition of specific molecules responsible for cancer formation, growth, and spread. Molecular targeted therapy (epidermal growth factor receptor inhibitors, antiangiogenics, etc.) (Ramalingam *et al.* 2011), immunotherapy based on modulating immune system components that fight cancer cells (cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4 (CTLA-4), programmed death 1 (PD-1) and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) inhibitors) (Sundar *et al.* 2014), gene therapy (Toloza *et al.* 2006), drug delivery systems (liposome, solid lipid nanoparticles, polymeric nanoparticles, polymeric micelles, dendrimers, etc.) that enable effective drug delivery to

CONTACT Betul Arica-Yegin barica@hacettepe.edu.tr Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

the target area (Cho *et al.* 2008, Haley and Frenkel 2008) are the leading approaches for effective and/or individualised cancer treatment.

The mechanism of the cancer formation is directly or indirectly related to genetic mutations and activation of oncogenes (Heng *et al.* 2010). Gene therapy involves strategies such as repairing, suppressing, or silencing genes that cause cancer formation. The advantage of gene therapy over other treatment approaches is that it is highly specific and suitable for developing individual treatment strategies (Cross and Burmester 2006, Amer 2014). RNA interference is one of the most important genes therapy techniques. It effects through a pathway where double-stranded RNA is attached to the target mRNA of the gene to be silenced and degrades thus, preventing the synthesis of the protein associated with cancer after transcription. For this purpose, small interfering RNA (siRNA) molecules of 20–25 nucleotides length, are obtained by breaking down double stranded RNA (dsRNA) into small RNA fragments by the Dicer enzyme (an RNase III endonuclease which is involved in the biogenesis of small RNAs) are used (Song and Rossi 2017). After the transfection of siRNA into cells via different transfection methods, it forms a complex with RNA-Induced Silencing Complex (RISC) containing endonuclease, exonuclease, and helicase enzymes in its structure. This complex binds to target mRNA by recognise it through the siRNA. As a result, the mRNA is degraded and inactivated by RISC (Devi 2006, Rao *et al.* 2013, Mansoori *et al.* 2014).

Rat Sarcoma viral oncogenes (RAS), a proto-oncogene family, are involved in processes such as signal transduction, proliferation, differentiation, adhesion, apoptosis, and migration in healthy cells. The mutations of this proto-oncogene family are very common in various cancer types, especially *Kirsten Rat Sarcoma* viral oncogene (K-RAS), a sub-type of the RAS gene family, which has an important role in lung cancers. In the majority of lung adenocarcinoma cases, it is known that this pathway is activated (15–25%) (Del Re *et al.* 2018). Thus, K-RAS has an important role as a target in lung cancer treatment. Although a few inhibitors that inhibit K-RAS directly or indirectly have been developed recently, direct targeting of mutant K-RAS has remained challenging because GTPase activity is impaired as a result of the mutations of K-RAS (Westcott and To 2013). Therefore, the use of the RNA interference method as a treatment strategy in K-RAS mutant NSCLC cases can be considered an important and effective alternative strategy (Kopp *et al.* 2014, Yuan *et al.* 2014, Ma *et al.* 2015). However, effectively transporting siRNA to the tumour side is a limiting factor in the RNA interference strategy because of its sensitivity to enzymatic degradation in the blood, nonspecific uptake by cells, the difficulty of transfection into the cell due to its relatively large size and negative surface charge, and clearance by the mononuclear phagocytic system. Thus, an effective delivery method is required.

Nanotechnological drug delivery systems, as a nonviral gene transfection method, have been studied and considered highly promising in recent years. Nanotechnological gene delivery systems can provide the transfection of siRNA into cells while eliminating its stability problems. Liposomes, polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles, inorganic nanoparticles, dendrimers and nanocrystals can be used as a nonviral gene transfection method (Choi *et al.* 2014, Chen *et al.* 2016, Gencer *et al.* 2021). Polymeric nanoparticles have some advantages over the other drug delivery systems such as having much higher stability in biological fluids, thus increasing the stability of the active substance it carries and staying in circulation for a long time, being biocompatible and biodegradable, relatively easy production techniques, being able to be produced inhomogeneous shape and size, high drug loading capacity (Masood 2016, Kumar 2007). Polylactic acid (PLA) (Perez *et al.* 2001), poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) (Harguindey *et al.* 2017), polyethyleneimine (PEI) (Kichler *et al.* 2001), poly(L-lysine) (PLL) (Askarian *et al.* 2015), chitosan (Ragelle *et al.* 2014), and polyalkylcyanoacrylate (PACA) (Duan *et al.* 2009) have been used successfully to prepare polymeric nanoparticles as a gene delivery system.

The aim of this study is to develop, optimise and characterise of siRNA-loaded polymeric nanoparticles that have selective effects for K-RAS mutant NSCLC which is the most common type of lung cancer and to evaluate it's *in vitro* efficiency. PLGA approved by Food and Drug Administration (FDA) for human application was used to prepare the nanoparticles because of its non-toxicity, biocompatibility, and biodegradability. Lipid and polymer structured materials, dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) and PEI, were used as two different cationic substances to modify the surface charge of PLGA nanoparticles with anionic surface charge. The nanoparticles were also modified with hyaluronic acid (HA), a biodegradable and biocompatible molecule and the ligand of the CD44 surface protein, which is overexpressed in lung cancer cells. Nanoparticles prepared with different modifications were compared in terms of siRNA delivery properties and *in vitro* efficiency. Accordingly, this study

aims to combine both the RNA interference mechanism and the active/passive targeting properties of polymeric nanoparticles in a single system.

2. Materials and methods

2.1. Materials

PLGA (lactide-glycolide ratio: 50:50, Mw: 7.000–17.000 Da, ester terminated), Polyvinyl alcohol (PVA) (Mw: 9.000–10.000 Da), PEI (branched, Mw: 25.000 Da) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany), HA (Mw: 8.000–15.000 Da) was purchased from Contipro (Czech Republic), DOTAP was obtained from Avanti Polar Lipids (USA). Human K-RAS siRNA, siGLO Green Transfection Indicator, siRNA buffer and nuclease-free water were from Dharmacon (USA). iQuant™ RNA HS Assay Kit was purchased from ABP Biosciences (USA) and SYBR Green RNA gel stain was purchased from Invitrogen (USA). N-methyl- N-trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) was purchased from Thermo Fischer (USA). Methanol, acetonitrile, formic acid, methoxyamine hydrochloride and pyridine were purchased from S.Aldrich (Germany). A549 and BEAS-2B cell lines were purchased from ATCC® and cultured in DMEM with 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS) (S.Aldrich, Germany). All other chemicals were of reagent grade without further purification.

2.2. Preparation of nanoparticles

The blank and siRNA-loaded PLGA nanoparticles were prepared by the double emulsion solvent evaporation method (Patil and Panyam 2009, Li *et al.* 2016, Liu *et al.* 2016, Baysal *et al.* 2017). After the preparation of 2% (w/v) polymer solution in chloroform, 1 nmol siRNA in 250 µL siRNA buffer was added to the organic phase and sonicated with an ultrasonic homogeniser (Bandelin, Germany) in an ice bath for 90 s. The obtained w/o emulsion was added to a 1% (w/v) aqueous solution of surfactant (PVA) and sonicated with an ultrasonic homogeniser in an ice bath for 3 min. Chloroform was evaporated by stirring on a magnetic stirrer for 8 h. The resulting nanoparticle dispersion was centrifuged for 20 min at 4 °C, 13.500 rpm, and washed twice with distilled water. To prepare cationic nanoparticles, DOTAP or PEI was dissolved in the polymer solution in chloroform before preparing primer emulsion. The supernatants were collected at each step of centrifugation for quantitative analysis of siRNA.

The hyaluronic acid modification was carried out with the electrostatic adsorption method (Li *et al.* 2016, Liu *et al.* 2016). The positive surface charge of the nanoparticles modified with a cationic agent allows electrostatic interaction with the negatively charged HA. 20 mg of the lyophilised nanoparticles were dispersed in 0.5% (w/v) HA in phosphate buffer solution (PBS) and allowed to stir continuously for 4 h at room temperature. Then, the nanoparticles were centrifugated at 4 °C, 13.500 rpm and twice washed with water. The supernatants were collected at each step for quantitative analysis of HA. DNase-RNase free water was used in all stages while preparing nanoparticles containing siRNA.

2.3. Characterisation of nanoparticles

Morphological evaluation

The morphological characteristics of the nanoparticles were investigated using transmission electron microscopy (TEM). About 10 µL of the nanoparticle dispersion in ultrapure water was dropped onto a carbon film-coated copper grid and after drying under atmospheric conditions, imaging was performed on the TEM device (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin, USA).

