

**KANSER TEDAVİSİNDE GEN SUSTURULMASI İÇİN
HYALÜRONİK ASİT-POLİETİLENİMİN TAŞIYICI
SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF HYALURONIC ACID-
POLYETHYLENIMINE DELIVERY SYSTEM FOR GENE
SILENCING IN CANCER TREATMENT**

BESTE ÇAĞDAŞ TUNALI

DOÇ. DR. EDA ÇELİK AKDUR

Tez Danışmanı

PROF. DR. MUSTAFA TÜRK

Tez Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

BESTE ÇAĞDAŞ TUNALI'nın hazırladığı “**Kanser Tedavisinde Gen Susturulması için Hyalüronik Asit-Polietilenimin Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Işık YULUĞ

Başkan



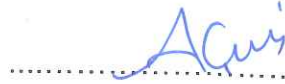
Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Danışman



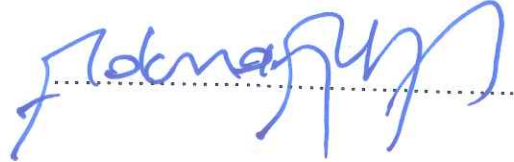
Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN

Üye



Prof. Dr. Lokman UZUN

Üye



Doç. Dr. Halil Murat AYDIN

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak / / tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Hayatımın her anında, aldığım tüm kararlarda beni her zaman destekleyen
değerli aileme...



ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak

hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25 / 06 / 2019

BESTE ÇAĞDAŞ TUNALI



YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI 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 kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak 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.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

25 / 06 / 2019

 (İmza)
BESTE ÇAĞDAŞ TUNALI

ÖZET

KANSER TEDAVİSİNDE GEN SUSTURULMASI İÇİN HYALÜRONİK ASİT- POLİETİLENİMİN TAŞIYICI SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Beste ÇAĞDAŞ TUNALI

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Tez Eş Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Haziran 2019, 136 sayfa

Kanser tedavisinde kısa engelleyici siRNA'ların hedefe spesifik taşınımı günümüzün önde gelen araştırma konularından birisidir. Sunulan tez çalışması kapsamında siRNA'ların hyalüronik asit (HA) reseptörü aracılığı ile etkili bir şekilde taşınımı, biyobozunur HA ve düşük molekül ağırlıklı polietilenimin (PEI) temelli taşıma sistemleri ile gerçekleştirilmiştir. Yine bu tez çalışması kapsamında literatürde ilk defa, fototermal yanıt verebilme yeteneğindeki, inorganik temelli nanotaşıyıcılardan olan altın nanoparçacıkların ve bunların PEI ve HA ile yapmış olduğu konjugatların, bunlara ilaveten yapıya kemoterapötik ajan olarak kullanılan Doksorubisinin de ilave edilmesi ile oluşturulan nihai parçacıkların (AuPEI-HA-DOX) birçok kanser türünde aşırı eksprese olduğu kanıtlanmış CXCR4 reseptörlerine özgü siRNA'lar ile kompleks oluşturması ile, sonuçta bu tezin en önemli özelliklerinden biri olan gen susturma, fototermal terapi ve kemoterapinin kombinasyonu sağlanmıştır. Kanserinin etkin bir şekilde hedeflenmesi ve kombine terapisi amacıyla tez çalışmasında ilk olarak PEI ve HA temelli siRNA taşıyıcı sistemleri sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları

yapılmıştır. Sentezlenen parçacıkların boyutları, PEI-HA, PEI-SS-HA, AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX için sırasıyla, 330 nm, 203 nm, 91 nm, 25 nm, 366 nm ve 692 nm olarak tespit edilmiştir. Konjugatların oluşumu ise ¹H-NMR, FT-IR ve elementel analiz yöntemleri ile doğrulanmıştır. Sentezlenen konjugatların siRNA ile elektrostatik etkileşimi ise konjugat yüzey yükü değişimi ve jelde gecikme analizi ile belirlenmiştir. Daha sonra, konjugatların hedef hücrelerin (L929 fare fibroblast hücre hattı, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ve CAPAN-1 pankreas kanseri hücre hattı) canlılığına etkileri WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmiş; tüm parçalar için (AuPEI NP hariç), 100 µg/mL konsantrasyonunda, hücre canlılığı %50'nin üzerinde bulunmuştur. Bu konjugatların (özellikle Au içeren) siRNA ile oluşturdukları komplekslerin ardından uygulanan radyasyonun, özellikle MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkiyi arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Konjugatların apoptotik-nekrotik etkilerine ise ikili boyama yöntemi ile bakılmış, her üç hücre hattında genel olarak apoptotik etki düşük bulunmuştur. Nekrotik etki ise, AuPEI-HA-DOX konjugatı uygulaması sonrasında (sırasıyla, %50 ve %25), hem MDA-MB-231 hem de CAPAN-1 hücre hattında en yüksek seviyede görülmüştür. Konjugat/siRNA komplekslerinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri RTCA hücre proliferasyon analizi ile araştırılmış, L929 hücre hattında antiproliferatif etki görülmezken, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücre hatlarında en yüksek antiproliferatif etki PEI-HA/siRNA, PEI-SS-HA/siRNA, AuPEI NP/siRNA ve AuPEI-HA-DOX/siRNA komplekslerinin uygulaması sonrasında görülmüştür. Hazırlanan komplekslerin kanser hücre hatlarında hedef gen ifadenmesini baskılama etkileri Real Time- PCR yöntemi ile araştırılmış, MDA-MB-231 hücre hattında tüm konjugat veya komplekslerin, CAPAN-1 hücre hattında ise, AuPEI NP/siRNA kompleksinin hedef CXCR4 geni ifadenmesini baskılayabildiği saptanmıştır. Elde edilen tüm bu veriler, sentezlenen PEI-HA ve AuPEI-HA-DOX konjugatlarının özellikle meme kanseri tedavisinde etkili siRNA taşıyıcıları olarak kullanılabileceklerini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Polietilenimin, Hyalüronik Asit, siRNA, Meme kanseri, Pankreas Kanseri, Gen Terapisi, CXCR4

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF HYALURONIC ACID-POLYETHYLENEIMINE DELIVERY SYSTEM FOR GENE SILENCING IN CANCER TREATMENT

Beste ÇAĞDAŞ TUNALI

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Co- Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

June 2019, 136 pages

Target-specific delivery of small interfering siRNAs in cancer treatment is one of today's leading research topics. Within the scope of the thesis, effective transport of siRNAs via hyaluronic acid (HA) receptor was carried out with biodegradable HA and low molecular weight polyethyleneimine (PEI) based transport systems. Within the thesis study, gold nanoparticles which are inorganic based nanoparticles capable of giving photothermal response and their conjugates with PEI and HA are added to the structure, which is first in the literature. As a consequence, a combination of gene silencing, photothermal therapy and chemotherapy, which is one of the most important features of this thesis, has been provided. In the first part of the thesis study, PEI and HA-based siRNA delivery systems were synthesized and characterized. The dimensions of the PEI-HA, PEI-SS-HA, AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA and AuPEI-HA-DOX particles were measured as, 330 nm, 203 nm, 91 nm, 25 nm, 366 nm and 692 nm,

respectively. The formation of conjugates was confirmed by $^1\text{H-NMR}$, FT-IR and elemental analysis methods. The electrostatic interaction of the synthesized conjugates with siRNA was determined by the gel retardation analysis and the change in zeta potentials. In the second part of the study, effects of the conjugates on the viability of target cells (L929 mouse fibroblast cell line, MDA-MB-231 breast cancer cell line and CAPAN-1 pancreatic cancer cell line) were determined by the WST-1 cell viability test; in general (except AuPEI NP) the cell viability was above 50% when the synthesized particles (100 $\mu\text{g/mL}$) were applied. In the application of radiation following the conjugate/siRNA complex (especially those containing Au), application increased the cytotoxic effect on the MDA-MB-231 cell line. Apoptotic-necrotic effects of conjugates were investigated by double staining method, and overall apoptotic effect was low in all three cell lines. However, the necrotic effect was highest in both MDA-MB-231 and CAPAN-1 cell lines, after administration of the AuPEI-HA-DOX conjugates (50% and 25%, respectively). The effects of the complexes of the synthesized conjugates and siRNA on the cell proliferation were also investigated by RTCA real-time cell proliferation analysis. Antiproliferative effect was not observed in L929 cell line in accordance with cytotoxicity results, whereas the highest antiproliferative effects in MDA-MB-231 and CAPAN-1 cell lines were observed after administration of PEI-HA/siRNA, PEI-SS-HA/siRNA, AuPEI NP/siRNA and AuPEI-HA-DOX/siRNA complexes. The effects of suppression of target gene expression in cancer cell lines were investigated by Real Time-PCR method. All conjugates or complexes in MDA-MB-231 cell line were able to suppress target gene expression of AuPEI NP/siRNA complex in CAPAN-1 cell line. It was found that all conjugates or complexes in the MDA-MB-231 cell line, AuPEI NP/siRNA complex in the CAPAN-1 cell line could suppress the target CXCR4 gene expression. All these data show that the synthesized PEI-HA and AuPEI-HA-DOX conjugates can be used as siRNA carriers that are particularly effective, especially in the treatment of breast cancer.

Keywords: Polyethylenimine, Hyaluronic acid, siRNA, Breast cancer, Pancreatic cancer, Gene Therapy, CXCR4

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, tüm çalışmalarım boyunca benim için değerli zamanından vakit ayırıp, bu çalışmanın ortaya çıkmasında bana yardımcı olan, bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez danışmanlarımdan değerli hocam sayın Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR'a,

Doktora tezi olarak hazırladığım bu çalışmanın fikir sahibi olan; günlerce, yaptığım çalışmaların tüm aşamalarını bizzat kontrol edip, görüşlerini benimle paylaşarak her seferinde daha iyi sonuçları almama yardımcı olan, tez eş danışmanım değerli hocam sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e,

Yapmış olduğum tez çalışmasının her aşamasında, bilgi ve tecrübeleriyle verdikleri destekten ötürü, Tez İzleme Komitesi'ndeki değerli hocalarım Doç. Dr. Halil Murat AYDIN ve Doç. Dr. Işık YULUĞ'a,

Bütün bu süreç boyunca, başım sıkıştığında her zaman bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini hiçbir karşılık beklemeden paylaşan sevgili hocalarım; Sayın Prof. Dr. Lokman UZUN, Prof. Dr. Ayten ÇELEBİ KESKİN, Dr. Öğretim Üyesi Murat İNAL ve Dr. Öğretim Üyesi Ömer AKTÜRK ve Dr. Öğretim Üyesi F. Azize Budak YILDIRAN'a,

Önceliklerini her zaman benim önceliklerime göre değiştiren ve bunun karşılığını hiçbir zaman tam olarak veremeyeceğim sevgili aileme, bana en depresif olduğum anlarda yaşam enerjisi veren, içimi ısıtmak için tek bir gülücükleri yeten canım yeğenlerim İlke-Bilge ÇAĞDAŞ kardeşlere ve bu zorlu sürecimde bana en güzel mutluluğu yaşatan canım oğlum Asrın Meriç'e,

Yüksek lisans ve doktora eğitimim süresince, maddi ve manevi desteğini her zaman yanı başımda hissettiğim, minnettarlığımı burada ifade etmemin sanırım mümkün olmadığı biricik arkadaşım ve değerli eşim Doğan TUNALI'ya,

Sonsuz teşekkür ediyor, saygı ve sevgilerimi yolluyorum.

Beste ÇAĞDAŞ TUNALI, Haziran, 2019

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kanser Türleri	5
2.1.2. Kanserin Nedenleri ve Gelişimi	6
2.1.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	7
2.1.4. Kanser Tedavisinde Uygulanan Yöntemler	9
2.2. Gen Terapi	12
2.2.1. Gen Susturma Stratejileri	14
2.2.2. Kanser Tedavisinde RNA İnterferansın Rolü	18
2.2.2.1. Terapötik Uygulamalar	19
2.2.2.2. RNA İnterferans Moleküllerinin Taşınımında Kullanılan Nanoparçacıklar	20
2.3. C-X-C Kemokin Reseptör 4	26
2.3.1. CXCR4/CXCL12 Sinyal Yolağı	27
2.3.2. CXCR4'ün Kanser ve Kanser Metastazında Rolü	27
2.3.3. CXCR4 Geninin Susturulması	31
3. DENEYSEL YÖNTEMLER VE MALZEMELER	33
3.1. MALZEMELER	33
3.1.1. Sentetik siRNA	33
3.1.2. Kullanılan Primerler	33

3.1.3. Kullanılan Hücre Hatları	34
3.1.3.1. L929 (Fare Fibroblast Hücre Hattı)	34
3.1.3.2. MDA-MB-231 (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	34
3.1.3.3. CAPAN-1 (İnsan Pankreas Kanseri Hücre Hattı)	34
3.1.4. Kimyasallar ve Çözeltiler	35
3.2. DENEYSEL YÖNTEMLER	36
3.2.1. Polietilenimin Temelli Non-Viral Taşıyıcıların Sentezi	36
3.2.1.1. Polietilenimin-Hyalüronik Asit Konjugatlarının Sentezi Optimizasyon Çalışmaları	36
3.2.1.1.1. PEI-HA Konjugatlarının Oluşturulmasında Oran Optimizasyon Çalışması	37
3.2.1.1.2. PEI-HA Konjugatlarının Oluşturulmasında Yöntem Optimizasyon Çalışması	37
3.2.1.1.3. Partikül Boyut Dağılımının Azaltılması ve HA'nın Reaksiyon Ortamında Kendiliğinden Parçacık Oluşturmasının İncelenmesi	38
3.2.1.1.4. Biyobozunur PEI-SS-HA Konjugatların Oluşturulması	39
3.2.1.2. Dokсорubisin ile Etkileştirilen Altın-Polietilenimin-Hyalüronik Asit Konjugatların Sentezi	40
3.2.1.2.1. AuPEI NP'lerin Lazer Ablasyon Tekniği İle Sentezi	40
3.2.1.2.2. AuPEI-HA-DOX Konjugatlarının Sentezi	41
3.2.2. Sentezlenen Konjugatların Karakterizasyonu	42
3.2.2.1. Sentezlenen Konjugatların Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi	42
3.2.2.2. Sentezlenen Konjugatların Partikül Büyüklüğü Değerlerinin Ölçülmesi	42
3.2.2.3. Sentezlenen Konjugatların Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesi	42
3.2.2.4. UV-VİS Spektroskopi Analizi	42
3.2.2.5. ¹ H-NMR Analizi	43
3.2.2.6. FT-IR Spektrumu Analizi	43
3.2.2.7. Elementel Analiz	43
3.2.3. Sentezlenen Konjugattan Dokсорubisinin Salımı Çalışması	43
3.2.4. Sentezlenen Konjugatların siRNA ile Etkileşiminin Belirlenmesi	44
3.2.4.1. Jelde Gecikme Analizi	44

3.2.4.2. Dinamik Işık Saçılımı	44
3.2.5. <i>In vitro</i> Transfeksiyon Çalışmaları.....	45
3.2.5.1. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Hücresel Alımının Değerlendirilmesi	45
3.2.5.2. Sentezlenen Konjugatların Farklı Hücre Hatları (L929, MDA-MB-231, CAPAN-1) Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	45
3.2.5.3. Sentezlenen Konjugatların Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi	47
3.2.5.4. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Proliferatif Etkisinin İncelenmesi.....	48
3.2.5.5. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Farklı Hücre Hatlarındaki Hedef Gen İfadelenmesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	49
3.2.5.5.1. Hücrelerin Hazırlanan Konjugat/siRNA Kompleksler ile Muamelesi	49
3.2.5.5.2. RNA İzolasyonu	50
3.2.5.5.3. cDNA Sentezi.....	51
3.2.5.5.4. Rölatif Kantitatif Real Time PCR Çalışması.....	53
3.2.6. İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	55
4.1. PEI Temelli Non-viral Taşıyıcıların Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	55
4.1.1. Polietilenimin-Hyalüronik Asit Konjugatlarının Sentezinde Optimizasyon Çalışmaları Sonuçları.....	55
4.1.2. Sentezlenen Biyobozunur PEI-SS-HA Konjugatların Karakterizasyonu	62
4.1.3. Lazer Ablasyon Tekniği Kullanılarak Sentezlenen AuPEI-HA-DOX Konjugatlarının Karakterizasyonu	64
4.1.3.1. AuPEI NP'lerin Zeta Sizer ile Analizi.....	64
4.1.3.2. Sentezlenen AuPEI-HA-DOX Konjugatların Zeta Sizer ile Analizi	65
4.2. Sentezlenen Parçacıkların Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	68
4.2.1. Sentezlenen Parçacıkların UV-Vis Spektroskopi ile Analizi.....	68
4.2.2. ¹ H-NMR Analizi.....	69

4.2.3. FT-IR Spektrumu Analizi	72
4.2.4. Elementel Analiz	75
4.3. Sentezlenen Konjugattan Doksorubisinin <i>In Vitro</i> Salımı	76
4.4. Sentezlenen Konjugatların siRNA İle Etkileşiminin Belirlenmesi	77
4.4.1. Jelde Gecikme Analizi	77
4.4.2. Dinamik Işık Saçılımı	78
4.5. <i>In vitro</i> Transfeksiyon Sonuçları	79
4.5.1. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Hücresel Alımının Değerlendirilmesi	79
4.5.2. Sentezlenen Konjugatların Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	80
4.5.3. Sentezlenen Konjugatların Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi	88
4.5.4. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Proliferatif Etkinin İncelenmesi	96
4.5.5. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Farklı Hücre Hatlarındaki Hedef Gen İfadelenmesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi	98
5. SONUÇLAR	102
6. KAYNAKLAR	107
EKLER	131
EK 1- Tezden Türetilmiş Yayınlar	131
EK 2- Tezden Türetilmiş Bildiriler	132
EK 3- Tez Çalışması Orjinallik Raporu	133
ÖZGEÇMİŞ	134