Measurement of particle size, polydispersity index and zeta potential

The mean of particle size and polydispersity index (PDI) was determined by dynamic light scattering (DLS) and the zeta potential was determined by the laser doppler electrophoresis technique using Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) in aqueous medium at room temperature. Measurements were performed at least in triplicate and on three different batches of nanoparticles.

X-Ray photoelectron spectroscopy analysis

X-Ray Photoelectron Spectroscopy Analysis (XPS) (PHI 5000 VersaProbe, USA) was performed for surface analysis of nanoparticles after HA modification.

Fourier-Transform infrared spectroscopy analysis

HA conjugation was also characterised and evaluated using Fourier Transform Infra-red Spectroscopy (FTIR). The samples were plated with KBr, and analysis was conducted by Spectrum 400 FTIR Spectrometer (PerkinElmer, USA) at 4 cm^{-1} resolutions. Analysis performed at 4000 – 400 cm^{-1}.

Evaluation of HA binding efficiency

To evaluate the amount of HA bound to the surface of the nanoparticles, the sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) was performed. Supernatants were collected after the preparation of HA-modified nanoparticles and centrifuging at 13.500 rpm for 30 min and analysed according to the HA ELISA kit manufacturer's protocol (Bioassay Technology, China). Binding efficiencies were calculated in percentage (%) using Equation (1).

$$HA\ binding\ yield = \frac{Amount\ of\ HA\ added\ formulation\ (mg) - Amount\ of\ HA\ in\ supernatant\ (mg)}{Amount\ of\ HA\ added\ formulation\ (mg)} \times 100 \quad (1)$$

2.4. siRNA encapsulation efficiency

The siRNA encapsulation efficiency (EE) of the nanoparticles was calculated using the indirect method by collecting supernatants after centrifugation of nanoparticles at 13.500 rpm. The amount of the unbound siRNA in the supernatant was determined using iQuantTM RNA HS Assay Kit (ABP Biosciences, USA) based on the principle of staining nucleic acid with an ultrasensitive fluorescent reagent for quantitating RNA in solution. After fluorescent labelling, samples were read by the Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The following equation (Equation (2)) was used to calculate the encapsulation efficiency (EE).

Agarose-gel electrophoresis was also used for qualitative analysis of siRNA encapsulation. Agarose gel electrophoresis is a standard method used for the separation, identification, and purification of gene molecules (Lee *et al.* 2012). Electrophoretic mobility of the siRNA was measured by applying the supernatant to the gel. The unloaded siRNA was observed with band formation on the gel.

$$EE\ (\%) = \frac{Amount\ of\ siRNA\ added\ nanoparticles\ (\mu g) - Amount\ of\ siRNA\ in\ superatant\ (\mu g)}{Amount\ of\ siRNA\ added\ nanoparticles\ (\mu g)} \times 100 \quad (2)$$

2.5. In vitro siRNA release studies

A simple, practical, and low-cost sample and separate method were used to determine the release of siRNA from the nanoparticles (Patil and Panyam 2009, Cun *et al.* 2011, Colombo *et al.* 2015). 2 mg of the lyophilised nanoparticles were dispersed in 1 ml of pH 7.4 PBS and incubated in a horizontal shaker water bath (Mammert, Germany) at 37° C. The samples were centrifuged at 13.500 rpm and 4 °C, 20 min at certain time intervals (0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h) and the supernatant was collected. Nanoparticles were redispersed in 1 ml fresh medium and samples were taken back to the water bath. Determination of released siRNA in the supernatant was carried out as described in the previous section. In addition, siRNAs extracted from samples taken at certain time points were loaded into agarose gel.

2.6. In vitro cytotoxicity studies

A549 human lung adenocarcinoma cells (CCL-185™, ATCC, USA) (were used as K-RAS mutant NSCLC model and BEAS-2B human lung epithelial cells (CRL-9609™, ATCC, USA) were used as healthy control cells carrying wild type K-RAS. The cells were cultured with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (S.Aldrich, Germany) supplemented with penicillin-streptomycin (10 000 U. mL^{-1}) (S.Aldrich, Germany) and 10% (v/v) FBS (S.Aldrich, Germany). Cells were grown under standard culture conditions (37 °C and 5% CO_2) in a humidified incubator.

XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) assay was performed to determine the effects of blank and siRNA loaded nanoparticles on the proliferation of human lung adenocarcinoma cells and healthy lung cells. Both of cells were cultured in 96-well plates ($4 \times 10^4 - 6 \times 10^4$ cells/well) in a culture medium containing 10% (v/v) FBS for 24 h to allow cell attachment. Then, the medium was removed, and the cells were treated with the nanoparticle suspensions in medium and naked siRNA as a positive control. After the 72-h incubation at 37 °C, 10 µL XTT (5 mg. mL^{-1} in PBS) was added to each well. After 4 h of incubation, the absorbance of each well was measured by a microplate reader (Molecular Devices, USA) at 590 nm wavelength. The

cell viability was calculated as the percentage ratio of the absorbance of cells incubated with the formulations to the absorbance of the negative control cells using Equation (3).

$$Viability\ (\%) = \frac{Mean\ ODsample}{Mean\ ODcontrol} \times 100 \qquad (3)$$

2.7. Evaluation of in vitro gene silencing activity

Real-Time polymerase chain reaction (RT-PCR)

K-RAS gene silencing efficiency of the prepared formulations was evaluated using Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). A549 and BEAS-2B cells were cultured in 6-well plates (3×10^5 cells/well). After 24 h of incubation, the medium was removed, and the cells were transfected with the K-RAS siRNA loaded nanoparticles by adding the 3 ml of nanoparticles dispersed in the medium to the cells cultured in 6- well plates. The cells treated with nanoparticles were incubated for 72 h to complete transfection. Following the transfection, total RNA from the cells was isolated with an RNA extraction kit according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesised from 1 µg of extracted total RNA according to SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) manufacturer's protocol. The absence of contamination in the samples was confirmed by negative control samples prepared without reverse transcriptase. RT-PCR analysis was performed with the Via 7 (Applied Biosystems, USA) sequence detection system using SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) in 96-well plates. GAPDH was used as internal control- housekeeping gene. The investigated gene was normalised by proportioning with GAPDH. The following primers designed by the Primer-BLAST tool were used; K-RAS: F: 5′-AGCTGTATCGTCAAGGCACT-3′ R: 5′-AGG TACTGGTGGAGTATTTGATAGT-3′; GAPDH: F: 5′-ATGG GCAGCCGTTAGGAAA-3′ R: 5′-GCATCGCCCCACTT GATTTT-3′.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent assay

72 h after the transfection with the formulations, the K-RAS protein expression levels of cells were determined by sandwich-ELISA. The analysis was performed using the Human K-RAS ELISA kit (Bioassay Technology, China) in accordance with the manufacturer's protocol.

Western blot analysis

The evaluation of the silencing efficiency of the nanoparticles was also carried out by Western Blot Analysis. The cells cultured in 6-well plates (3×10^5 cells/well) were transfected with the K-RAS siRNA-loaded nanoparticles. Following the 72-h transfection process, the cells were subjected to lysis by RIPA buffer (Santa Cruz) supplemented with a protease inhibitors cocktail. The cell lysates were collected by centrifugation at 12 000 rpm for 20 min. Protein samples were subjected to electrophoresis in polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane with iBlot 2 Dry Blotting System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD). The membrane was incubated with primary and then secondary antibodies according to WesternBreeze® Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD). The expression levels of K-RAS protein were relatively compared with those of housekeeping GAPDH proteins.

2.8. Treatment evaluation at metabolite

Metabolomic analyzes were performed to assess whether cell lines bearing mutant K-RAS revert to a normal metabolomic profile after treatment. Two orthogonal analytical platforms (gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-qTOF-MS)) described earlier were used for metabolic analysis (Nemutlu *et al.* 2019, Eylem *et al.* 2020). Briefly, cell lines, reached 100% confluency, were taken out from the incubator, and quickly washed with PBS and extracted using methanol: water (9:1, v/v) mixture. Then, the extracts were centrifuged at 10 000 rpm for 10 min and two separate 0.4 ml aliquots were dried out in Eppendorf tubes to analyse with GC-MS after derivatization and LC-qTOF-MS after reconstituted with the mobile phase. The details of the operating conditions for GC-MS and LC-qTOF-MS and data analysis including peak annotation and statistical parameters were given in the supplementary section.

2.9. Statistical analysis

Results are presented as mean values ± standard deviation (SD). Statistically significant differences were analysed via the student's *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA). Each test data from independent experiments were repeated at least three times. $p < 0.05$ was considered statistically significant. GraphPad Prism®5 software was used for statistical calculations.

Table 1. Physicochemical characteristics of the blank or siRNA-loaded PLGA nanoparticles and siRNA encapsulation efficiency of the siRNA-loaded PLGA nanoparticles (results denote mean ± SD, $n = 3$).

Formulation	DOTAP (mg)	PEI (mg)	siRNA (μg)	Mean particle diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	siRNA Encapsulation Efficiency (%)
PLGA NPs	–	–	–	194.67 ± 0.15	0.06 ± 0.01	−6.50 ± 0.68	N.A.
DOTAP-PLGA NPs	1.5	–	–	234.52 ± 4.25	0.12 ± 0.01	16.27 ± 3.37	N.A.
PEI-PLGA NPs	–	1	–	221.55 ± 6.89	0.14 ± 0.01	19.03 ± 0.51	N.A.
siRNA PLGA NPs	–	–	13.3	244 ± 2.99	0.16 ± 0.02	−12.27 ± 0.25	6.17 ± 3.08
siRNA DOTAP-PLGA NPs	1.5	–	13.3	232.97 ± 13.47	0.16 ± 0.06	4.85 ± 1.42	100.00 ± 0.00
siRNA PEI-PLGA NPs	–	1	13.3	207.67 ± 4.51	0.12 ± 0.02	14.25 ± 1.87	80.24 ± 2.01
HA-siRNA DOTAP-PLGA NPs	1.5	–	13.3	412.67 ± 13.80	0.53 ± 0.04	−0.95 ± 0.08	N.A.
HA-siRNA PEI-PLGA NPs	–	1	13.3	247.48 ± 19.66	0.16 ± 0.05	−1.65 ± 0.88	N.A.

The PLGA and PVA concentrations for all formulations were 2% and 1% (w/v), respectively. The amount of HA used was 0.5 mg for the HA modified nanoparticles.
Poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (PLGA NPs), DOTAP modified PLGA nanoparticles (DOTAP-PLGA NPs), PEI modified PLGA nanoparticles (PEI-PLGA NPs), siRNA loaded PLGA nanoparticles (siRNA PLGA NPs), siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (siRNA DOTAP-PLGA NPs), siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (siRNA PEI-PLGA NPs), Hyaluronic acid (HA) coated siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA DOTAP-PLGA NPs), HA coated siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA PEI-PLGA NPs), Polydispersity index (PDI). Encapsulation efficiencies of the siRNA loaded nanoparticles were calculated before HA modification.

3. Results

3.1. Preparation and characterisation of blank and siRNA loaded nanoparticles

Particle size, PDI and zeta-potential of the blank and siRNA loaded PLGA nanoparticles prepared using the double emulsion solvent evaporation method with and without DOTAP and PEI are summarised in Table 1. Particle size was within the range 190–250 nm and PDI was below 0.16 for all prepared nanoparticle formulations. Zeta-potential results varied depending on the surface modifications made in the formulations. PEI and DOTAP surface modifications changed the negative zeta potential of the blank PLGA nanoparticles to positive as expected and the addition of siRNA to the PLGA nanoparticles resulted in higher negative zeta potential (siRNA-PLGA NPs).

Nanoparticles prepared with HA, were measured to have increased size and PDI, especially for DOTAP-modified PLGA nanoparticles. Additionally, HA modification resulted in reduced and slightly negative charged nanoparticles (Table 1).

FTIR analysis was performed to identify the blank nanoparticle formation and modification. The spectra of the nanoparticles and formulation components are shown in Figure 1. The main peaks seen are the characteristic peaks of N-H stretching, N-H bending and C-N stretching originating from PEI around 3270 cm^{-1}, 1590 cm^{-1}, and 1350–1000 cm^{-1}, respectively, C-H and C = O stretching peaks of the ester group at 2922 cm^{-1} and 1739 cm^{-1}, and C-N asymmetric stretching peak of the trimethyl ammonium group at 1480 cm^{-1} and also O-H stretching peak at 3000–3500 cm^{-1} due to HA.

TEM images of the prepared nanoparticles show the change in their morphological structure before and after siRNA loading, surface modification with cationic agents and HA. As seen in Figure 2, the blank and siRNA-loaded nanoparticles maintained their smooth spherical shape in all formulations. In addition, it is seen that there is no significant difference between the different formulations in the particle size and shape of the nanoparticles. A second layer was observed on the surface of the nanoparticles after coating with HA.

XPS spectra of the blank nanoparticles are given in Figure 2. According to the results, there is no nitrogen (N) on the surfaces of the nanoparticles modified with DOTAP (Figure 2A). PEI-induced N peak occurred in the XPS spectrum of the nanoparticles modified with PEI (Figure 2B).

The HA binding yields of the nanoparticles calculated with Equation (1) given in were found to be 95.87 ± 1.32% and 90.11 ± 1.25%. for DOTAP-modified nanoparticle formulation (HA siRNA-DOTAP-PLGA NPs) and PEI-modified nanoparticle formulation (HA-siRNA-PEI-PLGA NPs), respectively.

3.2. Sirna encapsulation efficiency

The agarose-gel images of the prepared formulations for siRNA encapsulation efficiency are given in Figure 3A. The siRNA encapsulation efficiencies of the nanoparticles obtained as a result of the quantitative analysis performed with Qubit ™ 4 Fluorometer are presented in Table 1. It was observed that the siRNA encapsulation efficiency of the nanoparticles increased with the addition of cationic substances to the formulation. The nanoparticles modified with PEI and DOTAP encapsulated almost all the siRNA. The results obtained by the fluorometer are also compatible with the images obtained on the agarose gel.

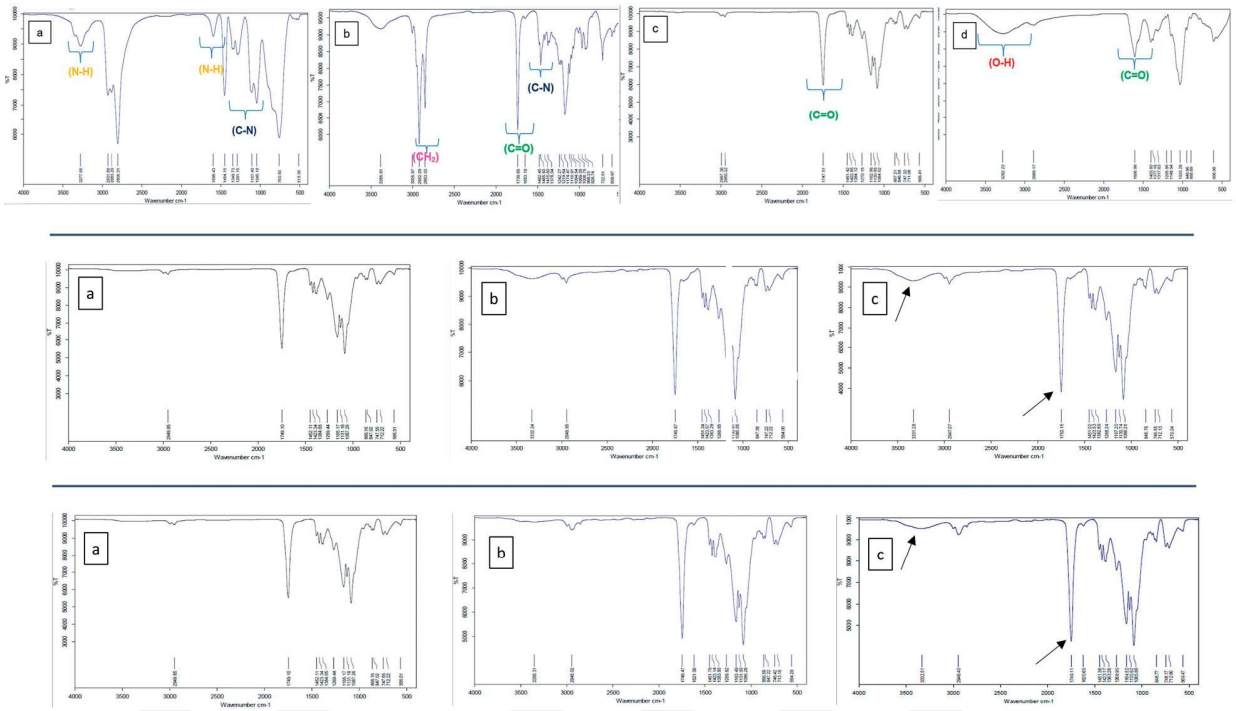


Figure 1. Fourier-Transform Infra-red (FTIR) spectra of polyethyleneimine (PEI) (a), dioleoyl-3-trimethylammonium propane (DOTAP) (b), poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) (c) and hyaluronic acid (HA) (d) (top panel). FTIR spectra of PEI-modified nanoparticles (middle panel), PLGA NPs (a), PEI-PLGA NPs (b), HA coated PEI modified nanoparticles (HA-PEI-PLGA NPs) (c). DOTAP-modified nanoparticles (bottom panel) PLGA NPs (a), DOTAP-PLGA NPs (b), HA coated DOTAP modified nanoparticles HA-DOTAP-PLGA NPs (c).