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.Proto-onkogenlerce kodlanan proteinlerin şematik gösterimi..	11
Şekil 2.2.siRNA'nın dolaşımı ve RNAi'nin <i>in vivo</i> biyolojik mekanizması.....	17
Şekil 3.1.PEI-HA konjugatları oluşturulmasında etkinliği araştırılan yöntemler .	38
Şekil 3.2.Lazer ablasyon tekniği ile AuNP ve AuPEI Np'lerin sentezi	41
Şekil 4.1.Konjugat sentezinde elde edilen reaksiyon karışımları.	55
Şekil 4.2.Elde edilen örneklere HA ve PEI:HA örneklerine ait boyut analiz sonuçları bar grafiği	60
Şekil 4.3.Sentezlenen PEI:HA konjugatlarının karakterizasyonu.	61
Şekil 4.4.PEI-SS-HA konjugatlarının zamana bağlı parçacık boyut dağılımı.....	62
Şekil 4.5.PEI-SS-HA konjugatının SEM görüntüsü (A) ve parçacık boyut dağılım histogramı (B)	63
Şekil 4.6.Lazer ablasyon tekniği ile sentezlenen AuPEI Np'lerin sentez ortamı görünümü	65
Şekil 4.7.Sentezlenen parçacıkların deiyonize suda zeta potansiyel analizi.	67
Şekil 4.8.Sentezlenen AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA-DOX parçacıklarına ve Doksorubisine (40 µg/mL) ait absorpsiyon spektrumu	69
Şekil 4.9.Sentezlenen konjugatların ¹ H-NMR spektrumları (0-16 ppm).....	70
Şekil 4.10.Sentezlenen konjugatların ¹ H-NMR spektrumları (0-13 ppm).....	72
Şekil 4.11.Sentezlenen konjugatların FT-IR spektrumları.	74
Şekil 4.12.Doksorubisinin AuPEI-HA-DOX konjugatından farklı pH'larda (pH 5,4 ve 7,4), 37°C'de zamana bağlı kümülatif salımı	76
Şekil 4.13.Sentezlenen PEI-SS-HA konjugatların pH 5,0 ve 7,0'de siRNA ile etkileşiminin karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.14.Sentezlenen parçacıkların üç farklı pH'da (5, 7, 9) siRNA ile etkileşimi.	78
Şekil 4.15.PEI-SS-HA/siRNA kompleksinin artan parçacık oranlarında ζ potansiyeli karakteristiği	79
Şekil 4.16.Konjugat/FAM siRNA komplekslerinin hücresel alımı	81
Şekil 4.17.Sentezlenen parçacıkların uygulandığı (24 st.) L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerin canlılıklarının karşılaştırılması.....	85

Şekil 4.18.Parçacık uygulanan ve parçacık-siRNA kompleksleri uygulamasına ilaveten radyasyon terapisi uygulanan hücrelerin hücre canlılıklarının karşılaştırılması.....	87
Şekil 4.19.24 Saatlik uygulama sonrası hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri	88
Şekil 4.20.İkili boyama yöntemi ile apoptotik L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerinin gösterilmesi.....	90
Şekil 4.21.İkili boyama yöntemi ile nekrotik L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerinin gösterilmesi.....	91
Şekil 4.22.Parçacık uygulanan (A) ve parçacık-siRNA kompleksleri uygulamasına ilaveten radyasyon terapisi uygulanan (B) hücreler üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerin karşılaştırılması.	95
Şekil 4.23.L929, CAPAN-1 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına uygulanan parçacık: siRNA komplekslerinin (100 µg/mL: 25 nM) hücre proliferasyonuna etkisi	97
Şekil 4.24.Sentezlenen konjugat ve konjugat/siRNA komplekslerinin hedef gen CXCR4 ifadenmesi üzerindeki etkileri.....	99
Şekil 4.25.Sentezlenen konjugat ve konjugat/siRNA komplekslerinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinde rölatif CXCR4 mRNA seviyesi	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser	5
Çizelge 2.2.siRNA taşınımında kullanılan çeşitli nanoparçacıkların avantaj ve dezavantajları.....	21
Çizelge 2.3.CXCR4 hedefli ilaç dağıtım sistemlerine örnekler	29
Çizelge 3.1.Tez çalışmasında kullanılan siRNA’lar.....	33
Çizelge 3.2.Tez çalışmasında kullanılan primerler	34
Çizelge 3.3.PEI kaplı Au nanoparçacık sentezinde reaksiyon koşulları.....	40
Çizelge 3.4.12-kuyucuklu plakaların kuyucuklarına ekilen CAPAN-1 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine eklenen kompleksler ve miktarları	50
Çizelge 3.5.Kalıp primer karışımı (1 örnek için)	52
Çizelge 3.6.Ters transkriptaz karışımının bileşenleri ve miktarları (1 örnek için)	52
Çizelge 3.7.PCR karışımının bileşenleri ve miktarları	53
Çizelge 3.8.Light Cycler 96 cihazında uygulanan PCR programı	54
Çizelge 4.1.Sentezlenen konjugatların dinamik ışık saçılımı ile analizi sonuçları	59
Çizelge 4.2.AuNP ve değişen ağırlık oranlarında hazırlanan AuPEI NP’lerin Zetasizer ölçüm sonuçları.....	64
Çizelge 4.3.Değişen ağırlık oranlarında AuPEI-HA ve değişen ağırlık oranlarında AuPEI-HA-DOX konjugatlarının Zetasizer ile analiz sonuçları.....	66
Çizelge 4.4.Konjugatların elementel analiz sonuçları	75
Çizelge 4.5.Sentezlenen konjugatların farklı konsantrasyonlarının üç farklı hücre hattı üzerindeki sitotoksitesi (24 st.)	82
Çizelge 4.6.Parçacık/siRNA kompleksleri uygulamasını takiben radyasyon terapisi sonucundaki hücre canlılık değerleri.....	85
Çizelge 4.7.Sentezlenen konjugatların uygulandığı L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerinde % apoptotik ve nekrotik indeksler	92
Çizelge 4.8.Konjugatların ve radyoterapinin uygulandığı L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerine ait apoptotik-nekrotik indeks sonuçları.....	94

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

CAPAN-1	İnsan pankreas adenokarsinom hücre hattı
CXCR4	C-X-C kemokin reseptör 4
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDC	Teşhis sınırı
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal Sığır Serumı
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
MDA-MB-231	İnsan meme adenokarsinom hücre hattı
NHS	N-Hidroksisüksinimid
NP	Nano-parçacık
PEI	Polietilenimin
PDI	Çoklu dağılım indeksi
RISC	RNA indükleyici baskılama kompleksi
RNAi	RNA interferans
RTCA	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
siRNA	Küçük interferens RNA
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Disülfid bağı
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu

1. GİRİŞ

Kanser, dünya çapındaki ölümlerin başlıca nedeni olup, kontrolsüz büyüme ve anormal hücrelerin yayılması ile karakterize edilen, 100'den fazla hastalık grubunun genel adıdır. Kompleks bir hastalık olan kanserin tedavisi amacıyla günümüze kadar geliştirilmiş en çok gelecek vaat eden yöntemlerden birisi ise RNA interferans (RNAi)'dir. RNA interferans (RNAi) mekanizması (siRNA ve miRNA'ya dayalı) kullanılarak gen ifadenmesinin baskılanması son zamanlarda başta kanser olmak üzere önemli hastalıkların tedavisinde geleneksel tedavilere alternatif olarak araştırılmaktadır. Ancak siRNA'ların klinik uygulamaları hücre içi alımlarının zayıf, serum kararlılıklarının düşük ve belirli hücrelere hedeflenmelerinin yetersiz oluşu nedeniyle sınırlı olup, tedavide siRNA'ların hedefe spesifik taşınımı için uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi önemli bir ihtiyaçtır. Gerçekleştirilmiş olan bu tez çalışmasının en önemli özelliklerinden birisi, günümüzde siRNA taşıyıcısı olarak kullanılan polietilenimin nanoparçacıklarının (PEI-Np) kanıtlanmış sitotoksitesini doğal bir polisakkarit olan hyalüronik asit ile oluşturacakları kompleks sayesinde azaltarak, sonuçta çok daha biyouyumlu ve reseptör spesifik bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesidir.

PEI günümüzde, non-viral vektör olarak en çok kullanılan katyonik polimer olup, sahip olduğu pozitif yüklerden dolayı hücreye hedeflemeye oldukça etkili olsa da yüksek sitotoksik özelliktedir. Bu nedenle hedefe spesifik taşıma amacıyla yapılan çalışmalarda, biyouyumlu bir oligosakkarit olan hyalüronik asit (HA) ile konjuge edilmeye başlanmıştır. Yüksek anyonik karakteri sayesinde nanotaşıyıcıların sistemik dolaşım süresinde artış sağlayan HA, mukoadhezif özelliği ve reseptörleri sayesinde hedef doku ile daha uzun süreli bir spesifik etkileşim göstermektedir. Hedeflemeye etkili olduğu düşünülen bu özelliğe sahip multifonksiyonel HA biyomalzemesi ya direkt olarak, ya da konjugatları oluşturularak nanotaşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır.

Son zamanlarda, siRNA taşınımında alternatif nano taşıyıcılar olarak, benzersiz hücre içi davranışlar gösteren inorganik nanoparçacıklar da yoğun bir şekilde

alışılmıştır. Özellikle, sahip oldukları yüksek biyouyumluluk, iyi tanımlanmış yüzey kimyası gibi özelliklerinden dolayı AuNP'lerin çok fonksiyonlu gen taşıyıcıları olarak kullanımı gündeme gelmiştir [1]. Yine yapılan araştırmalarda altın nanoparçacıkların kanser hücrelerinin öldürülmesinde radyasyonun etkinliğini arttırma yeteneği gösterdiği belirtilmiştir [2]. Özellikle iyonlaştırıcı radyasyonla ışınlanacak hedef olarak kullanılacak biyolojik sıvılara, dokulara ve organlara altın nanoparçacıkların yerleştirilmesinin, ortamın eşdeğer atom sayısını arttırarak emilen dozun artışına olanak sağladığı da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu sebeple güçlü proton/foton ışınların kullanıldığı radyoterapi ile bölgesel tedavi öncesinde kanserli dokulara Au gibi toksik olmayan nanoparçacıkların farklı konsantrasyonlarının enjekte edilebileceği belirtilmiştir [3]. Son 20 yılda kanser tedavisinde gündeme gelen bir diğer yöntem ise radyoterapi ve kemoterapinin birlikte kullanımındır. Belirli kemoterapötik ajanların radyasyona duyarlılığın artmasına yardımcı olduğu ve radyasyonun bölgesel etkisinin yanısıra sistemik etkili de olmasını sağladığı ve bu tedavi şeklinin potansiyel olarak metastazı önlediği veya geciktirdiği sonucuna ulaşılmıştır [4].

Sunulan bu tez çalışmasında geliştirilen yöntem ile geleneksel kanser ilaçlarından çok daha spesifik özelliklere sahip siRNA'lar, nanotaşıyıcı kompleks olarak üretilen PEI temelli parçacıkların yüzeyine bağlanarak, bu parçacıkların kanser hücrelerinin yok edilmesinde kullanım etkinliği araştırılmıştır. Yine bu tez çalışması kapsamında inorganik temelli nanotaşıyıcılardan olan ve siRNA'ların hedef hücre, doku ve organlara iletiminde sıklıkla kullanılan altın nanoparçacıklar ve bunların PEI, HA ve bunlara ilaveten günümüzde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajan olan Doksorubisin ile konjugatları sentezlenmiştir. Sentezlenen bu parçacıklar siRNA'lar ile elektrostatik etkileşimler sayesinde bağlanarak elde edilen nihai konjugatların (Au-PEI-HA-DOX/siRNA) *in vitro* alışmalar ile terapötik etkinlikleri değerlendirilmiştir. Özellikle tez kapsamında seçilen siRNA'ların hedefleri olan transmembran proteinler etkili kanser hedefleri olarak görülmektedir. Kanser tedavisi için günümüzde en çok araştırılan kemokinler ve reseptörleri (CXCL12 ve CXCR4) olup, bu biyomoleküllerin biyolojik süreçlerde ve farklı kanser türlerinin ilerlemesinde büyüme, metastaz ve

sağkalım dahil olmak üzere birçok açıdan önemli rollerinin olduğu bilinmektedir [5].

Özetle bu tez çalışmasında, CXCR4 reseptörlerine özgü siRNA'nın güvenli ve etkili taşınımı için biyouyumluluğu ve transfeksiyon etkinliği yüksek, hedefe spesifik, içerdiği altın nedeniyle radyasyon terapisi etkinliğinin artırılmasını sağlamasının yanısıra taşıdığı doksorubisin ile kemoterapötik etkinliği de olan yeni bir taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu sayede, literatürde ilk defa geliştirilmiş olan bu parçacık ile özellikle meme kanseri tedavisinde hem gen terapi, hem radyoterapi hem de kemoterapinin kombine bir şekilde uygulanabileceği gösterilmiştir.

Kanserin etkin bir şekilde hedeflenmesi ve gen terapisi amacıyla tez çalışması süresince planlanan hedefler ise sırasıyla, siRNA'nın taşınımı için PEI temelli parçacıkları hazırlamak, hazırlanan bu parçacıkları karakterize etmek (parçacıkların ζ potansiyelinin, büyüklüğünün ve polidispersite indeksinin belirlenmesi, SEM ile yüzey görünümlerinin belirlenmesi, NMR ile ^1H nükleer manyetik rezonans spektrumların elde edilmesi, FTIR analizi, elementel analiz) ve parçacıklara siRNA'ların konjugasyonunu sağlamak (jelde gecikme testi), hazırlanan parçacıklar ile siRNA'ların kompleks oluşturmasını sağlayarak bunların belirlenen konsantrasyonlarda MDA-MB-231 (meme kanseri hücre hattı) ve CAPAN-1 (pankreas kanseri hücre hattı) ve L929 fare fibroblast hücre hatları üzerinde *in vitro* çalışmalar (hücre canlılığının belirlenmesi, apoptoz/nekroz ikili boyama, X-Celligence ile gerçek zamanlı hücre proliferasyonu analizi, real time PCR ile gen ifadenme analizi) ile terapötik etkinliklerini değerlendirmek olmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrenin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu ortaya çıkan, çok hücreli organizmalarda organizmanın genel gereksinimi doğrultusunda çoğalma, farklılaşma ve sağkalım gibi olayları düzenleyen mekanizmanın ortadan kalkması sonucunda hücrelerin kontrolsüz biçimde bölünerek çoğalmaya başlamasıdır. Kanser, spesifik genlerdeki değişiklikler izlenebilir olduğundan genetik bir hastalık olmakla birlikte, kalıtsal değildir. Kalıtsal bir hastalıkta, ebeveynin kromozomundaki genetik kusur zigota aktarılırken, çoğu kansere yol açan genetik değişiklikler etkilenen bireyin yaşamı sırasında somatik bir hücrenin DNA'sında ortaya çıkar.

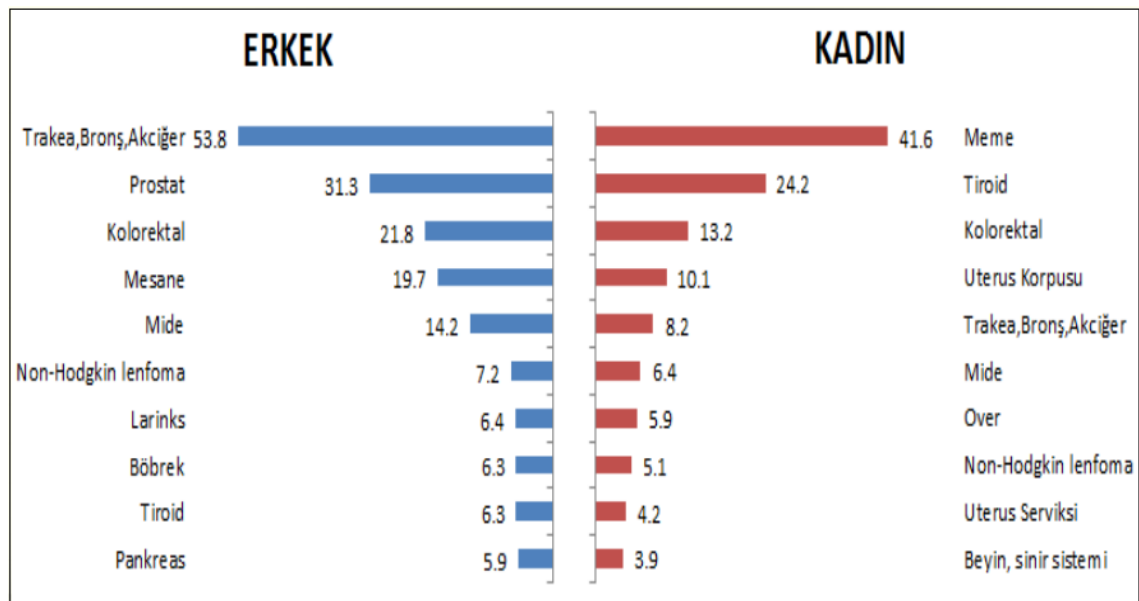
Kanser, hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Hücrede sinyal iletimi, hücre döngüsünün ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesi gibi işlemlerde anahtar görev üstlenen proteinlerin birçoğu, ilk kez, hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yol açan anormal aktiviteleri nedeniyle tanımlanabilmiştir. Kanser araştırmaları bu yönüyle hücrelerin çalışmasını düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuş, bu mekanizmalar da kanseri anlamamıza yardımcı olmuştur [6, 7].

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik, kanser hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz çoğalmasıdır. Kanser hücreleri genetik değişiklikleri nedeniyle, hücrenin normal davranışlarını kontrol eden sinyallere doğru tepkiyi göstermek yerine kontrolsüz biçimde çoğalmayı ve bölünmeyi sürdürerek, malignant tümörleri oluşturur ve bu tümörler sağlıklı doku ve organları da istila ederek sonunda tüm vücuda yayılır. Kanser hücrelerinin ortak özelliği olan çoğalmayı denetleyen mekanizmaların ortadan kalkması, çok hücreli sistemlerde biriken anomalilerin sonucudur. Kanser hücrelerini normal hücreden ayıran birçok davranış da bu özelliği yansıtır [6-8].