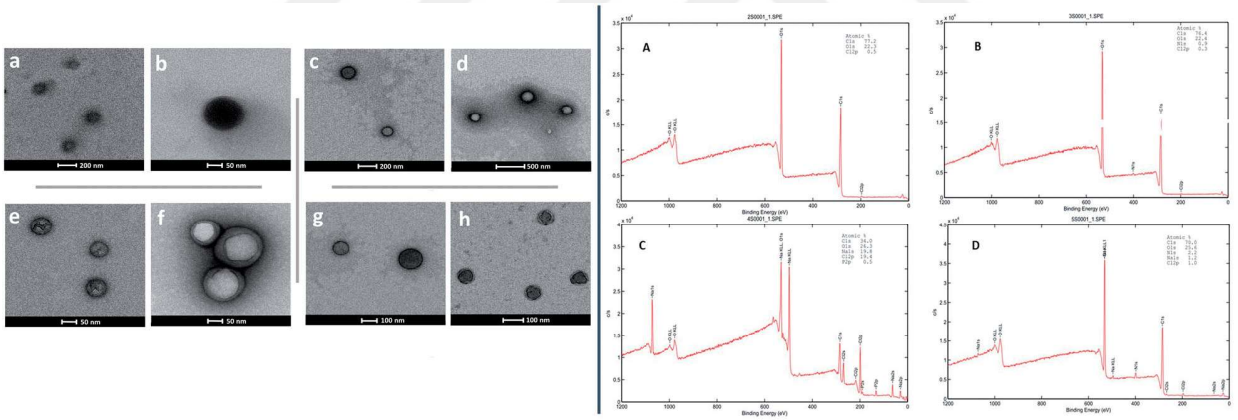


Figure 2. Transmission electron microscopy images of PLGA nanoparticles (left), PLGA nanoparticles (PLGA NPs) (a-b), DOTAP modified PLGA nanoparticles (DOTAP-PLGA NPs) (c), siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (siRNA-DOTAP-PLGA NPs) (d), PEI modified PLGA nanoparticles (PEI-PLGA NPs) (e), siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (siRNA-PEI-PLGA NPs) (f), Hyaluronic acid (HA) coated siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA-DOTAP-PLGA NPs) (g), HA-coated siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA-PEI-PLGA NPs) (h), XPS spectra of blank PLGA nanoparticles (right). DOTAP-PLGA NPs (A), PEI-PLGA-NPs (B), HA-DOTAP-PLGA NPs (C), HA- PEI-PLGA NPs (D).

3.3. In vitro *siRNA release studies*

The gel-electrophoresis results of the samples taken during the release studies carried out at pH 7.4 are given in Figure 3B. The release studies were carried out with HA-siRNA-PEI-PLGA NPs and HA-siRNA-DOTAP-PLGA NPs, which are the final formulations. siRNA release profiles in phosphate buffer, pH 7.4 for

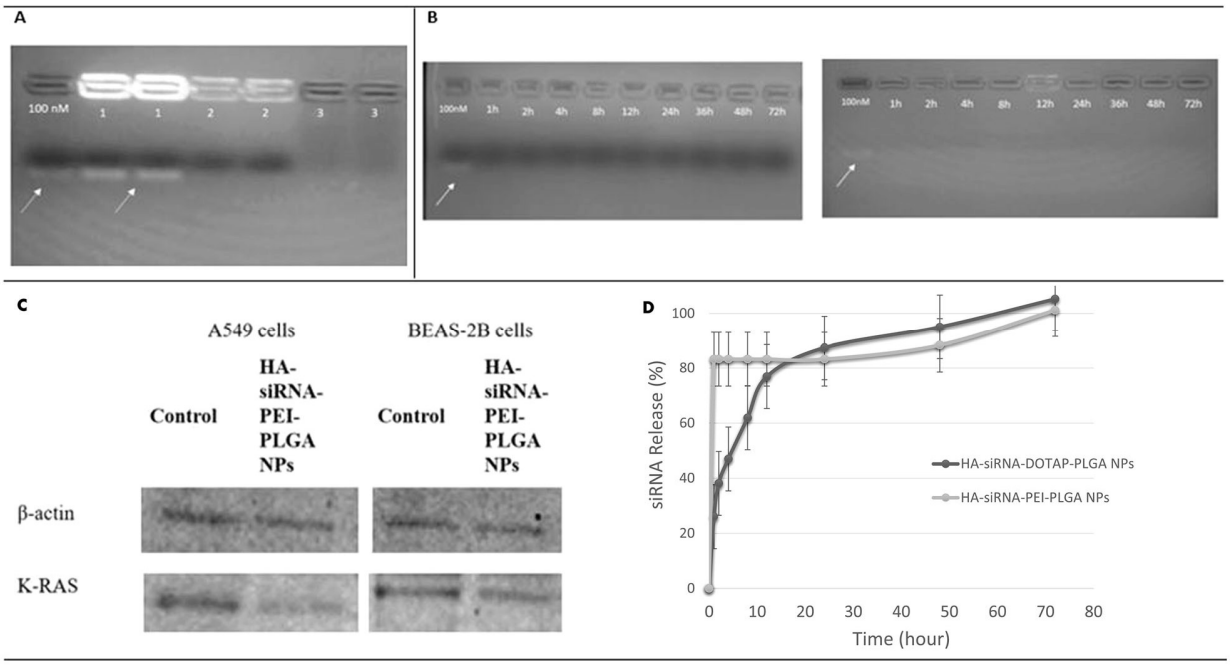


Figure 3. Agarose gel image of the siRNA recovered from supernatants of the nanoparticles contained 100 nM siRNA (lane 1- siRNA-PLGA NPs, lane 2- siRNA-DOTAP-PLGA NPs, lane 3- siRNA-PEI-PLGA NPs), 100 nM naked siRNA was used as a positive control (A). Agarose gel images of released siRNA from the formulations for 72 h (B), HA-siRNA-DOTAP-PLGA NPs (left), HA-siRNA-PEI-PLGA NPs (right), 100 nM naked siRNA were used as a positive control. Western Blot image of K-RAS protein for A549 and BEAS-2B cells after 72 h of the nanoparticle treatment with 100 nm siRNA (C). Release of siRNA from the HA-modified nanoparticle formulations for 72 h (D). (Results denote mean ± SD, $n = 3$)). siRNA loaded PLGA nanoparticles (siRNA PLGA NPs), siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (siRNA DOTAP-PLGA NPs), siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (siRNA PEI-PLGA NPs), Hyaluronic acid (HA) coated siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA DOTAP-PLGA NPs), HA-coated siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA PEI-PLGA NPs).

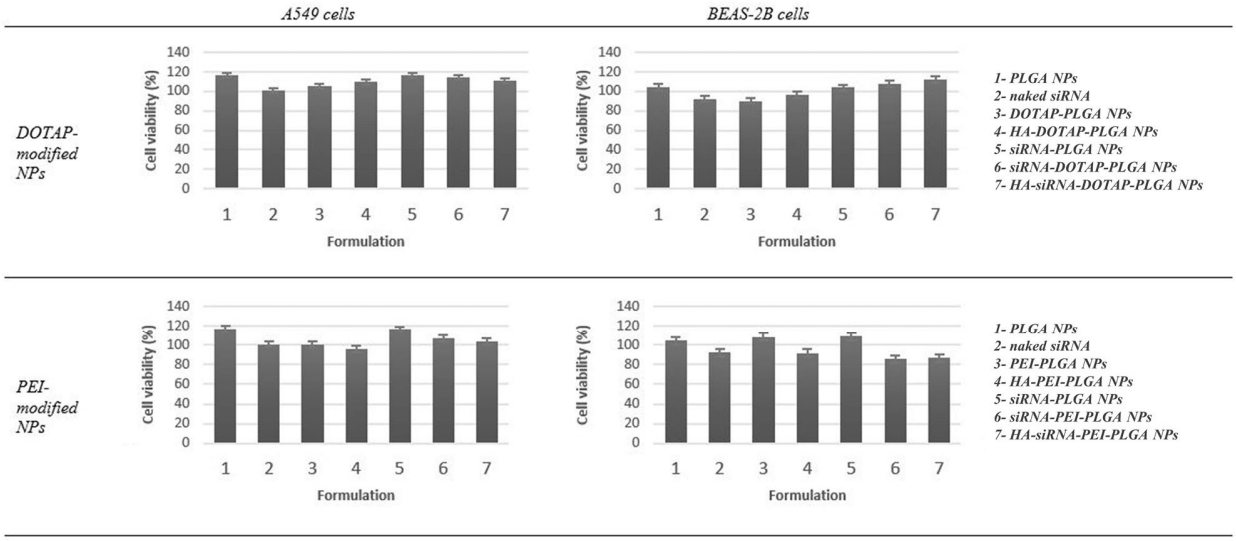


Figure 4. Cell viability of BEAS-2B and A549 cells after 72 h incubation with the DOTAP and PEI-modified blank and siRNA-loaded nanoparticles. Cell viability was determined using XTT assay after 72 h treatment with the nanoparticles. siRNA-loaded nanoparticles contained 100 nM of siRNA. (Results denote mean ± SD, $n = 5$). Poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (PLGA NPs), DOTAP modified PLGA nanoparticles (DOTAP-PLGA NPs), PEI modified PLGA nanoparticles (PEI-PLGA NPs), siRNA loaded PLGA nanoparticles (siRNA PLGA NPs), siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (siRNA DOTAP-PLGA NPs), siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (siRNA PEI-PLGA NPs), Hyaluronic acid (HA) coated siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA DOTAP-PLGA NPs), HA-coated siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA PEI-PLGA NPs).

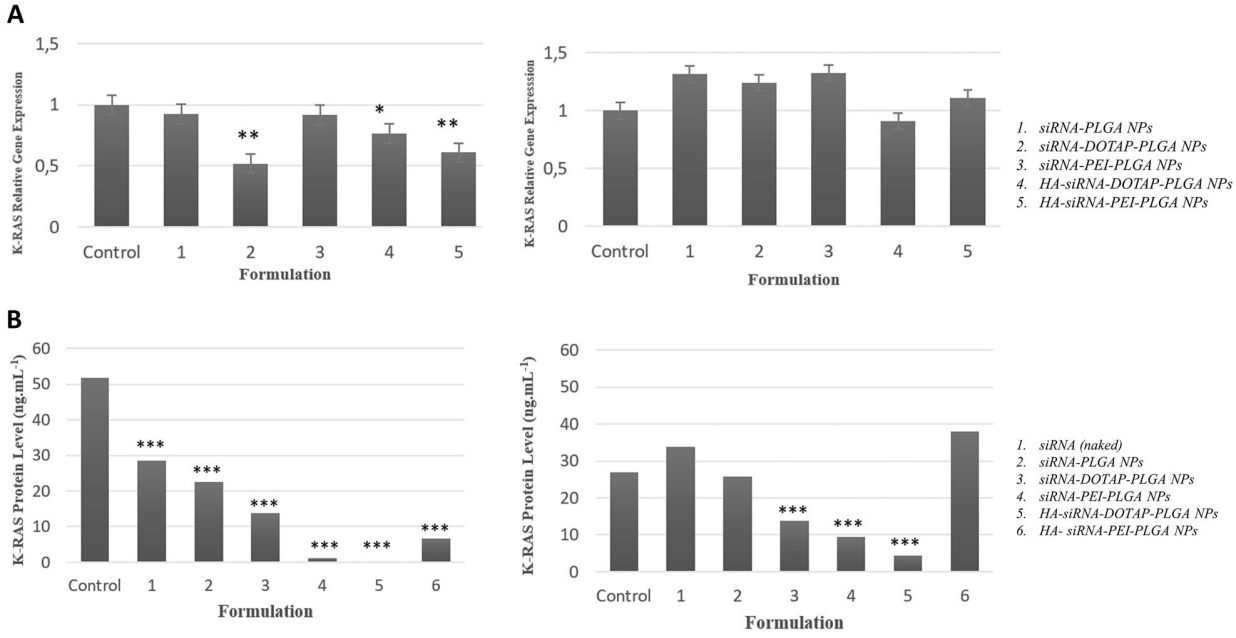


Figure 5. Relative gene expression changes of A549 (left) and BEAS-2B (right) cells were determined by RT-PCR after treatment with the siRNA-loaded nanoparticles for 72 h. GAPDH was used as internal control- housekeeping gene. The investigated gene was normalised by proportioning with GAPDH. ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$) (A). K-RAS protein levels in A549 (left) and BEAS-2B (right) cells were determined by ELISA after 72 h of the nanoparticle administration ($^{***}p < 0.001$) (B). (Results denote mean ± SD, $n = 6$). siRNA loaded PLGA nanoparticles (siRNA PLGA NPs), siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (siRNA DOTAP-PLGA NPs), siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (siRNA PEI-PLGA NPs), Hyaluronic acid (HA) coated siRNA loaded DOTAP modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA DOTAP-PLGA NPs), HA-coated siRNA loaded PEI modified PLGA nanoparticles (HA-siRNA PEI-PLGA NPs).

72 h are shown in Figure 3D. It was observed that the nanoparticles prepared with PEI released 80% of the siRNA in the first hour, while the nanoparticles prepared with DOTAP released 26% of the siRNA and sustained to release for 72 h.

3.4. In vitro *cytotoxicity studies*

Cell viabilities of A549 and BEAS-2B cells obtained by the XTT method after incubation with blank and siRNA-loaded formulations for 72 h are presented in Figure 4. The blank nanoparticles were found to have cytotoxic effects on neither cancer cells nor healthy lung cells. The viability of A549 and BEAS-2B cells remained 90–116% after 72 h of treatment with blank nanoparticles. The siRNA-loaded nanoparticles were also not found to be cytotoxic for both cells at 100 nM siRNA concentration (80–116% at 72 h). Results above 100% were not found statistically significant ($p > 0.05$).

3.5. *Evaluation of* in vitro *gene silencing activity*

Following the transfection with the formulations containing 100 nM K-RAS siRNA, the K-RAS gene expression levels of the cells are given in comparison with the reference gene (GAPDH) in Figure 5A. It was observed that the gene silencing efficiency was increased by modifying the siRNA-loaded PLGA nanoparticles (siRNA-PLGA NPs). The nanoparticles prepared with DOTAP (siRNA-DOTAP-PLGA NPs) showed very high efficiency, resulting in a reduction of nearly 50% in gene expression. After the HA surface modification, these nanoparticles (HA-siRNA-DOTAP-PLGA NPs) showed lower gene silencing efficiency (approx. 24%). On the other hand, surface modification with HA increases the transfection efficiency of the nanoparticles prepared with PEI (a decrease from 91% to 61% in gene expression). There was no significant decrease in gene expression level after administration of the same formulations to BEAS-2B cells.

K-RAS protein levels of the cells determined by ELISA at 72 h after transfection are given in Figure 5B. After 72 h of treatment with the nanoparticles containing 100 nM siRNA, a significant decrease in K-RAS protein level of A549 adenocarcinoma cells was observed for all formulations compared to non-treated control cells ($p < 0.001$). All formulations showed higher efficiency than naked siRNA. In addition, PEI and DOTAP-modified formulations showed a more effective decrease in the protein level compared to siRNA-PLGA NPs. In BEAS-2B cells, it was observed that siRNA-DOTAP-PLGA NPs, siRNA-PEI-PLGA NPs and HA-

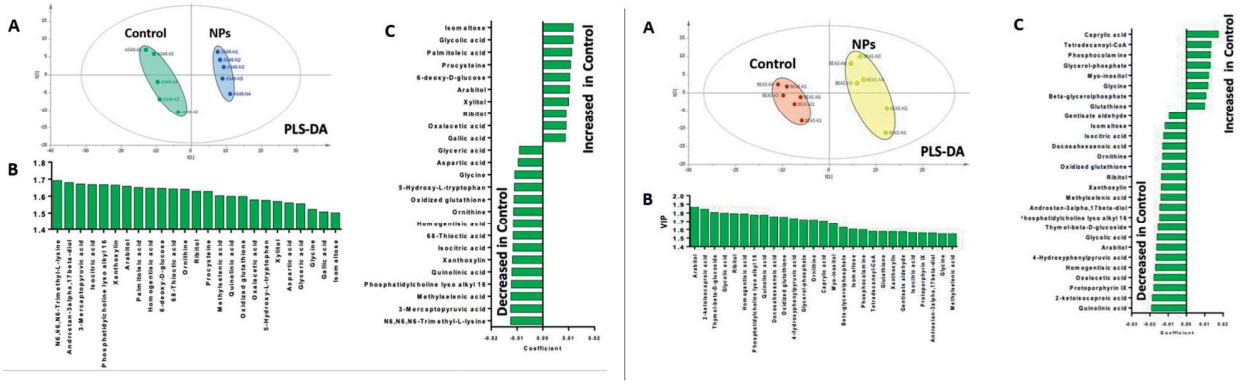


Figure 6. The effects of treatment on the metabolomic profile of A549 cell lines (left panel) and BEAS-2B cell lines (right panel). Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score plots (A), variable importance in projection (VIP) data graph for 25 metabolites with the highest differentiating effect on the metabolomic profiles (B), the regression coefficient plot indicating metabolite levels in the groups (C).

siRNA-DOTAP-PLGA NPs formulations caused a significant decrease in protein level ($p < 0.001$), while other formulations did not cause a significant change.

The expression level of K-RAS protein was also measured by the Western Blotting method after A549 and BEAS-2B cells were treated with HA-siRNA-PEI-PLGA NPs and shown in Figure 3C. It was observed that the K-RAS protein expression of A549 cells was reduced while the expression of BEAS-2B cells did not change compared to the controls.