2.1.1. Kanser Türleri

Kanser vücutta yer alan herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkabildiğinden, gerek davranış, gerekse tedaviye cevap yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren, yüzden fazla değişik kanser türü mevcuttur. Kanser patolojisinde en önemli konu, selim ve malin tümörleri birbirinden ayırabilmektir. Deride görülen basit siğiller gibi selim tümörler çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Buna karşılık malin tümörler hem çevredeki normal dokuya, hem de kan ya da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılır (metastaz). Yalnız malin tümörler kanser olarak tanımlanmaktadır. Gerek malin, gerekse selim tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılır. Kanserlerin çoğu üç ana grupta toplanabilir: karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar, epitel hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen sarkomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir. Çok sayıda kanser türü olduğu halde bunların pek azı sık görülür (Çizelge 2.1). Kanser dünya çapında büyük bir halk sağlığı problemi olup [9], insidansı giderek artmaktadır [10]. 2020 yılına kadar dünya genelinde kanser vakalarının iki katına çıkması beklenmekte ve yeni kanser hastalarının sayısının yılda 15 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir [11].

Çizelge 2.1. Türkiye’de en sık görülen ilk 10 kanser, 100.000 kişide, 2015 [12]



Kanserlerin yarısına yakınıni oluşturan dört kanser türü prostat, meme, akciğer ve kolon/rektum kanseridir. Şu ana kadar bilinen en ölümcül kanser olan akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %30'undan sorumludur [7].

2.1.2. Kanser Nedenleri ve Gelişimi

Kanserin temel özelliklerinden biri klonalitedir. Tümörlerin klonal olması, tümör gelişmesine neden olan hücrenin başlangıçta, kanser hücresinin bütün özelliklerine sahip olduğu anlamına gelmez. Tam tersine, kanserin gelişmesi birbirini izleyen değişiklikler sonucu, giderek malin şekle dönüşen çok aşamalı bir süreçtir [7].

Tipik olarak, yetişkinlerde kanser gelişiminde, hücrelerin büyümesini kontrol eden birçok gende mutasyonlar, tümör hücrelerinde meydana gelen metabolik değişiklikler ve kanserin nihai büyümesini kolaylaştıran veya hızlandıran tümör mikroortamı etkilidir [13, 14]. Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonucunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar. Bu aşamaların ilki olan tümör başlangıcı, bir tek hücrenin anormal çoğalmasına neden olan genetik bir değişikliğin sonucudur. Hücre çoğalmasına paralel olarak klonal tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür. Tümör ilerlemesi bu topluluk içindeki hücrelerde yeni mutasyonların gerçekleşmesiyle devam eder. Bu mutasyonların bir bölümü hücreye daha hızlı çoğalma gibi belirli avantajlar kazandırır, bu hücrelerden türeyen ve söz konusu avantaja sahip olan yeni hücreler tümör topluluğu içinde gittikçe daha baskın nitelikler kazanırlar. Böylece gerek çoğalma hızı, gerekse (sağkalım, invazyon ve metastaz yeteneği gibi) başka özellikler açısından avantajlı yeni bir tümör hücre klonu ortaya çıktığı için, bu işleme “klonal seçim” adı verilir. Klonal seçim, tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler bu nedenle giderek daha hızlı çoğalarak, daha malin özellikler kazanırlar. Çoğalmayı sürdüren ve aynı zamanda kan damarlarına ve lenf yollarına da giren kanser hücreleri, böylece, vücudun diğer bölgelerine de metastaz yapma olanağı elde eder [7].

Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan, birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkma olasılığını etkileyebilir. Özellikle radyasyon, kimyasallar ve virüslerin gerek deney hayvanlarında, gerekse insanlarda kansere neden olduğu gösterilmiştir. Radyasyon ve birçok kimyasal karsinogen, etkilerini DNA hasarı yaparak ve mutasyonları uyarak gösterir. İnsanda kanser gelişmesine neden olabilen karsinogenler arasında, mor ötesi ışını, tütün dumanındaki karsinogenik kimyasallar ve aflatoksin sayılabilir. Diğer bazı karsinogenler, mutasyon oluşturmak yerine hücre çoğalmasını uyarak kanser gelişimine zemin hazırlar. Protein kinaz C'yi aktifleştirerek hücre çoğalmasını uyaran forbol esterleri bunun tipik örneğidir. Forbol esterlerinin aktivitesi farelerde kimyasal olarak oluşturulan deri tümörleri deneyleri ile gösterilmiştir. Başta östrojenler olmak üzere, hormonlar da kanserin gelişiminde önemli tümör kamçılayıcısıdır. Aşırı östrojen, kadında endometrium kanseri gelişme olasılığını artırır. Kimyasal maddeler ve radyasyona ek olarak, bazı virüsler de, gerek deney hayvanlarında, gerekse insanda kansere neden olabilir. Virüslerin neden olduğu insan kanserlerinin başında, karaciğer ve serviks kanserleri gelir [7]. Sigaranın akciğer kanserine neden olduğu ve güneş ışığının cilt kanserine neden olduğu yaygın olarak bilinmekle birlikte, sigara içiminin kanser insidansını arttırdığını veya sigara içiminin neden olmadığı tüm rahim ağzı, baş ve boyun kanserlerine temelde obezite veya hepatotoksinlerin (kronik alkol kullanımı gibi) değil, virüslerin neden olduğu halkın sadece küçük bir kesimi tarafından bilinmektedir [15].

2.1.3. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser hücrelerinde hücrenin normal çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağkalımını düzenleyen mekanizmalarda anormallikler görülür. Bütün bunlar bir araya geldiğinde, kanser hücrelerinin bu karakteristik özellikleri malinitenin hücresel düzeyde tanımlanmasını sağlar. Kültür ortamında kanser hücreleri ile normal hücreler arasındaki ilk fark, normal hücrelerin çoğalmasının, yoğunluğa bağlı inhibisyonla etkilenmesidir. Belli bir yoğunluğa ulaşan hücreler çoğalmayı keserek sessiz faza geçerken, kanser hücrelerinin çoğalması yoğunluğa bağlı inhibisyonla etkilenmez ve bu hücreler G₀ fazında durmak yerine kontrolsüz *in vivo* çoğalma davranışlarını sürdürerek, yoğunluğun artmasına rağmen çoğalmaya devam ederler. Normal hücreler ile kanser hücreleri arasındaki bir

başka fark da, kanser hücrelerinin hücre dışı büyüme faktörlerine daha az gereksinim duymasındır. Birçok tümör hücresinin büyüme faktörlerine bağımlılığı normal eşdeğerlerine kıyasla daha az olduğundan, bu özellik tümör hücrelerinin hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda kontrolsüz çoğalmasını sağlar [7].

Kanser hücrelerinde, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimi de daha düzensizdir. Yüzey adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalma nedeniyle kanser hücrelerinin çoğunun tutunma yeteneği normal hücrelere kıyasla daha düşüktür. Kanser hücrelerinin tutunma yeteneğinin azalması, morfolojik ve hücre iskeletinde değişikliklerine de yol açar: Tümör hücrelerinin çoğu, hücre dışı matrise veya komşu hücrelere tutunamadıkları için normal hücrelerden daha yuvarlaktır [7].

Kanser hücrelerinin başka doku bileşenleri ile etkileşimini değiştiren ve bu yüzden invazyon ve metastaz açısından önem taşıyan iki özelliği daha vardır. Bunlardan birincisi, malin hücrelerin hücre dışı matris bileşenlerini parçalayan ve böylece kanser hücresinin normal komşu dokunun içine girmesine olanak veren proteazlar salgılamasıdır. İkincisi, kanser hücreleri yeni kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) hızlandıran büyüme faktörleri salgırlar. Tümör hücreleri anjiyogenik uyarı sonucunda gelişen yeni kılcallara kolayca girebildiğinden, bu olay kanser hücrelerinin dolaşıma katılmasına ve metastatik yayılımın başlamasına olanak sağlar. Kanser hücrelerinin bir başka genel özelliği de, normal biçimde farklılaşmamalarıdır. Kanser hücreleri sürekli aktif biçimde çoğalmaları ile uyumlu olarak, farklılaşmanın erken aşamalarında kalırlar [7].

Apoptoz ya da programlı hücre ölümü, kan hücreleri de dahil, birçok hücre türünde farklılaşmanın temel öğelerindendir. Kanser hücrelerinin çoğunda apoptoz görülmediğinden, bu hücreler normal hücrelerden çok daha uzun yaşarlar. Normal çevresel sinyaller ortadan kalktığında, tümör hücrelerinin apoptoza girmemesi, sadece primer tümörün gelişmesi açısından değil, metastatik hücrelerin vücudun başka bölgelerinde canlılıklarını korumaları ve çoğalmaları açısından da önemlidir [7].

2.1.4. Kanser Tedavisinde Uygulanan Yöntemler

Başlıca kullanılan geleneksel tedaviler arasında, cerrahi tedavi, kemoterapi ve radyoterapi sayılabilir. Bu yöntemlerden kemoterapi ve radyasyonda kanser hücrelerinin yanında normal hücrelerin de fazla sayıda öldürülmesi nedeniyle ciddi yan etkiler görülmekte olup, çoğu ilerlemiş kanser vakalarında tedavi edici etkileri sınırlıdır. Son yıllarda ise bu “kaba kuvvet” stratejilerin yerini, malignansın moleküler temelleri ile ilgili yeni edinilen bilgilerin ışığında “hedefli terapiler” almaya başlamıştır. Terapi şeklinin “hedefli” olarak adlandırılması için birçok seçenek vardır: normal hücrelerin zarar görmeyeceği şekilde sadece kanser hücrelerine saldırı hedeflenebilir; kanser hücrelerinin çoğalmasını ve sağ kalımını engelleyebilecek olan belirli bir proteinin inaktivasyonu hedeflenebilir; ve/veya somatik mutasyonları saptanabilmiş bir hastanın kanser hücreleri hedeflenebilir.

Kanser tedavisi amacıyla geçtiğimiz yıllarda Nobel ödülleri ile de taçlandırılmış ve aralarında cerrahi, radyasyon gibi stratejilerin de olduğu birtakım yöntemler geliştirilmişse de, 2018 yılı Fizyoloji ve Tıp alanındaki Nobel Ödülü, negatif immün düzenlemesini engelleyerek geliştirdikleri kanser tedavisi yöntemi ile James P. Allison and Tasuku Honjo’nun olmuştur [16-19]. Kanser tedavisi için yeni ve umut verici bir yaklaşım olan kanser immünoterapisi, Science dergisi tarafından 2013 yılında, yılın atılımı olarak kabul edilmiştir [20].

Kanserin temel özelliklerinden biri, tümör hücrelerinin immün sistemden kaçabilmesidir ve immün terapi ile özellikle kanser aşıları veya adjuvanlar ile sitotoksik lenfositler güçlendirilip, makrofajlar, dendritik hücreler ve diğerleri gibi antijen sunan hücreler aktive edilerek kanser hücreleri ile savaşmaları sağlanabilir. Ancak düşük hedefleme etkisi ve anti-kanser etkinliği, kanser immünoterapisinin uygulanmasını sınırlamıştır [13, 19]. Onaylanan immünoterapi ilaçların sayısı gün geçtikçe artsa da, immünoterapilerin yaygın olarak uygulanmalarındaki en büyük engel, bu terapötiklerin otoimmünite ve spesifik olmayan inflamasyon gibi advers etkilerinin olmasıdır. Bu advers etkilerin kontrolü ve etkinliğin artırılması ise çeşitli immünoterapilere verilen yanıtın artması ile mümkündür. İleri biyomalzemeler, nanoparçacıklar gibi ilaç

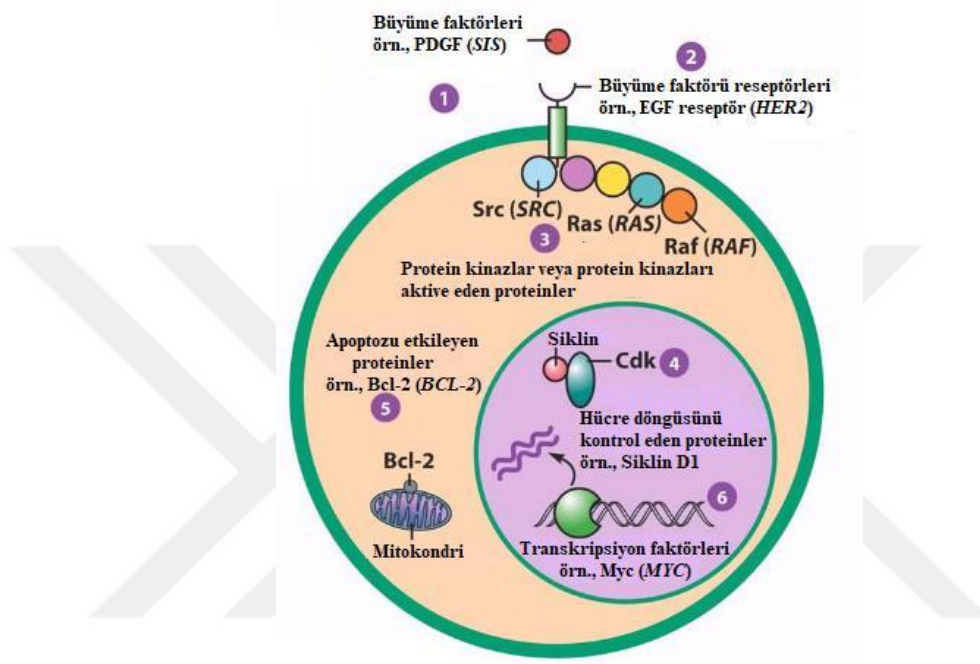
taşıyım sistemleri ve terapi amacıyla T-hücrelerinin kullanımı ile bu toksik etkiler azaltılmaya çalışılmaktadır [21].

Kanser immünoterapisi, doğal ve adaptif immün efektör mekanizmalarının aktifleştirilmesinden, inhibe edici ve bastırıcı mekanizmaların nötrleştirilmesine kadar değişen çeşitli stratejileri kapsar. Efektör bağışıklık hücrelerini uyarma stratejileri arasında tümör antijenleriyle aşılama, sitokinlerle tedavi (örneğin, interlökin 2 (IL-2) veya interferon-alfa (IFN α)) veya antijen sunumunun artırılması (Toll benzeri reseptörlerin uyarılması, dendritik hücrelerin verilmesi veya CD40-hedefli agonistik antikörlerin kullanılması) sayılabilir [22]. Kişinin kendi bağışıklık sisteminin tümör hücrelerine karşı daha şiddetli bir yanıt vermesini yapay olarak teşvik etmek için aktif immünoterapi olarak da bilinen pek çok farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejilerden bazılarında, bağışıklık hücreleri hastadan izole edilir, *in vitro* ortamda uyarılır, kültürde çoğalması sağlanır ve ardından hastaya geri verilirken, bazı çalışmalarda ise izole edilen bağışıklık hücreleri çoğaltılmadan önce tümör karşıtı potansiyellerini arttırmak üzere genetik olarak değiştirilirler [6].

Özellikle vücudun bağışıklık sistemini güçlendiren ve aktif immünoterapi olarak kabul edilen bazı kanser aşılı ile pek çok klinik çalışmada cesaret ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir [23]. Bu konuda önemli gelişmelerden birisi ise FDA'ın rahim ağzı kanseri vakalarının %70'inden sorumlu olan İnsan Papilloma Virüsüne (HPV) karşı geliştirilen Gardasil (protein olarak HPV antijenleri kullanılır) ve Cervarix (HPV tip 16 ve 18 karışımı proteinlerinden oluşur) adındaki iki aşılı onaylaması olmuştur [24].

Geleneksel kanser tedavi yöntemlerinden birisi ise kanser tetikleyici protein aktivitesinin inhibisyonudur. Kanser hücrelerinin farklı davranmalarının nedeni ya anormal konsantrasyonda ya da anormal aktivite gösteren proteinler içermeleridir. Bu proteinlerin bazıları Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Çoğu durumda tümör hücrelerinin büyümesi veya hayatta kalması bu anormal proteinlerden biri ya da daha fazlasının işlevini sürdürebilmesine bağlıdır. Bu bağımlılık, "onkogen

bağımlılığı” olarak bilinir. Eğer bu proteinlerden birinin işlevi seçici olarak engellenebilirse, malin hücrelerin tamamını öldürmek mümkün olabilir. Bu amaçla araştırmacılar, küçük moleküler ağırlıklı ve kanser destekleyici proteinlerin aktivitesini inhibe eden bileşiklerden oluşan çok sayıda molekül sentezlemişlerdir [6].



Şekil 2.1. Proto-onkogenlerce kodlanan proteinlerin şematik gösterimi. (1) Büyüme faktörleri, (2) Büyüme faktörü reseptörleri, (3) Protein kinazlar ve onları aktive eden proteinler, (4) hücre döngüsünü düzenleyen proteinler, (5) apoptozu inhibe eden proteinler, (6) DNA-bağlayan proteinler. Mitoz, tümör yayılımı ve metastaz ile ilişkili proteinler gösterilmemiştir [6].

Birçok sayıda protein hedefleyen, küçük molekülü inhibitörler (örneğin, Gleevec, Abl kinaz inhibitörü) ile klinik denemelerde başarı sağlanmış, bu ilaçlar FDA tarafından onay almış ve daha yüzlercesi için klinik denemeler devam etmektedir [6, 25].

Antikanser stratejilerinden bir diğeri de yeni kan damarları oluşumunun (anjiyogenez) inhibisyonudur ve bugüne kadar en umut vaad eden sonuçlar çoğu solid tümörde aşırı eksprese olan endotelial hücre büyüme faktörü VEGF'e karşı geliştirilmiş Avastin® adı verilen insansılaştırılmış antikor ile elde edilmiştir.

Günümüzde ise en iyi antikanser stratejisi erken teşhistir. Tarama uygulamalarından bazıları mamografi, PAP smear, PSA tayini ve kolonoskopidir. İlerleyen yıllarda omik teknolojilerinde ve özellikle proteomikte meydana gelen gelişmelerin, kandaki çeşitli biyobelirteçlerin seviyelerini belirleyebilecek yeni tarama testlerinin geliştirilmesine kapı aralayacağı umut edilmektedir [6].

2.2. Gen Terapi

Kanser için öncelikli tedavi şekilleri cerrahi, kemoterapi ve radyasyon tedavisidir; ancak hedefli olmayan tedavilerde, sağlıklı dokular veya organlarda tedavinin olumsuz yan etkileri görülebilmektedir. Bu yan etkiler aynı zamanda hastanın önemli ölçüde strese girmesine ve kanser tedavisinin seyrinin değişmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle, günümüzde birçok yeni kanser tedavi şekilleri araştırılmakta olup, gen terapi bunlardan biridir [26].

Gen transferi, kanserli hücelere veya çevreleyen dokuya yeni genler aktararak hücre ölümüne neden olan veya kanserin büyümesini yavaşlatan yeni bir tedavi yöntemidir. Bu tedavi tekniği çok esnek olmakla birlikte, çok çeşitli genler ve vektörler kullanılarak klinik denemelerde başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. Gelişmekte olan kanser gen terapisi alanı, bir dizi heyecan verici potansiyel tedavi sunmaktadır. Gen terapi terimi, hücrelerin modifiye edilmesinde (*in vitro* veya *in vivo*) genetik materyalin kullanıldığı birçok tedavi türünü kapsamaktadır. Gen terapide teorik olarak sekansı bilinen herhangi bir gen kullanılabilir ve kanser terapi için araştırılabilir. Hastalığın nedeni mutasyonlar bilindiğinde ve günümüz diğer tedavi yöntemleri yeterince etkili olmadığına, özellikle kas distrofisi, kistik fibrozis ve ağır kombine immün eksiklik (SCID) gibi önemli genetik hastalıkların tedavisinde, gen terapi cazip bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır [27]. Çok çeşitli gen terapisi ajanlarının test edildiği farklı *in vitro* ve prelinik hayvan

modelleri ile kayda değer etkiler gösterilmiştir. Özellikle eksprese olduğunda hücresel ölüme neden olan intihar genleri, antianjiyogenez genleri ve hücresel büyümeyi durduran genler gibi farklı fonksiyonları olan genler de bu terapi kapsamında çalışılmıştır. Örneğin, akciğer kanseri modellerinde gen terapisi kullanılarak kanser aşılı oluşturmak, kanser hücrelerinin lizisi ve ölümü için virüsleri hedeflemek, tümöre kan akışını azaltmak veya normal hücresel fenotipin yenilenmesini sağlamak gibi hücresel sağkalım açısından yararları gösterilmiştir. Preklinik gen terapi testleri gliyomalar, pankreas kanseri, karaciğer kanseri ve diğer birçok kanser türü üzerinde de uygulanmıştır [28]. Yine klinik denemelerde gen aktarımı amacıyla adenovirüsler, adeno-ilişkili virüsler, retrovirüsler, çiçek virüsleri gibi çok sayıda farklı viral vektörler kullanılmış, bunlardan en yaygını ise replike olamayan adenovirüsler olmuştur. Yalın DNA transferi ve oligodendromer DNA kaplamaları da, elektroporasyon kadar yaygın uygulaması olan diğer viral olmayan gen aktarım şekillerindendir [29].

Gen transfer terapisinde taşıyıcı sistem tipinin seçimi, genin etkili olabilmesi için eksprese olacağı zamanın uzunluğuna olduğu kadar, terapinin hedeflenen özgüllüğüne bağlı olarak da değişmektedir. Gen transferi tedavisini uygulamaya yönelik ilk girişimlerde, yöntem başarılı olduğu kadar, bazı transfer zorlukları da yaşanmıştır. Terapötik genin hedef hücrelere başarılı bir şekilde ulaştırılması zor olsa da, bir yanıt ortaya çıkaracak kadar etkilidir. Bu yöntemde, terapötik genin üreme dokuları gibi istenmeyen hücre tiplerine entegrasyonunu engellemek için ek önlemler de alınmalıdır. Daha önceki gen transfer deneylerinde gen, susturma amacıyla hücre içerisine etkili bir şekilde gönderilse de, ya eksprese edilememiştir ya da sınırlı bir süre için ifade edilebilmiştir [30]. Bu engellere rağmen, hayvan modellerinde çeşitli genler ve transfer yöntemleri kullanılarak prostat, akciğer ve pankreatik tümörler gibi katı tümörler başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir [31-33].

DNA'nın hücre kromozomuna eklenmesi durumunda da özel önlemler alınmalıdır. Özellikle genin yerleştirildiği bölge, genom içerisinde kanserleşmeye neden olmayacak bir yerde olmalıdır. Örneğin omurgalı kromozomlarına gen

insersiyonunda kullanılmış olan retrotranspozonlar, sıklıkla aktif olarak transkripte olan genlere insersiyon yaparak hücresel fonksiyon açısından potansiyel problemlere neden olmuştur [34]. Glioma için murin modelleri gibi gen yerleştirme teknikleri kullanan prelinik modeller, intrakraniyal olarak enjekte edilen bir retrotranspozon sistemi aracılığıyla antianjiyogenik genleri uyguladıklarında, önemli ölçüde daha fazla sağkalım göstermiştir.

2.2.1. Gen Susturma Stratejileri

Kanser tedavisinde toksik yan etkileri azaltmak veya ortadan kaldırmak için yeni tedavi stratejileri / modelleri gereklidir. Hücre biyolojisindeki yeni gelişmeler, insan genom dizilerinin kullanılabilirliği ve oligonükleotit sentezindeki son gelişmeler “antisens terapisi” olarak adlandırılan hedefli tedavinin kapısını açmıştır ve antisens tedavisi ile ilgili 1978’de yayınlanan ilk deneysel kanıt Paul C. Zamecnik’e aittir [35]. Antisens terapisinde, hastalıktan sorumlu gen dizisine tamamlayıcı olan tek zincirli bir oligonükleotit (DNA veya RNA), ilgili geni seçici bir şekilde susturmak için hücrelere verilir. Antisens oligonükleotitleri, kimyasal olarak modifiye edilmiş veya edilmemiş tek zincirli DNA/RNA molekülleridir. Hücreye girdikten sonra, tamamlayıcı oligoların hedef mRNA dizisi ile hibritleşmesi ve protein sentezini önlemesi beklenir.

Araştırmacılar tarafından mRNA translasyonunu engellemek için üç farklı yaklaşım geliştirilmiştir: 1) antisens oligonükleotitler, 2) ribozimler ve DNA enzimleri ve 3) RNA-indükleyici susturma kompleksi (RISC) ile etkileşen kısa girişimci RNA (siRNA) molekülleri. Antisens oligonükleotitler, mRNA translasyonunu bloke ederken, ribozim ve DNA enzimleri sahip oldukları katalitik aktivite ile hedef RNA’yı keserler. Bu moleküller hedef mRNA’ya bağladığında, fosfodiester omurgası parçalanır ve mRNA devre dışı kalır. Bir diğer antisens yaklaşımı ise “RNA interferans”tır [36-50]. RNA interferans (RNAi, RNA girişi) veya “gen susturulması”, bir hücrenin kendi RNA dizisini kullanarak genin ekspresyonunun engellendiği büyüleyici bir mekanizmadır. Bu süreç, genlerin hastalıklardaki rolünü araştırmak ve gen susturma yaklaşımını içeren terapötiklerin tasarlanmasında kullanılabilmektedir [51, 52] ve RNAi, kodlamayan

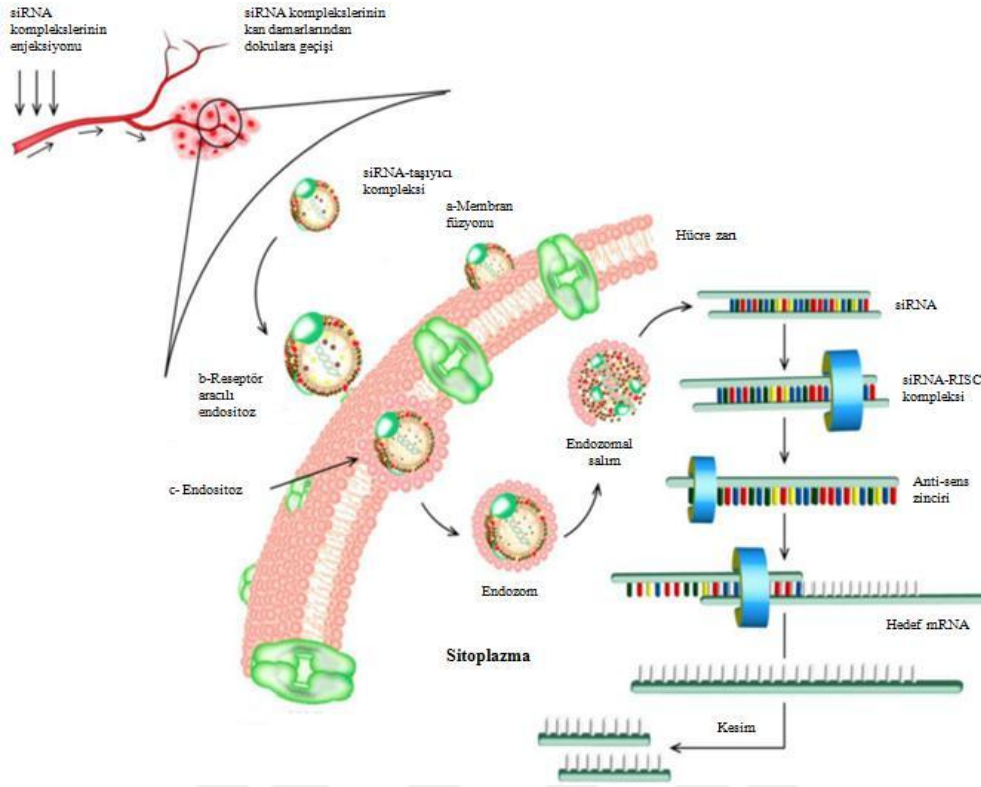
RNA'nın (ncRNA) bir üyesini belirtir. NcRNA terimi, proteine çevrilemeyen RNA için kullanılsa da bu, kodlayıcı olmayan RNA'nın hiçbir görevinin olmadığı anlamına gelmez [50]. Yeni bulgular, memeli genomunun çoğunluğunun ncRNA'ya transkribe edildiğini ve sadece %2'sinin mRNA'ya transkribe edildiğini ve proteine çevrildiğini göstermektedir [53-61]. RNA dizileme çalışmaları, ncRNA'ların kökeninin antisens protein kodlayan gen transkriptlerinde, çift yönlü promotör transkriptlerinde, tekrarlanan dizilim alanlarının transkriptlerinde ve intronik transkriptlerde olduğunu göstermiştir [62]. Virüsler ve diğer çift sarmallı RNA mikroorganizmaları, ya genomlarını konak hücrelerine sokar veya çift sarmallı RNA'yı yapay olarak sentezler [63-65].

Kodlayıcı olmayan RNA iki gruba ayrılır: (i) küçük düzenleyici RNA ve (ii) uzun kodlayıcı olmayan RNA. RNAi, siRNA ve miRNA'yı da içeren küçük düzenleyici RNA'nın bir parçasıdır [66] ve RNA girişim moleküllerinin keşfi, Mr. Fire ve Mello'nun 1998'de *C. elegans*'taki araştırmaları sonucu olmuştur [63]. Sonraki yıllarda RNAi alanındaki ilerlemeler ile birlikte, 2006 yılında, Fire ve Mello, Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel Ödülü'ne layık görülmüşlerdir. RNAi sürecinde RNA, “dicer” endoribonükleaz enzimlerince küçük müdahaleci RNA (siRNA) ya da mikro (miRNA) olarak adlandırılan küçük (19-23 bp) parçalara kesilir ve bu parçalar Argonat, özellikle Argonat 2 (Ago2) olarak adlandırılan protein sınıfına bağlanarak, mesajcı RNA translasyonunun inhibisyonu sağlanır. Günümüzde, hedef gen ürününün ekspresyonunu inhibe edebilen ve yaygın olarak kullanılan birkaç RNAi türü vardır. Bunlar; siRNA, kısa saç tokası RNA (shRNA) ve miRNA'dır. siRNA ve shRNA, immün sistem uyarılması ile ilgili sorunların üstesinden gelebilmek ve susturma etkilerini optimize etmek amacıyla tasarlanmış, translasyonun tamamen durdurulabilmesi amacıyla ise daha uzun RNA sekansları kullanılmıştır [67].

siRNA, kimyasal olarak sentezlenen, 2 nükleotidi 5'-fosforile edilmiş ucu ve fosforile edilmemiş 3'-ucu eşleşmemiş şekilde olan, 19-23 baz çifti içeren, çift sarmallı bir RNA'dır (dsRNA) [26, 68] ve iki aşamada üretilir. Başlangıç aşamasında, uzun, çift sarmallı RNA (500-200 bp) Dicer tarafından 23-21

nükleotit uzunluğunda fragmanlara ayrılır ve siRNA üretilir. siRNA fonksiyonel bir moleküldür. Çift sarmallı RNA, viral genom ve bakteriyel DNA'dan kaynaklı olabildiği gibi, biyoinformatik veriler kullanılarak üretilen sentetik RNA kaynaklı da olabilir [69, 70]. Sonraki aşamada ise, çift sarmallı siRNA helikaz ile ayrılır ve daha sonra "sense" dizisi endojen endonükleazlar ile uzaklaştırılarak "antisense" dizi, RISC'e yönlendirilir. Bu kompleks daha sonra hedef mRNA'ya yönlendirilir. RISC'nin bir bileşeni olarak, Argonat, piwi bölgesinden kaynaklı ribonükleaz aktivitesi sayesinde hedef mRNA'yı parçalar. Gen ekspresyonu, hedef mRNA RISC tarafından kesildiği sırada sona erer. mRNA iki farklı şekilde kesilebilir. Birincisi, ribonükleazlarca kesilebilir. İkincisi ise, homolog iplikçiklere bağlanarak RNA polimeraz aracılığıyla çift iplikli RNA oluşturulup interferans yolağının devam etmesi sağlanır. mRNA'nın parçalanmasıyla, transkripsiyon sonrası gen susturma (Post-Transkripsiyonel Gen Susturma; PTGS) olarak bilinen hedef genin ekspresyonu baskılanır (Şekil 2.2) [69-71]. RNAi keşfedildiğinden bu yana birçok siRNA molekülü insan klinik denemelerinde değerlendirilmiştir [72].

Diğer bir RNAi tipi olan miRNA ise memelilerde doğal olarak oluşan transkripsiyonel gen düzenleyicisi sistemidir [73]. Gen ürünlerinin miRNA aracılı düzenlenmesi ile, kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların nedeninin açıklanabileceği öne sürülmüştür [74, 75]. Kaposi sarkoma virüsü tarafından eksprese edilen bir miRNA'nın, B hücresi transformasyonunu destekleyen ve hücre büyümesini düzenleyen, endojen bir insan miRNA'sını (miR-155) taklit ettiği gösterilmiştir [76]. Bu nedenle, doğal olarak oluşan endojen ve eksojen miRNA'lar tedavide hedef olabilirler [77]. Yine endojen gen düzenlemesinin hedeflenmesinde siRNA veya antisens oligonükleotitler gibi miRNA'ların kullanılması da mümkün olabilir [27].



Şekil 2.2. siRNA'nın dolaşımı ve RNAi'nin *in vivo* biyolojik mekanizması. Nanoparçacıklar siRNA'nın üç ana yoldan gerçekleşen hücresel alımını kolaylaştırır (a) membran füzyonu, (b) reseptör aracılı endositoz ve (c) doğrudan endositoz. Hücre içine alınan siRNA'nın mekanizması RNA tetikli susturma kompleksi (RISC) ile etkileşim yoluyla başlatılır ve kontrol edilir. Geriye kalan antisens zincir, baz eşleşmesi olan homolog bölgeyi tanıyarak ve hedef mRNA'yı parçalarayak gen ekspresyonunun inhibisyonunu sağlar [78].

RNAi, hücrelerde genellikle bakteri ve virüslerin yabancı nükleik asitlerine karşı bir savunma mekanizması olarak kullanılsa da, *in vitro* olarak genlerin seçici susturulması için de tasarlanabilir. CRISPR gibi genomu düzenleme teknolojileri bir gen üzerinde "kalıcı olarak" değişiklik yaparken, siRNA'lar tarafından genler mRNA seviyesinde "geçici" olarak susturulur. RNAi; 20 yıldan daha uzun zaman önce keşfedildiğinden beri bu yaklaşım, viral hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere birçok endikasyonda belirgin sonuçlar doğurarak, spesifik ve müdahale edilemeyen genlerin manipülasyonunda sağladığı esneklik nedeniyle büyük ilgi

çekmiştir [51, 52, 79-81]. Küçük molekülü inhibitörlerin veya antikörlerin aksine, siRNA'lar spesifik gen seviyesinde hareket edebilen moleküllerdir [79]. miRNA'nın aksine, kromozomal DNA ile etkileşime geçmesi ya da çekirdeğe aktarılması gerekmediğinden ve sitozola taşınımının yeterli olması nedeniyle, siRNA aktarımı daha çok tercih edilebilir [52].