3.6. Metabolomic evaluation

Two orthogonal analytical platforms were used for metabolomics analysis and a total of 272 metabolites were annotated The metabolomic profiles of the cell lines were visualised using principal component analysis (PCA), an unsupervised technique, in order to (unsupervised) to monitor any outlier or any systematic error and two outliers were removed from data set. In order to investigate the metabolomics profile differences between the groups in detail, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) (supervised) methods were performed (Figure 6). Variable importance in projection (VIP) graphs was also utilised in order to identify the metabolites affecting differentiation between groups (Figure 6B) and the coefficients graphs to show the relative changes of metabolite levels with treatment (Figure 6C). The R^2 and Q^2 values for PLS-DA models were 0.899 and 0.987 for A549, and 0.927 and 0.996 for BEAS cell lines, respectively. Significantly altered metabolites ($p < 0.05$) were determined using Student's unpaired t-test and applied for pathway analysis. Although the identified metabolites are related to many pathways, only the statistically significant ($p < 0.05$) pathways were evaluated. The significantly affected pathways were involved in amino acid biosynthesis metabolism, antioxidant defense, nutrient metabolism, and regulation of cellular events (gene expression, DNA and protein synthesis, cell proliferation and apoptosis).

4. Discussion

In this study, the preparation, and gene silencing activity of K-RAS siRNA-loaded PLGA nanoparticles were investigated. For many cancers, including lung cancer, the appropriate particle size range is 100–200 nm for selective and effective therapeutic gene or drug delivery to the target site (Arica and Lamprecht 2005, Budhian *et al.* 2007). In this study, the nanoparticles with 190–250 nm particle size (except HA-siRNA DOTAP-PLGA NPs, see Table 1) and below 0.16 PDI were obtained with the formulations prepared using DESE (w/o/w) with 2% polymer and 1% PVA. Nanoparticles prepared with PLGA have many advantages as gene delivery systems, however, delivering the siRNA by encapsulation and providing transfection through the cell membrane with a negative surface charge, requires the use of appropriate cationic agents during their preparation. In the literature, lipid and polymer structured materials have been used for this purpose. Thus, nanoparticles have been designed as more convenient systems for carrying genetic material (Kichler *et al.* 2001, Perez *et al.* 2001, Kumar 2007, Duan *et al.* 2009, Ragelle *et al.* 2014, Askarian *et al.* 2015, Masood 2016). To give cationic properties to PLGA nanoparticles (PLGA NPs) with a negative surface charge the nanoparticles were modified with a lipid (DOTAP) or a polymeric (PEI) material (DOTAP-PLGA NPs and PEI-PLGA NPs). PEI was used in lower amounts than DOTAP because of its higher

cationic potential and to avoid its high cytotoxicity. DOTAP-PLGA NPs and PEI-PLGA NPs have particles size smaller than 240 nm and zeta potential of 16.27 ± 3.37 mV and 19.03 ± 0.51 mV, respectively. After siRNA encapsulation, it was observed that the negative surface charge potential of nanoparticles that were not modified with cationic material (siRNA PLGA NPs) changed from -6.50 ± 0.68 mV to -12.27 ± 0.25 mV, while DOTAP and PEI-modified cationic nanoparticles (siRNA DOTAP-PLGA NPs and siRNA PEI-PLGA NPs) retain their positive charge even though the surface potentials have decreased slightly (Table 1). Particle size decreased after adding DOTAP or PEI to the formulation. This situation was previously explained by the fact that the cationic material added to the formulation acts as a surfactant and reduces the surface tension and/or the polymer becomes condensed by interacting with the cationic substance (Jensen *et al.* 2012). For all the nanoparticle formulations, the PDI, which is an important parameter of the particle size distribution and is an indication that nanoparticles are prepared with maximum homogeneity, is monodisperse, and there is no aggregation of nanoparticles if it is less than 0.1, was around 0.1 except one formulation (0.53 for HA-siRNA DOTAP-PLGA NPs, see Table 1) (Clayton *et al.* 2016). The surface potentials of the nanoparticles showed reduced cationic properties due to the negative charge of hyaluronic acid and were approximately neutral. According to the TEM image, no significant change was observed in shape and size between different formulations and modifications. The nanoparticles retained their spherical and smooth structure.

For investigating the modification of the nanoparticles FTIR and XPS analyzes were performed. When the FTIR spectra of nanoparticle components are examined, characteristically N-H stretching around 3270 cm^{-1}, N-H bending around 1590 cm^{-1} and C-N stretching in the range of 1350–1000 cm^{-1} are observed in the FTIR spectrum of PEI (Figure 1a) (Pillai *et al.* 2015). In the spectrum of DOTAP (Figure 1b), C-H stretching of the methylene groups at 2922 cm^{-1} and 2853 cm^{-1}, C = O stretching of the ester group at 1739 cm^{-1} and weak peaks of C-N asymmetric stretching originating from the trimethyl ammonium group around 1480 cm^{-1} are characteristically observed (Choosakoonkriang *et al.* 2001, Generosi *et al.* 2007). After modification with PEI (Figure 1), it is seen that there is no change in the intensity of the peak caused by the carbonyl stretching of PLGA nanoparticles, but there is an increase in the intensity of the carbonyl peak after modification with HA. The wide and weak peak observed around 3300 cm^{-1} in the PEI modified particles with is thought to be due to the N-H stretching. It is observed that the intensity of this peak increased after modification with HA. After modification with DOTAP (Figure 1), it is seen that the intensity carbonyl stretching peak at 1739 cm^{-1} of PLGA nanoparticles increased. After modification with HA, it is observed that it increased a little more. In addition, a wide O-H stretching peak at 3000–3500 cm^{-1} is seen in the spectra of the HA-modified nanoparticles. XPS is an advanced surface analysis technique used to obtain chemical information about the surfaces of solid materials. The method works by scattering photoelectrons using an X-Ray beam that stimulates solid samples. Comparing the nanoparticles with HA modification with the others, the oxygen (O) rate on the surface has increased for both formulations (Figure 2C,D). This result is thought to be due to the carboxyl and hydroxyl groups in HA. The results of both analyzes showed that HA modification was carried out successfully.

It was observed that the siRNA encapsulation efficiency of nanoparticles increased with the addition of a cationic substance to the formulation, and the cationic substance-modified nanoparticles encapsulated almost all the siRNA added to the formulations. This situation is a result of PLGA nanoparticles with negative zeta potential gaining cationic zeta potential after modification with DOTAP or PEI.

HA-siRNA-DOTAP-PLGA NPs showed a release profile for 24 h, but band formation was not observed in agarose gel electrophoresis for HA-siRNA-PEI-PLGA NPs. It is considered that the electrophoresis method is not sensitive enough to show the integrity of siRNA at these concentrations. It was determined that nanoparticles prepared with PEI release almost all the siRNA in the first hour with a burst release (Cun *et al.* 2011). It is known that surface-bound siRNA can cause the burst effect on drug release. This could be due to the fact that siRNA is not encapsulated in the nanoparticle but attached to the surface because of the higher cationic surface load of the nanoparticles prepared with PEI. The release observed after 24 h was caused by the encapsulated siRNA. DOTAP-modified nanoparticles were found to release siRNA for 72 h. One of the most important advantages of PLGA nanoparticles is that they provide sustained drug release. With the sustained release, it is aimed to keep siRNA effective for a longer period, which is sensitive to enzymatic degradation by serum nucleases, and to increase its very short half-life (5–60 min) due to its rapid clearance by the mononuclear phagocytic

system (Choi *et al.* 2014) However, too slow release can cause degradation of siRNA and reduce silencing efficiency (Díez *et al.* 2009, Jensen *et al.* 2012) Therefore, to optimise the release rate by modification of PLGA nanoparticles with cationic substances is important. It is observed that the formulations prepared in this study released all siRNA for three days. *In vitro* studies have shown that nanoparticles do not have a toxic effect on cells and have effective silencing efficiency during this period (72 h).

To evaluate the cytotoxic effect of the nanoparticles on lung cancer and healthy cells, a siRNA concentration of 100 nM, known to have gene silencing efficiency as a result of pre-transfection studies, was selected. Lakshmikuttyamma et al. achieved K-RAS silencing efficiency of around 30% with IgG-poloxamer-188 hybrid nanoparticles containing siRNA at 50 nM concentration but it could not provide an effect at the protein level. This was attributed to the insufficient administration concentration of siRNA. Although nanoparticles containing siRNA suppress the K-RAS gene, which is known to have a direct effect on proliferation in A549 cells, it did not cause a decrease in cell viability. It is due to the presence of non-mutant-wild type K-RAS in these cells as well as mutant K-RAS and the continuing expression of these genes (Lakshmikuttyamma *et al.* 2014). The nanoparticles modified with DOTAP and PEI, which are known to have toxic effects on cells, were found to have no toxic effects at application concentrations, and cell viability is close to 100% for both cells.