Günümüzde birçok gen için siRNA'ların tanımlandığı büyük bir kütüphane oluşturulmuş ve nispeten düşük maliyetle ölçek büyütme çalışmaları yapılabilmektedir. Son yıllarda birçok siRNA ürünü önemli ticari yatırımlarla klinik alanda ürüne çevriliyor olsa da, uygun ve etkili taşıyıcıları için gerekli sistemlerin geliştirilmesi, hız sınırlayıcı basamak olarak karşımıza çıkmaktadır [82, 83]. Ayrıca, diğer DNA ve RNA ilaç adaylarında olduğu gibi siRNA'ların da taşıyıcı konusunda büyük zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu "yükü" makromoleküller vücut sıvılarında nükleazlarca hızla bozunur, böbrek ve karaciğerden atılım hızları oldukça yüksek olmakla birlikte, immün yanıtı istenmeyen bir şekilde tetikleme potansiyeline sahiptir [82, 83]. siRNA'nın karaciğer haricinde diğer organlara etkili ve güvenilir bir şekilde taşıyıcı ile ilgili yaklaşımların geliştirilmesi kritik bir öneme sahiptir [82-84].

2.2.2. Kanser Tedavisinde RNA Interferansın Rolü

Dünya genelinde kanser nedenli ölümlerin günümüze kadar artış göstermesi dikkate alındığında 2030 yılına kadar kanser nedenli ölüm sayısının 13,1 milyonu bulacağı öngörülmekte [85] ve kanser tedavisinde en etkili yollardan birisinin hedeflenmiş terapi temelinde terapötik indeksi arttırılmış anti-kanser ilaçların geliştirilmesi olduğu bilinmektedir. Tümör hedefli teşhis ve terapiler, anti-tümör araştırmalarında başlıca darboğaz olup, etkili tümör teşhis ve terapisi için yeni anti-tümör ilaçlar ve özgün biyomedikal teknolojiler geliştirilmelidir. Bu yöndeki en önemli adımlardan biri endojen post-transkripsiyonel gen düzenleyici mekanizma olan, kodlanmayan, çift zincirli RNA moleküllerinin, susturma amacıyla hedef genlerin ekspresyonuna müdahale ettiği RNA interferans mekanizmasının kullanımı olmuştur [78]. Kanser tedavisinde RNA enterferansının etkinliği, kemoterapi gibi diğer kanser tedavisi yöntemleriyle karşılaştırıldığında,

büyümenin ileri evrelerinde susturma indüksiyonu, susturulmuş genin bir sonraki nesile aktarılması, diğer gen terapisi metotlarına kıyasla düşük maliyet ve yüksek özgüllük göstermektedir [86, 87]. Daha önce de bahsedildiği gibi kanser, RNAi bazlı terapi için ana hedeflerden biridir. Onkogenler, mutasyona uğramış tümör baskılayıcı genler ve tümörün ilerlemesinde rol oynayan diğer genler, fonksiyonel mekanizması belirli ve özgüllüğü yüksek ve kemoterapi ile karşılaştırıldığında yan etkileri olmayan RNAi bazlı terapi ile gen susturma için iyi hedeflerdir. RNAi'nin kanser terapisindeki en büyük avantajı, tümör gelişiminde rol oynayan çeşitli hücresel yollardaki farklı genlerin hedeflenebiliyor olmasıdır [88]. Bu tedavi şekli ile hem aşırı dozda kimyasal ilaçların yol açtığı çoklu ilaç direnci olasılığı azalmış olur, hem de birden fazla genin eşzamanlı olarak inhibisyonu sayesinde daha etkili bir kanser tedavisi mümkündür. Bu tedavi şeklinin bir başka avantajı ise, tümör büyümesini kontrol etmede diğerlerinden daha etkili olduğu düşünülen kişiselleştirilmiş ilaçların geliştirilmesine olanak tanımasıdır [88]. Klinik çalışmaları yürütülen birçok RNAi bazlı ilaç üzerinde çalışılmaktadır [71].

2.2.2.1. Terapötik Uygulamalar

Gen ekspresyonunun rolü ile apoptoz genleri arasında belirli bir ilişki vardır ve daha önce de bahsedildiği üzere RNAi etkileşim teknolojisi, çeşitli tümörlerin oluşumun ve gelişiminin inhibe edilmesinde rol oynar. Cioca vd. spesifik Bcl-2 ve c-ras siRNA kombinasyonunun HL-60, U937 ve THP-1 lösemi hücre hatlarında apoptozu indükleyebildiğini ve etoposid ve daunorubisine duyarlılıklarını arttırdıklarını bildirmişlerdir [89]. Bu bulgu, RNAi moleküllerinin kemoterapinin etkinliğini arttırabildiğini göstermektedir. Bu alanda Nieth vd.'nin yapmış oldukları çalışmada, MDR1 siRNA'sının pankreas ve mide kanseri hücre hatlarına transfekte edilmesi sonucunda MDR1 mRNA ve proteini önemli ölçüde inhibe edilerek daunorubisine karşı direnci azaltılabilmektedir (MDR1, tümör kemoterapi direncinde önemli bir rol oynayan çoklu ilaca dirençlilik genidir) [90]. Bu çalışma ile RNAi'nin çoklu ilaç dirençliliğini geri çevirmede ve kemoterapötik ilaçlara hassasiyetin artırılmasında kullanılabilirliği gösterilmiştir. Günümüzde, nanotaşıyıcıların da eklenilen hedefleyici uçları (polietilen glikol (PEG) ve/veya diğer ligandlar) ile organları hedeflemedeki fonksiyonellikleri arttırılabilmektedir [91]. Wang ve ark. RGD peptidini (tümöre hedeflenen ve penetre olabilen siklik peptid;

amino asit sekansı: CRGDKGPDC) doksorubisin (DOX) ile asite duyarlı cis-asonitil bağı ile bağlanan PEG'lenmiş poliamidoamin (PAMAM) dendrimerine bağlamış (PEG-PAMAM-cisasonitil-DOX, PPCD) ve iRGD-aracılı PPCD sistemi ile tümör vasküler büyümenin inhibe edilebildiğini, tümör içi ilaç birikiminin ve hayatta kalma süresinin arttırılabildiğini ortaya koymuşlardır [92].

Bu alanda yapılan başka bir çalışmada ise Ebrahimian vd. düşük miktarlarda DOX ve bcl-xl shRNA'nın eş zamanlı taşınımı için polilaktik-koglikolik aside (PLGA) dayalı yeni bir nanoparçacık formüle etmiş ve *in vitro* çalışmalar ile sürekli salım kinetiğine sahip PLGA-DOX-alkil-PEI/pBcl-xL shRNA'nın, tümör hücrelerinin mortalitesini indükleyebildiğini ve meme kanseri proliferasyonunu yalnızca DOX ve PLGA-DOX-PEI/pBcl-xL shRNA'dan daha iyi inhibe edebildiğini göstermişlerdir. Sonuç olarak, PLGA-DOX NP'lerin ve alkil-PEI/shRNA kompleksi kombinasyonunun, meme kanseri tedavisinde umut vaat ettiğini bildirmişlerdir [93]. Sahip oldukları bu avantajlardan dolayı kanser tedavisinde RNAi'nin uygulanması amacıyla farklı nano-ölçekli taşıma sistemleri kullanılmış ve halen kullanılmaktadır [26, 94].

2.2.2.2. RNA İnterferans Moleküllerinin Taşınımında Kullanılan Nanoparçacıklar

Keşfinden sonra, siRNA aracılı gen susturma teknolojisi özellikle ilaçlarla tedavi edilemeyen hastalıkların, kanser ve dirençli viral enfeksiyonların hücresel ve moleküler seviyede teşhis ve tedavisinde güçlü bir alternatif olarak karşımıza çıkmıştır. Ancak bu moleküllerin sistemik taşınımı, hedef yapılarla etkileşimlerinin nasıl gerçekleştiği ve fonksiyon mekanizmaları, günümüzde hala tam olarak aydınlatılamadığından, bu teknolojiye tam olarak yararlanılamamaktadır [78]. Bu bağlamda *in vivo*'da siRNA'ların hücre membranından sitoplazmaya etkili ve güvenli bir şekilde hedeflenmesi hala tam olarak gerçekleştirilememiştir ve bu sorunun üstesinden gelebilmek için birçok kısa, pozitif yüklü, hücreye kolay girebilen peptidlerin negatif yüklü siRNA'lara bağlanması sağlanarak siRNA'ları taşıma sistemleri oluşturulmuştur [5]. Hedef moleküllere etki edebilmesi için insan vücudundaki anatomik ve fizyolojik koruyucu bariyerleri aşmak zorunda olan

siRNA'ların hedefe spesifik taşınımlarını sağlayan bu sistemler ile ilgili yapılan çalışmalar ve elde edilen veriler ışığında, taşınımında kullanılabilirlikleri kanıtlanmış; ancak elde edilen başarı, neden oldukları toksik etki ve siRNA molekülleri ile oluşturdukları komplekslerin *in vivo*'daki instabiliteleri gibi sorunlardan dolayı kısıtlanmıştır. Bu nedenle, günümüze kadar siRNA ile ilişkilerinde etkili olan, bileşenleri, fiziksel ve kimyasal karakteristikleri temelinde çeşitli avantaj ve dezavantajlar sunan farklı nanoparçacık sistemleri geliştirilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. siRNA taşınımında kullanılan çeşitli nanoparçacıkların avantaj ve dezavantajları

Nano-taşıyıcılar	Sınıf	Avantajlar	Dezavantajlar	Ref.
Lipit Bazlı Nanotaşıyıcılar	Lipozomlar	- Enzim degradasyonu yokluğu nedeniyle artan <i>in vivo</i> kararlılık - Biyouyumluluk - Hızlı hücresel alım - Sentez, modifikasyon ve formülasyon esnekliği - Kontrollü salım - Kontrast ajanlar, problemler ve floroforlara kolay konjugasyon ve fonksiyonelleşme	- Yüksek üretim maliyeti - Kısıtlı kararlılık - Yüklü materyalleri sızdırma - Düşük çözünürlük	[95-99]
	Katı Lipit Nanoparçacıklar (SLN'ler)	- Biyouyumlu ve biyobozunur - Düşük sistemik toksisite ve sitotoksisite - Büyük ölçekte üretim - Otoklav ile sterilizasyon	- Hızlı salım - Kristal yapılarından dolayı düşük taşıma kapasitesi	[100, 101]
Polimer Bazlı Nanotaşıyıcılar	Siklodekstrin	- Düşük toksisite - Yüklü moleküllerin biyolojik özelliklerinin artışına yardımcı moleküler taşıyıcı davranışı - Küçük boyut ve düşük immün uyarım	- Yüksek üretim maliyeti - Güvenliğine ilişkin kaygılar ve sınırlı çözünürlük	[98, 102-104]

Çizelge 2.2. siRNA taşınımında kullanılan çeşitli nanoparçacıkların avantaj ve dezavantajları (Devam)

Polimer Bazlı Nanotaşıyıcılar	Polietilenimin	- Suda çözünür - Yüksek transfeksiyon etkinliği - Diğer polimerlerle kombinasyon ve modifikasyon esnekliği	- Yüksek katyonik özellik nedeniyle yüksek sitotoksosite - Serum proteinleri ile spesifik olmayan bağlanma	[98, 99]
	Poli-L-co glikolik asit	-Yüksek yükleme kapasitesi -Biyoyumlu ve biyobozunur -siRNA'yı degradasyona karşı yüksek koruma gücü	-Hızlı salım nedeniyle yüksek sistemik toksisite	[105-107]
	Dendrimerler	-Kolay boyut ve şekil kontrolü -Suda çözünür ve biyoyumlu -Düşük immün yanıt -Nükleik asitlerle kolay elektrostatik etkileşim ve nükleaz aktivitesinden koruma	-Spesifik olmayan sitotoksosite -İlişkili biyo-aktiflerin sınırlı salımı -Hızlı atılım	[108-110]
İnorganik Nanotaşıyıcılar	Quantum Dotlar	-Boyut ve yapı temelli emisyon -Yüksek molar ekstinksiyon katsayısı -Yüksek foto ve kimyasal kararlılık -Sinerjistik teşhis ve terapötik uygulamalarda kullanım potansiyeli	-Potansiyel toksisite -Partikül agregasyonu, bozunma	[111-113]
	Altın Nanoparçacıklar	-Geniş yüzey alanı -Kolay sentez, modifikasyon ve biyokonjugasyon -Rasyonel stabilite ve biyoyumluluk -Farklı uygulamalarda kullanım potansiyeli (hedefleme, teşhis, tedavi vb.)	-Pahalı büyük çaplı üretim -Yapışkanlık ve kısıtlı <i>in vivo</i> kararlılık -Biyobozunur olmama	[114-116]
	Manyetik Nanoparçacıklar (MNP"er)	-Geniş yüzey alanı -Küçük boyuta bağlı uzun süreli dolaşım ve dokuya geçişte artış -Uzaktan kontrollü hızlı taşınımında etkili yüksek manyetizasyon -Kontrollü kümelenme -Farklı uygulamalarda kullanım potansiyeli (hedefleme, teşhis, tedavi vb.)	-Zayıf kolloidal stabilite -Sınırlı biyoyumluluk -Sitotoksosite -Biyobozunur olmama	[114, 117-120]

Çizelge 2.2. siRNA taşınımında kullanılan çeşitli nanoparçacıkların avantaj ve dezavantajları (Devam)

İnorganik Nanotaşıyıcılar	Silika Nanoparçacıklar (MSNP"er)	-Nanopor formasyonu ve yüzey modifikasyonu kolay -Küçük boyutta üretilebilme -İntrinsik biyoyumlu ve biyoyumlu	-Aktif silanol grupları nedeniyle <i>in vivo</i> 'da metabolik değişikliklere sebebiyet ve toksik etki	[121-125]
Diğer Nanotaşıyıcılar	Proteinler	-siRNA'ya yüksek avidite ile bağlanma -Biyoyumlu -İmmün yanıtı uyarmama	-Proteinlerin saflaştırılmasında zorluk	[99, 126]
	Hidrojeller	-Kolay sentez ve korunan fizikokimyasal özellikler -Seçici yüzey-fonksiyonelleşme -Yüksek gözeneklilik ve yükleme kapasitesi -Hedef dokulara kontrollü ve uzatılmış salım -Biyoyumluluk ve biyobozunurluk	-Yüksek üretim maliyeti -Kısıtlı kararlılık	[127-129]

Son zamanlarda, gen iletiminde vektör olarak kullanımlarının önemi artan [130] nanoparçacıklar, ebatları 10-1000 nm aralığında değişen, çözelti şeklindeki ya da katı haldeki partiküllerdir [131]. Nanoparçacıkların taşınımında kullanım avantajlarından birisi, nano-taşıyıcıların tümörlerde normal dokulardan çok daha yüksek konsantrasyonlarda birikmesini sağlayan artan geçirgenlik ve tutulum etkisidir (EPR) [132]. Nano taşıyıcılar, RNAi moleküllerini enzimatik bozunma ve immün yanıtı karşı koruyabilmelerinin yanı sıra, hücre membranından geçişte diğer taşıyıcılara göre çok daha yüksek taşıma verimliliğine sahip olup [133], boyut ve yüzey kaplamalarının uygun olması durumunda taşınan moleküllerin hedefe ulaşmasını mümkün kılar [134].

Katyonik polimer nanoparçacıkları, lipit bazlı sistemler ve benzerleri, organik nanoparçacıklar sınıfına girmektedir ve kimyasal bağlanma veya fiziksel gömme yoluyla bu organik nanoparçacıklara ilaçlar dahil edilebilir [135]. Kitosan gibi çeşitli doğal polimerler ve poli-L-lizin (PLL), polietilenglikol (PEG), biyoyumlulukları arttırılarak polietilenimin, katyonik dendrimerler gibi sentetik

polimerler ile hazırlanan kompleks ve nanoparçacıklar, siRNA'nın hücre içine taşınımında kullanılmışlardır. Bunlar, polikasyon veya polikasyon içeren blok polimerlerdir ve siRNA ile inter-polielektrolit kompleksler (IPEC) veya blok iyonomer kompleksler (BIC) oluşturma yeteneğindedirler. Günümüzde, gen tedavisinde kullanılan IPEC sistemleri, PEI, PLL, polinükleik asitler (DNA veya RNA) ve polikasyon komplekslerinden oluşurlar. Zıt yüklü polielektrolitler arasındaki güçlü elektrostatik etkileşimler, kendiliğinden toplanmayı sağlar ve enzimatik parçalanmayı önemli ölçüde önler.

Sentetik polimerler, kimyasal modifikasyonlarla geliştirilebilir. Örneğin, lineer polietilenglikol (PEG), yoğun globuler PLL dendrimeri ile konjuge edildiğinde suda çözünebilen poli-iyonik sferik bir kompleks olan PEG-blok-PLL dendrimerlerini oluşturur. PEI, RNAi taşınımında yaygın olarak çalışılmış katyonik bir polimerdir. Polietilenimin (PEI) ve mannoz-PEI, transferrin-PEI ve lineer-PEI konjugatları, jelatin ve kitosan, metakrilad/metakrilamid polimerleri ve pridinium surfaktantlar gibi kimyasallar (çoğunlukla polimerler) ile DNA taşınımının artırılmasına çalışılmaktadır [136]. Bununla birlikte, PEI, özellikle sistemik uygulama sırasında, yüksek toksisite profili ve *in vivo* kararsızlığı nedeniyle klinik olarak kullanılamamış [137], sonraki çalışmalarda PEG gibi biyouyumlu malzemelerle kullanılarak sitotoksitesi düşürülmeye çalışılmıştır. Örneğin, Kim vd. siRNA konjuge-PEI/PEG polielektrolit komplekslerini geliştirmiş ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) siRNA'sı içeren bu PEG'lenmiş polileksler tümör bölgelerinde birikme göstermiştir. VEGF'nin baskılanması sonucunda ise mikrodamar oluşumu engellenerek tümör büyümesi durdurulabilmiştir [138]. RNAi mekanizmasının kullanıldığı başka bir çalışmada, toksik olmayan ve düşük molekül ağırlıklı polietilenimin (2000 Da) HA ile konjuge edilerek blok-kopolimer siRNA/(PEI-SS)-b-HA oluşturulmuş, bu sayede serum stabilitesi artırılarak hyalüronik asit reseptör aracılı endositoz ile siRNA'ların hedefe spesifik hücresel alımı kolaylaştırılmış ve sonuç olarak *in vitro* gen susturma etkinliği araştırılan kompleksin mRNA seviyesinde %50-80 arasındaki azalma ile VEGF (damar endotelial büyüme faktörü) aracılı tümör büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir [139].

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda lipozomlar, miseller, emülsiyonlar ve katı lipid nanoparçacıkları (SLN'ler) dahil olmak üzere birçok farklı lipid bazlı sistem bildirilmiştir. siRNA taşıyıcıları olarak genellikle, negatif yüklü nükleik asitlerle kolay birleşebilmeleri sebebiyle katyonik lipidler kullanılmıştır [140]. Lipid bazlı nanoparçacıkların fizikokimyasal özellikleri (örneğin, yapı, boyut ve yüzey yükü), lipid kompozisyonu, ilaç / lipid oranı ve üretim prosesi değiştirilerek optimize edilebilir. Son zamanlarda ise RNAi'nin hücre içine verilmesinde, insan vücudundaki üstün stabiliteleri sayesinde, sterilize edilebilen ve dondurularak kurutulabilen, 10-1000 nm arasındaki büyüklüklere sahip SLN'ler kullanılmıştır [141].

Diğer taraftan, mezoporoz silika nanoparçacıklar (MSN'ler), karbon nanotüpler, kuantum noktalar ve metal nanoparçacıklar gibi giderek artan sayıda inorganik madde, RNAi'nin aktarımı için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. İnorganik nanomalzemeler, inorganik parçacıklar ve biyobozunur polikasyon ile sentezlenir ve gen terapide yeni bir nanoboyutlu ilaç taşıyıcı olarak rol alırlar [142]. Tek boyutlu mezoporları, kolay işlevselleşme, biyouyumluluk, yüksek yüzey alanı, geniş gözenek hacmi ve biyobozunurluk gibi benzersiz özelliklerinden dolayı MSN'ler, inorganik nano-taşıyıcılar arasında en sık kullanılanlardır [143, 144]. siRNA yükleme etkinliğini ve MSN'lerin hücresel alım etkinliğini arttırmak için, MSN'lerin yüzeyleri veya iç gözenekleri katyonik polimerlerle kaplanabilmektedir. Örneğin Li vd.'nin yapmış oldukları çalışmada MSN'lerin iç gözenekleri siRNA ile yüklenmiş ve sonrasında nanoparçacık yüzeyleri katyonik polimer PEI ve füzojenik peptit KALA (30 amino asitten oluşan katyonik bir peptit) ile kaplanmıştır. Sentezlenen taşıyıcı sistemi ile siRNA aktarımı sonucu, VEGF proteini ekspresyonu ve tümör anjiyogenezini inhibe edilmiş, böylece tümör büyümesi baskılanmıştır [145].

Biyomedikal uygulamalarda altın nanoparçacıklar (AuNP'ler) da büyük ilgi çekmektedir. siRNA'lar AuNP'lere, altın-tiyol bağlanması yoluyla doğrudan konjuge edilebilir. Conde vd. AuNP'leri, akciğer kanserini hedef almak için terapötik bir ajan olarak siRNA ve arginin-glisil-aspartik asit (RGD) peptidi ile

işlevselleştirmişlerdir [146]. Ayrıca kanser hücrelerini hedefleme kabiliyeti kazandırmak amacıyla AuNP'ler, tek-değişken zincirli fragment, transferrin ve prostata-özü membranı hedefleyen bir aptamer ile konjuge edilmiştir [147-149]. Ekzozom-benzeri nanovesiküllerin taşıyıcı olarak kullanıldığı bir çalışmada ise, yüksek üretim verimi sağlanmış ve anti-kanser kemoterapötiklerinin hücrelere iletilebildiği gösterilmiştir [150]. Lunavat vd. ekzozom-benzeri nanovesiküllerin üretim aşamasındaki verimlerinin ekzozomlara göre daha yüksek olduğu ve üretimleri için özgün yüzey moleküllerini ifade eden tasarlanmış hücrelerden yararlanılabileceği gibi çeşitli avantajlarını belirtmişlerdir [151]. Bu nedenle, ekzozom-benzeri nanovesiküller, RNAi'nin aktarımı ve muhtemelen farklı hastalık tiplerinin tedavisi için değerli nanotaşıyıcılardandır [152]. Lunavat vd.'nin yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, siRNA'lar ekzozom-benzeri nanovesiküllere ya ekzogen olarak yüklenmiş, ya da endojen olarak üretilmiştir ve her iki yüklenme durumunda da hedef gen ekspresyonları önemli derecede azalmıştır [26, 153].

2.3. C-X-C Kemokin Reseptör 4

Kemokinler çeşitli stromal ve epitelyal hücreler tarafından salgılanan, hücrelerin kendi kemokin reseptörleri ile etkileşimi yoluyla konsantrasyon gradyanı-sürücülü kemotaktik göçünü tetikleyebilen sinyal proteinleridir [26]. N-terminal sisteinlerin sayısına ve aralığına göre, kemokin reseptörleri dört gruba ayrılır (CXC, CX3C, CC ve CX) [154]. Tümü yedi transmembran G-protein-bağı reseptör ailesine ait 19 farklı kemokin reseptörü vardır. Tümörlerde, karmaşık bir kemokin ve kemokin reseptör ağı, maddelerin tümör mikro çevresine girişini ve mikro çevresinden çıkışını kontrol ederek, tümör hücrelerinin metastatik yayılımının kritik kısımlarına aracılık eder [155]. Metastaz bölgesinde eksprese edilen ilgili kemokinler, tümör hücrelerinin uzak organ bölgelerine taşınımını yönlendiren kemo-çekici sinyaller sağlar. Farklı kanser türlerinden gelen hücreler, kemokin reseptörlerinin farklı ekspresyon profillerine sahip olsalar da, CXC reseptörü 4 (CXCR4), insan kanserlerinde en yaygın olarak eksprese edilen kemokin reseptörüdür ve bu, onu kanser tedavisi için kemokin ağı içinde en umut verici hedef kılar.

2.3.1. CXCR4/CXCL12 Sinyal Yolağı

CXCL12'nin CXCR4'e bağlanması, çoklu akış aşağı sinyal yollarını başlatır ve bu, artan hücre içi kalsiyum akışı, gen transkripsiyonu, kemotaksi, hücre sağkalımı ve proliferasyon gibi çeşitli tepkilerle sonuçlanır [156]. Heterotrimerik G proteini aktive edilir ve GTP'ye bağlı α ve $\beta\gamma$ alt birimlerine ayrılır [157]. $G\beta\gamma$ alt birimleri iki ana enzimi, fosfolipaz C- β (PLC- β) ve bir fosfatidilinositol-3-OH kinazı (PI3K) aktive eder. Fosfatidilinositol (4, 5)-bifosfat, PLC- β ile iki sekonder haberciye, inositol (1, 4, 5) -trisfosfat (IP3) ve diaçilgliserol (DAG) halinde kesilir. IP3 hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımına neden olur ve DAG Ca^{2+} ile birlikte protein kinaz C ve mitojenle aktive protein kinazı (MAPK) aktive ederek hücre göçüne katkıda bulunur [158]. $G\alpha$ veya $G\beta\gamma$ alt birimleri, ilgili adezyon fokal tirozin kinaz (RAFTK), adaptör molekülü p130 Cas ve sitosikletal protein paksillin dahil olmak üzere fokal adezyonların bileşenlerinin tirozin fosforilasyonuna yol açan PI3K'yı aktive ederek, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine ve hücre göçü için gerekli değişikliklere katkıda bulunmuş olur [159]. Transkripsiyon ve gen ekspresyonu, PI3K-AKT-NF- κ B, MEK1/2 ve ERK1/2 eksenlerinden sinyal göndererek G α i tarafından düzenlenir [160]. Aktive olan AKT, hücrelerin hayatta kalmasını düzenleyebilir. CXCR4'ün boyutlandırılması, hücre morfolojisi değişikliklerini ve kemotaktik tepkileri destekleyen JAK/STAT yolu ile G proteininden bağımsız sinyalleşmeye yol açar [161].

2.3.2. CXCR4'ün Kanser ve Kanser Metastazında Rolü

CXCR4 aşırı ekspresyonu, meme, yumurtalık, prostat, özefagus, pankreas, melanom ve renal hücreli karsinom dahil olmak üzere 20'den fazla insan tümör tipinde bildirilmiştir [162]. CXCR4 ekspresyonundaki artış, çoklu büyüme, transkripsiyon ve hipoksi ile indüklenebilir faktörlerdeki değişikliklerle ilişkilidir [163-165]. Birçok klinik öncesi ve klinik çalışmada, CXCR4 ekspresyonu ile metastaz arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmiş ve CXCR4 ekspresyonunun kötü sağkalım ve agresif kanser tipleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. CXCR4 aşırı ekspresyonu, zayıf bir prognostik biyobelirteç olarak tanımlanmıştır. Örneğin 2.000 invazif meme kanseri ve 214 pre-invaziv meme örneğinin kullanıldığı mikroçip çalışmasında, CXCR4'ün kanser gelişimindeki

kritik rolü ortaya konmuştur [166]. Primer tümörlerde yüksek CXCR4 seviyeleri, yine yüksek kemik metastazı gelişme riski ile ilişkili bulunmuştur [167]. Başka bir klinik çalışma, CXCR4'ün lenfatik sistem yoluyla metastazı desteklediğini göstermiştir [168]. Kanseri hücrelerinde yüksek CXCR4 seviyeleri de yine artan kanser tekrarlama riski ile ilişkili bulunmuştur [169]. PI3K, MAPK ve Erk1/2 gibi hücre içi sinyal yollarını aktive eden CXCR4'ün kanser hücresinin hayatta kalması, çoğalması, istilas ve göçünde kritik bir rolü vardır [170-173]. Fokal adezyon kompleksleri ve matris metaloproteinazlarının CXCR4 kaynaklı aktivasyonu, hem hücre dışı matrisin bozulmasına aracılık eder, hem de kanser hücrelerinin istilasına katkıda bulunur.

Beyin, kemik iliği, akciğerler ve karaciğer dokularında CXCL12 ekspresyon seviyeleri yükselir. CXCL12 konsantrasyon gradyanları daha sonra dolaşımdaki CXCR4 pozitif tümör hücrelerinin hareketini tetikler ve ekstrasvazasyon ve organa özgü metastazdan sorumludur [174]. Pankreatik kanser patolojisine bağlı çeşitli kemokin yolları arasında, CXCR4/SDF1 eksenini PC'nin invazyonunda ve metastazında kritik rol oynar [175-177]. Stromal hücreler, PC hücrelerinde CXCR4'ü aktive eden ve gelişmiş kemotaksi, transendotelial göç ve invazyon ile sonuçlanan bol miktarda SDF-1 üretir [178]. CXCR4 ekspresyon artışı ile Sonic Hedgehog yolağı değişerek, kök hücre benzeri fenotip, gelişmiş desmoplazi, kimyasal direnç ve PC'nin invazyonunda artış görülür [179]. Geçmişe yönelik birçok klinik araştırma, PC hastalarında düşük sağkalım ve metastazı CXCR4 ekspresyonu ile doğrudan ilişkilendirmiştir [180, 181]. CXCR4/CXCL12 eksenini, gelişmiş kanser tedavileri için yeni aktarım stratejileri geliştirmek üzere öne çıkan önemli bir hedeftir [182, 183]. CXCR4 aşırı ekspresyonunu, ilaçların tümörlere ligand aracılı taşınımında basit bir hedef olarak kullanmanın yanı sıra, CXCR4 antagonistleri kullanarak veya CXCR4 ifadesini siRNA ile susturarak CXCR4/CXCL12 etkileşiminin engellenmesi, özellikle kemoterapi ve radyoterapi ile birleştirildiğinde primer tümör büyümesini önleme ve metastazı azaltma potansiyeline sahiptir. Şekil 2.3'te kanser tedavisi için ilaç taşınımında CXCR4'ün başlıca kullanımları gösterilmiş, Çizelge 2.3'te ise CXCR4'ün ilaç taşınımında kullanıldığı temsili örnekler özetlenmiştir [184].

Çizelge 2.3. CXCR4 hedefli ilaç dağıtım sistemlerine örnekler (Devam)

4F-benzoil TE14011 peptid analoğu	Lipopleksler	Raportör plasmid DNA	Rat glioma hücrelerine gen taşımasının artırılması	[191]
Ac-TZ 14011 peptidi	Radyofarmasö tik	¹¹¹ In	Metastatik pankreas tümörlerinde CXCR4 ekspresyonunun görüntülenmesi (<i>in vivo</i>)	[192]
AC-TZ-14011 peptidi	Dendrimerler	¹¹¹ In ve Cy 5.5 boyası	Meme kanserinde CXCR4 ekspresyonunun görüntülenmesi (<i>in vivo</i>)	[193, 194]
X4-2-6 peptidi	Kendiliğinden düzenlenen peptid nanoparçacık- ları	Antikanser ilaç HKH-40A	Meme tümör metastazı inhibisyonu (<i>in vivo</i>)	[195]
Anti-CXCR4 antikoru	Lipozomlar	Doksorubisin	Meme kanserinde antikanser ilaç etkinliği ve taşımasının arttırılması (<i>in vitro</i>)	[196]
Anti-CXCR4 antikoru	Lipozomlar	Anti-lipokalin- 2 siRNA	Metastatik meme kanserinde CXCR4 ve Lcn2 aracılı göç yolaklarının inhibisyonu (<i>in vitro</i>)	[182]
Anti-CXCR4 antikoru	Radyofarmasö tik	¹¹¹ In	SPECT/CT ile beyin tümörünün görüntülenmesi (<i>in vivo</i>)	[197]
AMD3100	Lipopleksler ve polipeksler	Raportör plasmid DNA	CXCR4-pozitif insan lenfoma Jurkat hücrelerinde gen transfeksiyonunun arttırılması	[198]
AMD3100	PLGA nanoparçacık- ları	siRNA (anti GFP)	Üçlü negatif meme kanseri ve metastatik meme kanseri tedavisinde alımın arttırılması, CXCR4 sinyalleşmenin baskılanması ve siRNA taşıması (<i>in vitro</i>)	[199]
AMD3100	PLGA nanoparçacık- ları	Sorafenib	Malignant hepatosellüler karsinomanın hedeflenmesi ve sorafenib ile antikanser etkinin arttırılması (<i>in vivo</i>)	[200]
AMD3100	Polipeksler	siRNA (si PLK1)	Metastaz inhibisyonu amacıyla eş zamanlı gen taşıması ve CXCR4 blokasyonu (<i>in vivo, in vitro</i>)	[201- 204]
AMD3100 türevleri	Polipeksler	Raportör plasmid DNA	Hücre invazyonunun inhibisyonu amacıyla eş zamanlı gen taşıması ve CXCR4 blokasyonu (<i>in vitro</i>)	[205]
Violojen dendrimerleri	Dendrimer polipeksler	TNFα plasmid DNA	Eş zamanlı olarak CXCR4 aracılı kanserde hücre invazyonunun önlenmesi ve TNFα-aracılı kanserde hücre ölümünün sağlanması (<i>in vitro</i>)	[206]

Çizelge 2.3. CXCR4 hedefli ilaç dağıtım sistemlerine örnekler (Devam)

AMD3100	Radyofarmasö tik	⁶⁴ Cu	PET ile insan meme kanseri kaynaklı akciğer metastazının görüntülenmesi (<i>in vivo</i>)	[207]
AMD3100	Radyofarmasö tik	⁶⁴ Cu	Beyin tümörü ve kolon tümörünün PET/CT ile görüntülenmesi (<i>in vivo</i>)	[208]
AMD3465	Polipeksler (P-SS-AMD)	MiR-200c mimic	CXCR4 antagonizması ile kansere hücre göçünün inhibisyonu (<i>in vitro</i>)	[209]
Klorokin	Polipeksler (PCQ)	MiR-210 inhibitörü	Eş zamanlı olarak hücre göçü inhibisyonunun ve hücre ölümünün sağlanması, endosomal kaçışın sağlanması (<i>in vitro</i>)	[210]
CXCR4 antagonisti	PEI-C polipeksleri	siRNA (anti VEGF)	CXCR4 antagonizması ile kansere hücre invazyonunun engellenmesi (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i>)	[211]

2.3.3. CXCR4 Geninin Susturulması

Yapılan çalışmalar ışığında, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kanser hücresi büyümesini ve metastazı yavaşlatmak amacıyla CXCR4 ekspresyonunun siRNA'larla spesifik hedeflenmesi ve susturulması önerilmiştir. Spermin ile modifiye dekstran temelli nanoparçacıklarca iletilen anti-CXCR4 siRNA, kolorektal kanserin karaciğer metastazında CXCR4 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmıştır [212, 213]. Çalışmada, spermin, katyonik dekstran elde etmek amacıyla indirgeyici aminasyon prosesi ile oksitlenmiş dekstran ile birleştirilmiş ve sonuçlar CXCR4 susturma işleminin, tedavi edilen hayvanların karaciğerindeki kanser hücresi ve lenfosit infiltrasyon derecesini azalttığını göstermiştir. Meme kanseri metastazında CXCR4'ü susturmanın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, siRNA taşıyıcısı olarak HER2-scFv ve arjinin nonamer peptid (e23sFv-9R) bazlı bir füzyon proteini sentezlenip test edilmiştir [5]. Anti-CXCR4 siRNA'nın e23sFv-9R taşıyıcısı tarafından verilmesi, CXCR4 ekspresyonunda azalma ve HER2-pozitif meme kanseri BT-474 hücre hattında proliferasyon ve metastazda azalma ile sonuçlanmıştır. Anti-CXCR4 siRNA'nın füzyon proteini tarafından sistemik olarak verilmesi ile tümör büyümesi önemli derecede baskılanabilmiş, metastazı

azaltılmış ve HER2 pozitif ksenografları içeren farelerde hayatta kalma süresi uzatılmıştır.