Following the transfection performed with the formulations containing 100 nM K-RAS siRNA, after 72 h, the K-RAS gene expression levels of the cells were compared with the reference gene and the results are presented as relative gene expression. When the gene expression changes in A549 cells were examined, it is seen that the siRNA-PLGA NPs formulation did not modify with the cationic substance causing a very slight decrease (about 8%) in the K-RAS gene expression. As a result of the low transfection of these nanoparticles into the cell due to their anionic surface potential (−12.27 mV), their efficacy is also expected to be low. The nanoparticles modified with DOTAP showed very high efficiency, resulting in a reduction of nearly 50% in gene expression. After modification with HA, it is thought that the cellular uptake is reduced due to the two-fold increase in the size of nanoparticles, and therefore, lower efficiency is achieved with the HA-siRNA-DOTAP-PLGA NPs formulation (approximately 24% reduction in gene expression level). On the other hand, surface modification with HA increased the transfection efficiency of the PEI-modified nanoparticles. In the previous studies, Gu et al. reported 70% K-RAS silencing efficiency with the layer-by-layer liposomal formulation at the end of three days and 50% K-RAS silencing efficiency at the end of five days, while Mehta et al. reported 53% K-RAS silencing efficiency with the bovine serum albumin-based nanoparticular systems (Gu *et al.* 2017, Mehta *et al.* 2019). Although Lakshmikuttyamma et al. achieved a 30% K-RAS silencing efficiency with the IgG-poloxamer-188 hybrid nanoparticles containing siRNA at 50 nM concentration, there was no change in the protein level, which was explained by the insufficient application concentration of siRNA (Lakshmikuttyamma *et al.* 2014). These studies revealed that parallel results in terms of gene silencing efficiency with the gene delivery systems were obtained. It is confirmed that the 100 nM concentration used as the application concentration in this study is suitable in terms of providing efficiency in cell culture *in vitro*. After administration of the same formulations to BEAS-2B cells, there was no significant decrease in the gene expression level ($p > 0.05$). The nanoparticles did not show a silencing effect on wild-type K-RAS, but only a specific effect on mutant K-RAS.

To evaluate the efficiency of siRNA-based therapeutic systems, it is necessary to measure the expression level of the protein expressed by this gene as well as the expression level of the target gene. After 72 h of treatment with nanoparticles containing 100 nM siRNA, the K-RAS protein level of A549 adenocarcinoma cells was significantly decreased for all formulations compared to the non-treated control cells ($p < 0.001$). In addition, all formulations showed higher efficiency than naked siRNA. These findings prove that nanoparticle formulations are successful in intracellular siRNA transfection. Also, the PEI and DOTAP-modified nanoparticles caused a more effective decrease in the protein level compared to siRNA-PLGA NPs. This confirms that the addition of PEI and DOTAP to the formulation increases transfection efficiency into the cell. In healthy lung cells, it is seen that siRNA-DOTAP-PLGA NPs, siRNA-PEI-PLGA NPs and HA-siRNA-DOTAP-PLGA NPs caused a significant decrease in protein level, while other formulations did not cause a significant change. Considering the effects of the five formulations on the K-RAS gene expression and protein levels and their cytotoxic effects on the cells, it was concluded that the most appropriate nanoparticle formulation was HA-siRNA-PEI-PLGA NPs. This formulation does not show a cytotoxic effect at the effective

concentration in terms of gene silencing, and the gene silencing effect is specific to A549 cancer cells at the gene expression and protein level. It is known that modification with HA increases cellular uptake by binding to the CD44 surface receptor overexpressed on the cell surface in cancer cells (Shen and Li 2018, Lu *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2019, Zou *et al.* 2019). The specific effect of siRNA-PEI-PLGA NPs on the lung cancer cells was significantly increased by HA modification. The silencing efficiency of HA-siRNA-PEI-PLGA NPs on K-RAS expression of A549 and BEAS-2B cells was also evaluated by Western Blotting. The results showed that this nanoparticle formulation could affect the K-RAS protein level of A549 cells after 72 h of transfection. These results also confirmed that the nanoparticles have a selective effect on cancer cells. Metabolomic studies were carried out with the most successful siRNA-loaded nanoparticle formulation to analyse and evaluate the changes that occur in cancer and healthy cells after application. Multivariate statistical analysis (PCA and PLS-DA) was used to reduce variations and visualise the complex metabolomics datasets. The PLS-DA score plots showed a clear separation between groups. High R^2 and Q^2 values indicate the robustness of the methods. The VIP and regression coefficient plots showed altered metabolites in group stratifications. Arabitol, glycolic acid, oxaloacetic acid and ribitol, glycine, and metabolites decreased in A549 cells and increased in BEAS cell lines after nanoparticle application. Arabitol is known to be changed in other cancers like esophageal and ovarian cancer (Fujigaki *et al.* 2018), glycolic acid is an important metabolite in the induction of reactive oxygen species (Chen *et al.* 2015), oxaloacetic acid is a limiting metabolite for proliferating cells which is an important factor in cancer progression (Gebregiworgis *et al.* 2017), ribitol is one of many potentially influential factors on matriglycan's cell proliferation and cancer progression (Lu *et al.* 2020), hyperactivation of serine/glycine biosynthetic pathway triggers oncogenesis which is highlighted by genetic and functional evidence (Amelio *et al.* 2014). As a result, following the application of HA-siRNA-PEI-PLGA nanoparticles, which were selected as the final formulation, to A549 and BEAS-2B cells it was observed that the cancer-associated metabolites decreased as expected. The final nanoparticle formulation was shown to decrease proliferation in lung cancer cells and increase proliferation in healthy cells.

5. Conclusion

In this study, HA-modified K-RAS siRNA-loaded PLGA nanoparticles were successfully formulated. The nanoparticles were obtained with optimum shape, size, and zeta potential. The nanoparticles didn't affect the cell viability of cancer and healthy lung cells after 72 h. Modification with the cationic agents increased the siRNA encapsulation, transfection, and silencing efficiency of the nanoparticles. There was a selective silencing of up to 50% in the expression of the K-RAS gene and more than 90% of K-RAS protein in K-RAS mutant lung cancer cells. The results of this study are thought to be promising in the effective treatment of lung cancer, one of the diseases with the highest mortality.

Disclosure statement

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests.

Funding

This work was supported by the Scientifıc and Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK) (Grant number: 1001-118S452). Ayse Gencer is supported by The Scientifıc and Technological Research Council of Turkey (grant number: TUBİTAK 2211-A).

References

Amelio, I., *et al.*, 2014. Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends in biochemical sciences*, 39, (4), 191–198.

Amer, M.H., 2014. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Molecular and cellular therapies*, 2, 27.

Arica, B., and Lamprecht, A., 2005. *In vitro* evaluation of betamethasone-loaded nanoparticles. *Drug development and industrial pharmacy*, 31, (1), 19–24.

Askarian, S., *et al.*, 2015. Cellular delivery of shRNA using aptamer-conjugated PLL-alkyl-PEI nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, biointerfaces*, 136, 355–364.

Baysal, I., *et al.*, 2017. Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier *in vitro*. *Journal of neural transmission*, 124, (1), 33–45.

Budhian, A., Siegel, S.J., and Winey, K.I., 2007. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *International journal of pharmaceutics*, 336, (2), 367–375.

Chen, H.H., *et al.*, 2015. The metabolome profiling and pathway analysis in metabolic healthy and abnormal obesity. *International journal of obesity*, 39, (8), 1241–1248.

Chen, J., *et al.*, 2016. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 3, 16023.

Cho, K., *et al.*, 2008. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research*, 14, (5), 1310–1316.

Choi, Y.S., *et al.*, 2014. Nanoparticles for gene delivery: therapeutic and toxic effects. *Molecular & cellular toxicology*, 10, (1), 1–8.

Choosakoonkriang, S., *et al.*, 2001. Infrared spectroscopic characterization of the interaction of cationic lipids with plasmid DNA. *The journal of biological chemistry*, 276, (11), 8037–8043.

Clayton, K.N., *et al.*, 2016. Physical characterization of nanoparticle size and surface modification using particle scattering diffusometry. *Biomicrofluidics*, 10, (5), 054107.

Colombo, S., *et al.*, 2015. Mechanistic profiling of the siRNA delivery dynamics of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Journal of controlled release*, 201, 22–31.

Cross, D., and Burmester, J.K., 2006. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clinical medicine & research*, 4, (3), 218–227.

Cun, D., *et al.*, 2011. High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 77, (1), 26–35.

Del Re, M., *et al.*, 2018. Implications of KRAS mutations in acquired resistance to treatment in NSCLC. *Oncotarget*, 9, (5), 6630–6643.

Devi, G.R., 2006. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer gene therapy*, 13, (9), 819–829.