Tümör progresyonu, tümör içi hipoksi ve tümör dokusunda heterojen perfüzyon sağlayan anormal vasküler bir yapı ile ilişkilendirilmiştir [214]. Hipoksi, anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal geçiş, hücre dışı matriks degradasyonu ve kemotakside rol alan çoklu genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir [215]. CXCR4, hipoksi durumunda ekspresyonu arttığından hipoksi ile ilişkili olaylarda potansiyel bir hedeftir. Romain vd. hipoksinin kolon kanseri hücrelerinde CXCR4 ekspresyonunu arttırdığını ve kanser hücreleri normoksik koşullara döndüğü zaman bile CXCR4 ekspresyonunun 48 saate kadar yüksek kaldığını göstermiştir [216]. CXCR4 artışının bir sonucu olarak, kolon kanseri SW480 hücrelerinin göçü, normoksik koşullarla karşılaştırıldığında hipoksiste 6 kat artmıştır. Kısacası, CXCR4 gen susturma ile kanser hücrelerinin invazivitesinin artması önemli ölçüde azaltılabilir.

3. DENEYSEL YÖNTEMLER VE MALZEMELER

3.1. MALZEMELER

3.1.1. Sentetik siRNA

RNA interferans çalışmalarında CXCR4 genini baskılamak amacıyla ve CXCR4 proteinlerinin mRNA'larına komplementer dizilime sahip olan 19 mer'lik siRNA'lar kullanılmıştır. Eurofins (CXCR4 siRNA, NC siRNA ve NC FAM-siRNA) ve Dharmacon Research Inc. (GAPDH siRNA) firmalarından temin edilen liyofilize siRNA'lar (Çizelge 3.1) 1XsiRNA tamponu (pH 7,5) ile stok konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde, RNaz içermeyen saf su kullanılarak çözündürülmüş, ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan siRNA'lar

siRNA Dizi Adı	Dizi	Ref.
CXCR4 siRNA	5'-UAAAAUCUCCUGCCCACCCdTdT-3'	[217]
	5'-CAACGGAUUUGGUCGUAUU-3'	
GAPDH siRNA	5'-GACCUCAACUACAUGGUUU-3'	[218]
(Pozitif Kontrol)	5'-UGGUUUACAUGUCCAAUA-3'	
	5'-GUCAACGGAUUUGGUCGUA-3'	
NC siRNA	5'-GGUGAACUGUCUGGAUAAG-3'	[217]
(Negatif Kontrol)		
NC FAM-siRNA	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'	[219]
(Negatif Kontrol)	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'	

3.1.2. Kullanılan Primerler

Real-Time PCR çalışmalarında kullanılan primerler (Çizelge 3.2) Oligomer firmasından liyofilize formda temin edilmiş ve stok konsantrasyonları 100 µM olacak şekilde RNaz içermeyen saf su kullanılarak çözündürülmüş, ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan primerler

Primer Dizi Adı	Dizi	Ref.
CXCR4 Forward	5'-GATGCCGTGGCAAACCTGGTA-3'	[5]
CXCR4 Reverse	5'-CCAGACTGATGAAGGCCAGGA-3'	
GAPDH Forward	5'-AACGGATTTGGTCGTATTG-3'	[220]
GAPDH Reverse	5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'	

3.1.3. Kullanılan Hücre Hatları

3.1.3.1. L929 (Fare Fibroblast Hücre Hattı)

100 günlük erkek fareden (C3H/An) alınan, WR Earle tarafından stoklanan, yüzeye tutunan bağ doku hücreleridir. Kültür çalışmalarında DMEM (Biological Industries, İsrail), FBS (Fetal Sığır Serum, Biological Industries, İsrail) ve antibiyotik olarak penisilin/streptomisin kullanılmıştır.

3.1.3.2. MDA-MB-231 (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)

51 yaşındaki, adenokarsinoma hastalığı olan kadından alınarak, R Cailleau tarafından stoklanan, yüzeye tutunan, epitelyal morfolojiye sahip, meme bezinden izole edilmiş hücrelerdir. Kültür çalışmalarında DMEM (Biological Industries, İsrail), FBS ve antibiyotik olarak penisilin/streptomisin kullanılmıştır.

3.1.3.3. CAPAN-1 (İnsan Pankreas Kanseri Hücre Hattı)

40 yaşındaki, adenokarsinoma hastalığı olan erkekten alınarak, J Fogh tarafından stoklanan, yüzeye tutunan, epitelyal morfolojiye sahip, pankreasın metastatik bölgesinden izole edilmiş hücrelerdir. Kültür çalışmalarında IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Catalog No. 30-2005), kullanılan diğer hatlardan farklı olarak %20 oranında FBS ve antibiyotik olarak penisilin/streptomisin kullanılmıştır.

Tüm hücrelerin yüzeyden kaldırılmaları amacıyla PBS içerisinde %0,05'lik tripsin-EDTA çözeltisi (Biological Industries, İsrail) kullanılmış, hücrelerin sayımında ise boya olarak tripan mavisi kullanılmıştır.

3.1.4. Kimyasallar ve Çözeltiler

Tüm hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar, analitik saflıkta olmalarından dolayı herhangi bir ekstra saflaştırma işlemine tabi tutulmamışlardır. Başlıca kullanılan sarf malzemeler; 12-96 kuyucuklu plakalar (Nest, China) ve 25-75 cm²'lik hücre kültür flaskları (Nest, China), 0,2 µm filtre (Sartorius, Germany), 15 mL'lik santrifüj tüpü (Nunc, Almanya), mikropipet (10 µm-100 µm-1000 µm Scaltec, Almanya), 96 e-plate (RTCA Resistor plate 96, Roche, Almanya) ve tek kullanımlık pipetlerdir (2-25 mL). Çalışmalar süresince kullanılan başlıca ekipmanlar ise, Laminar akışlı kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İdam, Türkiye), soğutmalı santrifüj (ROTINA 380R Hettich, Almanya), inverted mikroskop (Leica DM6000B, İsveç), vorteks, elisa plate okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2), karbondioksitli etüv (Binder CB150), hemositometri (İnvitrogen, Countess), xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemleri) (Roche, Almanya), hassas terazi (Mettler toledo MS204), Qubit (İnvitrogen) cihazı, RT-PCR çalışmalarında LightCycler 480 II sistemi (Roche, Almanya), Termal Cycle Cihazıdır (Techne TC-Plus).

Agaroz jel elektroforezi için %1'lik (a/h) agaroz Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponunda çözülerek hazırlanmıştır. TBE tamponu (x10) pH 8,9 için 54 g Tris base, 27,5 g borik asit ve 7,44 g Na₂EDTA, saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Etidyum bromür, 10 mg/mL derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında kullanılan tetrazolyum tuzu (WST-1) için standart WST-1 analiz kit (Biological Industries, İsrail) kullanılmıştır. İkili boyama solüsyonu için 1 mL PBS'de 10 mg Ribonükleaz A (Serva, İsrail), 1 mL PBS'de 200 µg Hoechst 33342 (Serva, İsrail) ve 1 mL PBS'de 100 µg propidium iodide (Serva, İsrail) olacak şekilde hazırlanır. RNA izole etmek için, High Pure RNA Isolation Kiti (Roche, Almanya) kullanılmıştır. Elde edilen

RNA'lardan, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti (Roche, Almanya) ile cDNA'lar elde edilmiştir. Real Time PCR deneylerinde, CXCR-4 gen ekspresyonunun araştırılması için, Fast Start Essential DNA Green Master (Roche, Almanya) kiti kullanılmıştır. Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler, 121°C'da 20 dakika sterilizasyona tabi tutulmuştur.

3.2. DENEYSEL YÖNTEMLER

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar başlıca üç aşamadan oluşmaktadır (i) Sentezlenen PEI ve Au temelli parçacıkların fizikokimyasal özellikleri farklı karakterizasyon yöntemleri ile (SEM, Dinamik Işık Saçılımı (Zeta sizer), ¹H-NMR, FT-IR, Elementel analiz ve UV-Vis spektroskopisi) belirlenmiştir; (ii) sentezlenen parçacıkların siRNA molekülleri ile uygun oranlarda bir araya getirilmesi sağlanmış ve parçacık/siRNA etkileşimi de yine Zeta sizer ile yapılan zeta yük analizi ve jelde gecikme analizi ile doğrulanmıştır; (iii) sentezlenen parçacıkların tek başlarına ve/veya siRNA ile, normal hücre hattı L929, meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 ve pankreas kanseri hücre hattı CAPAN-1 üzerindeki sitotoksik, apoptotik-nekrotik, antiproliferatif ve hedef genin ekspresyonu üzerindeki etkileri yapılan *in vitro* çalışmaları ile araştırılmıştır.

3.2.1. Polietilenimin Temelli Non-Viral Taşıyıcıların Sentezi

Bu çalışma kapsamında siRNA taşıyıcısı olarak uygun polietilenimin-hyalüronik asit konjugatları ve bu konjugatların yanısıra altın içeren ve doksorubisinle de etkileştirilen polietilenimin-hyalüronik asit konjugatları sentezlenmiştir.

3.2.1.1. Polietilenimin-Hyalüronik Asit Konjugatlarının Sentezi Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmaları kapsamında öncelikle Polyethylenimine (2 kDa, Sigma Aldrich (St. Louis, MO)) ve Hyalüronik asit (M_A: 1,1-2 milyon Da, Acros Organics USA (Morris Plains, NJ))'in sırasıyla en uygun hangi oranda (oran optimizasyonu) ve hangi yöntem (yöntem optimizasyonu) ile konjugat oluşturabileceği belirlenmiş, ardından 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)/N-

Hydroxysuccinimide (NHS) mekanizması ile aktifleştirilen hyalüronik asit polimerlerinin reaksiyon ortamında kendiliğinden parçacık oluşturması araştırılmıştır.

3.2.1.1.1. PEI-HA Konjugatlarının Oluşturulmasında Oran Optimizasyon Çalışması

Bu çalışmada en uygun PEI-HA oranı araştırılmıştır. PEI-HA (a/a) oranları; 2:1, 5:1, 20:1, 30:1, 50:1, 100:1 ve 200:1 olarak belirlenmiştir [221, 222]. Bunun için 20'şer mg HA (M_A : 1,1-2 milyon Da) tartılarak PEI'nin (408700 Aldrich, 2 kDa) değişen miktarları (sırasıyla, 40 mg-100 mg-400 mg-600 mg-1000 mg-2000 mg-4000 mg) ile reaksiyona sokulmuştur. Altı ayrı oran için de 20'şer mg HA tartılarak 10 mL ddH₂O'da çözülmüştür. Belirlenen 6 grup için de EDC (0,15 mmol, Sigma Aldrich (St. Louis, MO)) ve NHS (0,15 mmol, Pierce Protein Research Products (Rockford, IL)) de ddH₂O:DMSO (1:1, h/h) karışımında çözülerek HA çözeltisi üzerine 1'er mL hacimde ilave edilmiş ve 5 M HCl ile pH 6,5'a ayarlanan örneklerin karışımına 4 saat devam edilmiştir. Ardından PEI'in belirlenen miktarları damla ilave yöntemi ile hızla karıştırılan HA çözeltisine ilave edilmiş ve pH'ı 1 M NaOH ilavesi ile 7,0'ye ayarlanan örneklerin karıştırma işlemine 24 saat daha devam edildikten sonra reaksiyon karışımı ddH₂O'ya karşı 24 saat (8 saat aralıkla ddH₂O 3 kez değiştirilmiştir) boyunca diyaliz edilmiştir (MWCO 12,000 Da, Sigma Aldrich, (St. Louis, MO)).

3.2.1.1.2. PEI-HA Konjugatlarının Oluşturulmasında Yöntem Optimizasyon Çalışması

Bu çalışmada uygun taşıyıcıların hazırlığında kolay uygulanabilir ve istenilen parçacık büyüklüğüne ulaşmak için etkili bir yöntem araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında uygulanan yöntemler Şekil 3.1'de şematize edilmiştir. Bunun için, 3 ayrı beherde 20'şer mg HA tartılmış ve ddH₂O'da çözülmüştür. Ardından EDC (0,15 mmol) ve NHS (0,15 mmol), 3.2.1.1.1'de anlatıldığı gibi HA çözeltisine ilave edilmiş ve 4 saat karıştırılmıştır. Her bir uygulama için ayrı ayrı beherlerde uygun miktarda PEI (1:50 (a/a) oranında HA:PEI için) çözeltisi hazırlanarak üzerine Şekil 3.1'de gösterildiği şekilde (Yöntem 1, Yöntem 2 ve Yöntem 3) şırınga

içerisine alınan HA çözeltileri ilave edilmiş (Yöntem 1 de manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılan PEI çözeltisine, şırıngaya alınan HA çözeltisi damla damla ilave edilmiş, Yöntem 2’de şırıngaya alınan HA hızlı bir şekilde homojenizatör - 20,000 rpm’de çalıştırılan- daldırılmış PEI çözeltisine ilave edilmiş ve Yöntem 3’te petriye dökülen PEI çözeltisi (20 mL) sabit bir dönme hızında iken şırınga ile PEI çözeltisi üzerine HA çözeltisi spreyleneştir (17,5 mV, 9 mL saat pompalama hızında)), reaksiyon ortamı 5 M HCl ile pH 6,5’e ayarlandıktan sonra karışıma 24 saat daha devam edilmiş ve sonrasında pH’ı 7,0’ye ayarlanarak reaksiyonu sonlandırılan çözeltiler 3.2.1.1.1.’de anlatıldığı gibi diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Diyalizin ardından petrilere alınan örnekler petri kaplarında daha sonra gerçekleştirilecek olan uygulamalarda kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir (-50°C, 0,016 mbar, 24 saat).



Şekil 3.1. PEI-HA konjugatları oluşturulmasında etkinliği araştırılan yöntemler

3.2.1.1.3. Partikül Boyut Dağılımının Azaltılması ve HA’nın Reaksiyon Ortamında Kendiliğinden Parçacık Oluşturmasının İncelenmesi

Bu çalışmada öncelikle HA’nın reaksiyon ortamında kendiliğinden parçacık oluşturma özelliği araştırılmıştır. Bunun için 20’şer mg HA tartılarak 5’er mL ddH₂O’da çözülmüştür ve HA aktif grubu için üzerine DMSO:ddH₂O (1:1 h/h, toplam hacim 2 mL)’da hazırlanan EDC (0,15 mmol) ve NHS (0,15 mmol) ilave edilip, 4 saat karışıma devam edilmiştir. Aktifleştirilmemiş HA grubu ise direkt 4 saat karışıma alınmış ve her iki grubun da PEI ile konjugasyonu sağlanmadan,

karakterizasyon çalışmaları ile kendiliğinden parçacık oluşturma kapasitesi test edilmiştir.

Bu çalışmada ayrıca, oluşturulan PEI-HA konjugatlarının boyut dağılımını azaltmak amacıyla homojenizatör yöntemi kullanılarak PEI:HA, 50:1 oranı için 3.2.1.1.1. kısmında bahsedildiği gibi sentez tekrarlanmış, ancak bu kez elde edilen reaksiyon karışımının yarısı diyaliz öncesinde 0,45 µm'lik filtreden geçirilmiş, diğer yarısı ise direkt diyalize alınmıştır. Bu sayede diyaliz öncesinde gerçekleştirilecek olan filtrasyon işlemi ile sentez karışımındaki parçacık boyut dağılımının azaltılması ve 0,45 µm'den daha küçük parçacıkların elde edilmesi amaçlanmıştır.

3.2.1.1.4. Biyobozunur PEI-SS-HA Konjugatların Oluşturulması

Bu çalışmada toksik olmayan düşük molekül ağırlıklı PEI (2 kDa), HA ile konjugasyon öncesinde sistamin bisakrilamid ile çapraz bağlanarak (CBA'nın akrilol grubu ile dallanmış PEI'nin amin grubu arasında Michael katılma tepkimesi ile) vücut içerisinde indirgenebilir PEI-SS sentezi gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Ardından PEI-SS'nin amin grupları, HA'nın karboksil grupları ile indirgeyici amidasyon reaksiyonu sonucunda aşı-kopolimer formunda konjuge edilmiştir [139]. Bu çalışma kapsamında, stok PEI çözeltisinden 1 mmol PEI alınarak 20 mL %90 sulu metanol karışımı içerisine ilave edilmiş, 3 dakika karıştırıldıktan sonra üzerine 2 mmol CBA tartılarak ilave edilmiş, ve karıştırma işlemine argon gazı altında, 50°C sıcaklıkta ve karanlık bir ortamda 16 saat devam edilmiştir. Ardından 80 mg HA/8 mL ddH₂O üzerine 0,15'er mmol EDC ve NHS (2 mL DMSO: ddH₂O (1/1, h/h) içerisinde) ilave edilerek, karışıma 4 saat daha devam edilmiştir. 24 saatlik karışımın ardından elde edilen PEI-SS karışımı şırınga yardımı ile HA karışımı üzerine ilave edilmiş ve son karışımın pH'sı 6,5'a ayarlanarak karışıma 24 saat daha devam edilmiştir. Ardından pH'ı 7'ye ayarlanarak reaksiyonu sonlandırılan örnekler, 1 gün boyunca ddH₂O'ya karşı diyaliz edilmiştir. Diyalizin ardından ise örnekler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir.