Díez, S., Navarro, G., and De, I., 2009. *In vivo* targeted gene delivery by cationic nanoparticles for treatment of hepatocellular carcinoma. *The journal of gene medicine*, 11, (1), 38–45.

Duan, J., *et al.*, 2009. Cationic polybutyl cyanoacrylate nanoparticles for DNA delivery. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2009, 149254.

Eylem, C.C., *et al.*, 2020. Untargeted multi-omic analysis of colorectal cancer-specific exosomes reveals joint pathways of colorectal cancer in both clinical samples and cell culture. *Cancer letters*, 469, 186–194.

Ferlay, J., Laversanne, M., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., Bray, F. 2020. Global cancer observatory: cancer tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: https://gco.iarc.fr/tomorrow, [Accessed 18 Feb 2022].

Fujigaki, S., *et al.*, 2018. Identification of serum biomarkers of chemoradiosensitivity in esophageal cancer via the targeted metabolomics approach. *Biomarkers in medicine*, 12, (8), 827–840.

Gebregiworgis, T., *et al.*, 2017. Glucose limitation alters glutamine metabolism in MUC1-overexpressing pancreatic cancer cells. *Journal of proteome research*, 16, (10), 3536–3546.

Gencer, A., *et al.*, 2021. Recent advances in treatment of lung cancer: nanoparticle-based drug and siRNA delivery systems. *Current drug delivery*, 18, (2), 103–120.

Generosi, J., *et al.*, 2007. Characterization of solid supported lipoplexes by FTIR microspectroscopy. *Infrared physics & technology*, 50, (1), 14–20.

Gu, L., *et al.*, 2017. A combination RNAi-chemotherapy layer-by-layer nanoparticle for systemic targeting of KRAS/P53 with cisplatin to treat non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research*, 23, (23), 7312–7323.

Haley, B., and Frenkel, E., 2008. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic oncology*, 26, (1), 57–64.

Harguindey, A., *et al.*, 2017. Synthesis and assembly of click-nucleic-acid-containing PEG-PLGA nanoparticles for DNA delivery. *Advanced materials*, 29, (24), 1700743.

Heng, H.H., *et al.*, 2010. The evolutionary mechanism of cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 109, (6), 1072–1084.

Jensen, D.K., *et al.*, 2012. Design of an inhalable dry powder formulation of DOTAP-modified PLGA nanoparticles loaded with siRNA. *Journal of controlled release*, 157, (1), 141–148.

Kichler, A., *et al.*, 2001. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *The journal of gene medicine*, 3, (2), 135–144.

Kopp, F., Wagner, E., and Roidl, A., 2014. The proto-oncogene KRAS is targeted by miR-200c. *Oncotarget*, 5, (1), 185–195.

Kumar, C. S., 2007. *Nanomaterials for medical diagnosis and therapy*. Weinheim: John Wiley & Sons.

Lakshmikuttyamma, A., *et al.*, 2014. Stable and efficient transfection of siRNA for mutated KRAS silencing using novel hybrid nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 11, (12), 4415–4424.

Lee, P.Y., *et al.*, 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments*, 5,(3), 180–183.

Lemjabbar-Alaoui, H., *et al.*, 2015. Lung cancer: biology and treatment options. *Biochimica et biophysica acta*, 1856, (2), 189–210.

Li, Y., *et al.*, 2016. Co-delivery of siRNA and hypericin into cancer cells by hyaluronic acid modified PLGA-PEI nanoparticles. *Drug development and industrial pharmacy*, 42, (5), 737–746.

Liu, L., *et al.*, 2016. Hyaluronic acid-modified cationic lipid-PLGA hybrid nanoparticles as a nanovaccine induce robust humoral and cellular immune responses. *ACS applied materials & interfaces*, 8, (19), 11969–11979.

Lu, G., *et al.*, 2019. Improving lung cancer treatment: hyaluronic acid-modified and glutathione-responsive amphiphilic TPGS-doxorubicin prodrug-entrapped nanoparticles. *Oncology reports*, 42, (1), 361–369.

Lu, P.J., *et al.*, 2020. Ribitol enhances matriglycan of α-dystroglycan in breast cancer cells without affecting cell growth. *Scientific reports*, 10, (1), 4935.

Ma, Z., *et al.*, 2015. MiR-181a-5p inhibits cell proliferation and migration by targeting Kras in non-small cell lung cancer A549 cells. *Acta biochimica et biophysica sinica*, 47, (8), 630–638.

Mansoori, B., Sandoghchian Shotorbani, S., and Baradaran, B., 2014. RNA interference and its role in cancer therapy. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4, (4), 313–321.

Masood, F., 2016. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials science & engineering. C, materials for biological applications*, 60, 569–578.

Mehta, A., *et al.*, 2019. Targeting KRAS mutant lung cancer cells with siRNA-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 36, (9), 133.

Nemutlu, E., *et al.*, 2019. Metabolic infrastructure of pregnant women with trisomy 21 fetuses; metabolomic analysis.

Zeitschrift für geburtshilfe und neonatologie, 223, (05), 297–303.

Özgüroğlu, M., 2003. Drug resistance in lung cancer. *Eurasian journal of pulmonology*, 5, 180–183.

Patil, Y., and Panyam, J., 2009. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *International journal of pharmaceutics*, 367, (1–2), 195–203.

Perez, C., *et al.*, 2001. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *Journal of controlled release*, 75, (1–2), 211–224.

Pillai, G.J., Greeshma, M.M., and Menon, D., 2015. Impact of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle surface charge on protein, cellular and haematological interactions. *Colloids and surfaces. B, biointerfaces*, 136, 1058–1066.

Ragelle, H., *et al.*, 2014. Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: optimizing formulation to increase stability and efficiency. *Journal of controlled release*, 176, 54–63.

Ramalingam, S.S., Owonikoko, T.K., and Khuri, F.R., 2011. Lung cancer: new biological insights and recent therapeutic advances. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61, (2), 91–112.

Rao, D.D., *et al.*, 2013. RNA interference and personalized cancer therapy. *Discovery medicine*, 15, (81), 101–110.

Shen, Y., and Li, W., 2018. HA/HSA co-modified erlotinib-albumin nanoparticles for lung cancer treatment. *Drug design, development and therapy*, 12, 2285–2292.

Song, M.S., and Rossi, J.J., 2017. Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *The biochemical journal*, 474, (10), 1603–1618.

Sonke, J.-J., and Belderbos, J., 2010. Adaptive radiotherapy for lung cancered. *Seminars in radiation oncology*, 20, (2), 94–106.

Sundar, R., *et al.*, 2014. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung cancer*, 85, (2), 101–109.

Toloza, E.M., Morse, M.A., and Lyerly, H.K., 2006. Gene therapy for lung cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 99, (1), 1–22.

Westcott, P.M., and To, M.D., 2013. The genetics and biology of KRAS in lung cancer. *Chinese journal of cancer*, 32, (2), 63–70.

Yuan, T.L., *et al.*, 2014. Development of siRNA payloads to target KRAS-mutant cancer. *Cancer discovery*, 4, (10), 1182–1197.

Zhang, W., *et al.*, 2019. Antitumor effect of hyaluronic-acid-modified chitosan nanoparticles loaded with siRNA for targeted therapy for non-small cell lung cancer. *International journal of nanomedicine*, 14, 5287–5301.

Zou, J., *et al.*, 2019. Hyaluronic acid-modified selenium nanoparticles for enhancing the therapeutic efficacy of paclitaxel in lung cancer therapy. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47, (1), 3456–3464.

9. ÖZGEÇMİŞ

BİLİMSEL FAALİYETLER

Yayınlar:

1. Gencer A, Akgeyik E, Kaynak, MS, Celebier M, Berkman, MS, Sahin S. Assessment of Pharmaceutical Quality and Release Kinetics of Metoprolol Tartrate Extended Release Tablets Avaıiable in Turkish Drug Market. Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji. 2020, 179-189
2. Gencer A, Duraloglu C, Ozbay S, Ciftci TT, Yabanoglu-Ciftci S, Arica B. Recent Advances in Treatment of Lung Cancer: Nanoparticle-Based Drug and siRNA Delivery Systems. Curr Drug Deliv. 2020, 18, 103-120.
3. Baysal I, Ozcelikay G, Yabanoglu-Ciftci S, Ucar BI, Gencer A, Arica-Yegin B. Nanoparticles and Nanostructured Films with TGF-β3: Preparation, Characterization, and Efficacy. AAPS PharmSciTech. 2021, 22(6), 1-10.
4. Cetik RM, Yabanoglu-Ciftci S, Arica B, Baysal I, Akarca-Dizakar SO, Erbay FK, Gencer A, Demir T, Ayvaz M. Evaluation of the Effects of Transforming Growth Factor–Beta 3 (TGF-β3) Loaded Nanoparticles on Healing in a Rat