3.2.1.2. Doksorubisin ile Etkileştirilen Altın-Polietilenimin-Hyalüronik Asit Konjugatların Sentezi

3.2.1.2.1. AuPEI NP'lerin Lazer Ablasyon Tekniği İle Sentezi

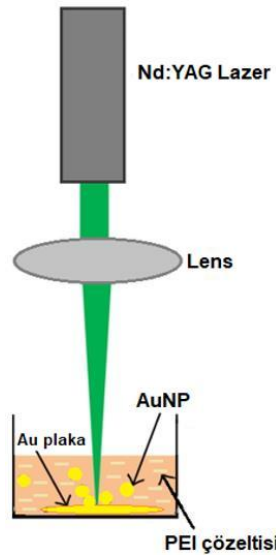
Bu çalışma kapsamında kemoterapötik ajan olarak Doksorubisin (Doksorubisin hidroklorür, 2 mg/mL, Fresenius Kabi (India)) ile bağlanacak olan AuPEI-HA parçacıklarının sentezi çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle AuPEI NP'lerin sentezi için %50'lik ticari PEI çözeltisinden son hacimde farklı oranlarda olacak şekilde (%0-%0,5-%5-%10-%50) kullanılarak, çözeltide negatif yüzey yüküne sahip AuNP'ler ile katyonik dallanmış (branched)-PEI (bPEI) arasında elektrostatik etkileşim sağlanmış ve sonuç olarak AuPEI NP'ler oluşturulmuştur (Çizelge 3.3).

Lazer ablasyon tekniği (Şekil 3.2) ile PEI kaplı Au nanoparçacıkları sentezlendikten sonra, homojenizatör ve damla ilave yöntemi birlikte uygulanarak AuPEI NP'lerine önceden aktiveleştirilmiş olan HA monomerleri bağlanmış ve sonuçta AuPEI-HA konjugatları oluşturulmuştur. En son aşamada ise oluşturulan konjugatlar Doksorubisin ile muamele edilerek, parçacıklar Doksorubisinle kaplanmıştır.

Çizelge 3.3. PEI kaplı Au nanoparçacık sentezinde reaksiyon koşulları

Örnek Adı	PEI (%)	PEI (mL)	ddH ₂ O (mL)	Altın miktarı (mg)	Son Hacim (mL)
AuNP/1	0	-	10	0,6	10
AuPEI NP/2	0,5	0,1	9,9	0,6	10
AuPEI NP/3	5	1	9	0,6	10
AuPEI NP/4	10	2	8	0,6	10
AuPEI NP/5	50	10	-	0,6	10

Lazer ablasyon tekniğinde (Şekil 3.2) kullanılan lazer Nd-YAG olup, uygulanan enerji 10 Hz, 1000 mJ, lazer ucu 1064 nm, fokal çap 3-4 mm ve uygulama süresi 5 dakikadır. Altın plaka, uygulanan lazer darbeleri sonucunda ablasyona uğratılmıştır.



Şekil 3.2. Lazer ablasyon tekniği ile AuNP ve AuPEI NP'lerin sentezi

3.2.1.2.2. AuPEI-HA-DOX Konjugatlarının Sentezi

Bu çalışmada öncelikle lazer ablasyon tekniği ile sentezlenmiş olan AuPEI NP örneklerinden, stabilitesi ve boyutu en uygun olan 3 numaralı (AuPEI NP/3) örneğin değişen oranları, aktiveştirilmiş HA ile reaksiyona sokulmuştur.

AuPEI-HA parçacık sentezi için bu çalışma kapsamında öncelikle 15 mg HA tartılarak, 12 mL ddH₂O'da çözülmüştür. Ardından 43,1 mg EDC ve 25,9 mg NHS tartılıp, 1 mL'de (DMSO: ddH₂O, 1:1, h/h) çözdürülüp HA üzerine ilave edilerek karıştırmaya 4 saat daha devam edilmiş, lazer ablasyon tekniği ile sentezlenen AuPEI NP/3 örneğinden, sırasıyla 5 ve 20'şer mL şırıngaya alınarak yine sırasıyla 5 ve 10 mL aktiveştirilen HA üzerine homojenizatör ile yüksek karıştırma altında (20,000 rpm) ve sonikatör cihazı içerisinde ilave edilmiştir. Elde edilen reaksiyon ortamlarının pH'ı 6-6,5 ayarlanarak 16 saatlik reaksiyon başlatılmıştır. 16 saatin ardından çözelti pH'ları 7'ye ayarlanarak reaksiyon sonlandırılmış ve her 2 grup örnek için de (AuPEI:HA, 5:5 ve 20:10 (1:1 ve 2:1 olarak isimlendirilmişlerdir)) son hacimde (5 mL) 50-100-150 µg olacak şekilde Doksorubisin, çözeltiler üzerine şırınga yardımı ile ilave edilerek 1 saat karıştırmaya bırakılmıştır.

3.2.2. Sentezlenen Konjugatların Karakterizasyonu

3.2.2.1. Sentezlenen Konjugatların Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi

Sentezlenen nanoparçacıklar, büyüklük ve yüzey özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla FEI marka / Quanta 450 FEG model taramalı elektron mikroskopunda (SEM; boyut analizi 50X-1,000.000X aralığında yapılabilmektedir) incelenmiştir. Bu amaçla, örnekler alüminyum grid üzerine yerleştirilerek inceleme yapılmıştır. Örneklerin tarama işlemi, belirlenen büyütme aralıklarında ve 20 kV artan voltaj koşullarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2. Sentezlenen Konjugatların Partikül Büyüklüğü Değerlerinin Ölçülmesi

Hazırlanan parçacıklarda büyüklük analizi, Malvern partikül ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Bu amaçla, nanoparçacık formülasyonları, deiyonize su içerisinde süspanse edilerek ölçülmüştür. Her bir formülasyon için, n=3 olacak şekilde ölçüm alınmıştır.

3.2.2.3. Sentezlenen Konjugatların Zeta Potansiyel Değerlerinin Ölçülmesi

Sentezlenen tüm konjugatlarda yüzeysel yük kontrolü çalışması, Malvern Zetasizer 2000 cihazında deiyonize su veya %10 FBS içeren besiyeri içerisinde 1 mg liyofilize nanoparçacık formülasyonları süspanse edilerek yapılmıştır. Belirlenen formülasyonlar için n=3 olacak şekilde ölçüm alınmıştır.

3.2.2.4. UV-VİS Spektroskopi Analizi

Lazer ablasyon tekniği ile sentezlenmiş olan AuNP'ler, AuPEI NP'ler ve bu parçacıkların HA ile oluşturduğu konjugatların Doksorubisin ile etkileşimi sonucunda elde edilen parçacıkların reaksiyon karışımlarındaki renk değişiminden yararlanarak kalitatif analizleri UV-VİS spektroskopi aracılığıyla yapılmıştır. Bu amaçla 400-600 nm dalga boyu aralığında yapılan spektral tarama ile sentezlenen farklı formülasyonların karakteristik λ_{max} 'ını gösteren absorbans eğrileri elde edilmiştir.

3.2.2.5. ¹H-NMR Analizi

H¹-NMR analizi için sentezlenen konjugatlardan 1'er mg tartılarak DMSO veya döteryumlu su ile çözdürülmüş ve oda sıcaklığında analiz edilmiştir (Bruker- 2' 300, 400 MHz, İsviçre).

3.2.2.6. FT-IR Spektrumu Analizi

Sentezlenen konjugat gruplarının kimyasal yapısı; Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrofotometresi (Bruker Vertex 70v, Germany) ile Kırıkkale Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda analiz edilmiştir. Her bir spektrum, ZnSe ATR kristal hücresi üstünde yapılan ölçümlerle 4 cm⁻¹ çözünürlük ve 16 tarama sayısı kullanılarak 4000–400 cm⁻¹ spektral aralıkta % transmittans'a karşı dalga sayısı (cm⁻¹) olarak çizilmiştir.

3.2.2.7. Elementel Analiz

Sentezlenen konjugatlardaki toplam azot, karbon, hidrojen ve kükürt içerikleri, Vario MICRO-cube Analyzer (Elementar Americas, USA) cihazı ile Kırıkkale Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. 1050°C'de gerçekleştirilen analiz süresince açığa çıkan H₂O, CO₂, N₂, SO₃ ve SO₂ gazlarının sinyalleri dedektörler ile tespit edilip, miktarsal analizi yapılmıştır. Sonuçlar her bir element için ağırlık yüzdesi olarak belirtilmiştir.

3.2.3. Sentezlenen Konjugattan Doksorubisinin Salımı Çalışması

Sentezlenen AuPEI-HA-DOX konjugatından DOX'in *in vitro* salımının araştırıldığı bu çalışma pH 5,4 ve pH 7,4 olmak üzere sırasıyla asetat ve fosfat tamponlarının kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle liyofilize AuPEI-HA-DOX konjugatından 5 mg/mL'şer tartılarak 1 mL asetat ya da fosfat tamponu içerisinde çözdürülmüş, sonrasında diyaliz membrana aktarılmıştır (MWCO = 12 kDa). Diyaliz membran ise 100'er mL salım ortamlarına (fosfat ve asetat tamponları) konularak, deney süresince 37 °C'de ve 100 rpm karıştırma hızındaki su banyosunda tutulmuştur. Belirlenen zaman aralıklarında salım ortamından alınan her 1'er mL'lik örneğe karşılık taze tamponlardan salım ortamlarına 1'er

mL ilave edilmiştir. Alınan 1'er mL'lik örneklerin ise UV-vis spektrofotometrede (Shimadzu UV 1800, Japonya) 490 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüş ve serbest DOX'in belirlenen konsantrasyonlarının aynı dalga boyunda ölçülen absorban değerleri ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak, zamanla ortama salınan DOX'in miktarı belirlenmeye çalışılmıştır [223, 224].

3.2.4. Sentezlenen Konjugatların siRNA ile Etkileşiminin Belirlenmesi

Bu çalışma ile sentezlenen konjugatlar ile firmadan temin edilen siRNA'lar arasında elektrostatik etkileşim sonucu kompleks oluşumu ve sentezlenen konjugatların siRNA bağlama yetenekleri araştırılmıştır. Bu amaçla, NP'ler ve siRNA'lar için kompleks oluşumunda en uygun oran (NP/siRNA; 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 a/a) sınıanmıştır [43, 139, 222, 225].

3.2.4.1. Jelde Gecikme Analizi

Sentezlenen konjugatların siRNA bağlama yeteneklerinin incelenmesi amacıyla 1 µg CXCR4 siRNA ve pH 5,0, PH 7,0 ve pH 9,0 özelliğinde olan tamponlarda çözdürülen konjugatların belirlenen miktarları (100, 50, 25, 12,5 ve 6,25 µg) karıştırılmış ve son hacim RNaz içermeyen saf su ile 10 µL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında 0,1 µg/mL etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde, 50 mM borat tamponu (ph 8,9) kullanılarak, 100 V akımda, 20 dk yürütülmüştür [225, 226]. Bu çalışmada, pozitif kontrol olarak siRNA transfeksiyonunda etkili bir şekilde kullanılan Lipofektamin (Thermo Fisher Scientific, USA) transfeksiyon ajanı kullanılmıştır (Lipofektamin/siRNA, 4/5 a/a). siRNA'nın hareketinin jel üzerindeki gecikmesi, UV ışığı (UV transillüminatör) altında yapılan görüntüleme ile belirlenmiştir.

3.2.4.2. Dinamik Işık Saçılımı

Sentezlenen konjugatların zeta potansiyelinde meydana gelen değişim belirlenerek kompleks oluşum kapasitesi analiz edilmiştir. Bunun için belirlenen konjugatların (PEI-SS-HA), siRNA ile belirlenen oranlarda (25, 50, 100 a/a)

oluşturdukları kompleksler ddH₂O ile 10 kat seyreltildikten sonra zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

3.2.5. *In vitro* Transfeksiyon Çalışmaları

In vitro çalışmalar L929 fare fibroblast, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücre hatları ile hazırlanan konjugatların belirlenen konsantrasyonları ve bunların siRNA ile oluşturduğu komplekslerin yine belirlenen konsantrasyonlarda hücreler üzerine uygulanmaları ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Hücresel Alımının Değerlendirilmesi

Sentezlenen konjugatların, floresan mikroskop ile görüntülemeye floresan prob olarak kullanılacak olan floresan boya (FAM) ile işaretli negatif kontrol siRNA'lar ile belirlenen oranda (Konjugat:siRNA, son konsantrasyon 100 µg/mL:50 nM) oluşturdukları komplekslerin hedef hücrelere (L929, MDA-MB-231 ve MDA-MB-231) alımının değerlendirildiği bu çalışmada öncelikle, üç hücre hattına ait hücreler 30x10³ hücre/kuyu olacak şekilde 48 kuyucuklu plakaya ekilmiş ve deney öncesi 1 gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün, kullanılan besiyeri uzaklaştırılarak, yerine hazırlanan komplekslerin belirli miktarlarını içeren taze besiyeri (OPTİ-MEM) ilave edilmiş ve hücreler 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyonun ardından kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS (1X, 10 mM) ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından kuyulara %5'lik gluteraldehit çözeltisi (100 µg/mL) ilave edilerek, 4°C'de 15 dakika tutulan hücrelerin fiksasyonu sağlanmış, sonrasında PBS (1X) ile yapılan 3 tekrarlı yıkamanın ardından inverted floresan mikroskop (Leica DMIL, Germany) altında DAPI filtresi kullanılarak görüntülenmişlerdir.

3.2.5.2. Sentezlenen Konjugatların Farklı Hücre Hatları (L929, MDA-MB-231, CAPAN-1) Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Sentezlenen konjugatların sitotoksitesini belirlemek amacıyla normal L929 fare fibroblast, MDA-MB-231 meme kanseri ve CAPAN-1 pankreas kanseri hücre

hattı için gerekli kültür çalışmaları yapılarak yeterli hücre sayısına ulaşıldıktan sonra her üç hücre hattından da 96 kuyucuklu plakalara 5×10^3 hücre/mL konsantrasyonunda ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edilmiş, daha sonra 96 kuyucuklu plakalardaki hücre vasatı atılmış, hücre besiyeri ile seyreltilmiş ve 1,5 mL hacimli santrifüj tüplerinde ddH₂O'da 1 mg/mL konjugat bulunacak şekilde stok karışımlar hazırlanmıştır. Stok karışımdan, son hacimde 200-100-50-25 ve 12,5 µg/mL konsantrasyonda PEI-HA, PEI-SS-HA, AuNP, AuPEI Np, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX konjugatları 3 tekrarlı olacak şekilde plaka kuyucuklarına eklenmiş, ardından 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Sentezlenen konjugatların (son hacimde 100 µg/mL, 25 nM) CXCR4 siRNA molekülleri ile oluşturdukları komplekslerin 24 saatlik uygulamaları sonrasında iyonize radyasyona tabi tutulan her üç hücre hattı üzerinde belirlenen sitotoksik etkiler de bu çalışma kapsamında verilmiştir. Bu çalışma için öncelikle L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 5×10^3 hücre/mL konsantrasyonda ekilip inkübe edilmiş (1 gece, 37°C, %5 CO₂) ve ardından komplekslerin uygulandığı ve uygulanmadığı (negatif kontrol) farklı gruplar SSD 100 olacak şekilde 2 Gy, 195 MU ile, altına gafkromik film dozimetre konularak external foton radyoterapisine tabi tutulmuş ve hücrelerin bulunduğu ortamın sıcaklığının 36-41°C arasında olduğu kızıl ötesi kamera ile ölçülmüştür (FLIR SC 6000, FLIR Systems, Inc., Boston, MA) [227].

Komplekslerin inkübasyonun ve radyasyon terapisinin ardından, hücrelere WST-1 metabolik aktivite temelli proliferasyon testi deney prosedürü uygulanmıştır. Kısaca, kullanılan besiyeri atılıp, besiyeri kaynaklı renk farklılığını engellemek için fenol red içermeyen besiyeri hazırlanmış ve tüm kuyulara 100'er µL bu besiyerinden ilave edilip ardından tüm kuyulara 5'er µL WST1 tuzu ilave edilmiştir. Folyo ile sarılan plakanın ışık alması önlenerek inkübatörde 4 saat bekletildikten sonra plaka okuyucu ile 440 nm dalga boyunda absorbands ölçümü yapılmıştır. Bu testin çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (WST1 ((2- (4-iyodofenil)- 3- (4-nitrofenil)- 5 -(2,4-disulfofenil)- 2H-tetrazolyum; kırmızı renkli)

kullanarak formazan (sarı) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır [228]. Kontrol grubu olarak hücrelerin üzerine sadece besiyerinin uygulandığı kuyucuklar kullanılmış ve kontrol gruplarından alınan absorbansların ortalaması %100 kabul edilmiş olup, test kuyucuklarından alınan absorbansların ortalamaları ile karşılaştırılmıştır. Uygulanan parçacıkların toksisitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmış; % canlılık $\pm$ standart hata değerleri tabloda verilmiştir.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = ((\text{OD440 (örnek)}) / ((\text{OD 440 (kontrol)}))) \times 100 \quad (1)$$

3.2.5.3. Sentezlenen Konjugatların Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi

Hoechst boyasının PI ile birlikte uygulandığı ve hücre çekirdeğinin skorlanmasına dayanan ikili boyama yöntemi, kültür ortamındaki apoptozun ve nekrozun belirlenmesi ve değerlendirilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu çalışma kapsamında ilk olarak hazırlanan konjugatların (PEI-HA, PEI-SS-HA, AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX) L929, MDA-MB-231 meme kanseri ve CAPAN-1 hücre hatları üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkisi araştırılmıştır. Bunun için her iki hücre hattı da 5×10^3 hücre/mL olacak şekilde %10 FBS, %1 antibiyotik ve son hacimde 2 mM L-glutamin içeren DMEM besiyeri içerisinde 96-kuyulu plakanın kuyularına ekilmiş ve 1 gece 37°C, 5% CO₂, %95 nemin sağlandığı ortamda inkübe edilmiştir. Ardından, hücreler üzerine hazırlanan konjugatların 12,5–200 µg/mL konsantrasyonları uygulanmış ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Bu çalışma kapsamında ayrıca, sentezlenen konjugatların (son hacimde 100 µg/mL, 25 nM) CXCR4 siRNA molekülleri ile oluşturdukları komplekslerin 24 saatlik uygulamaları sonrasında iyonize radyasyona tabi tutulan her üç hücre hattı üzerinde belirlenen apoptotik ve nekrotik etkiler de araştırılmıştır. Bu amaçla, hücrelerin ekimi ve radyasyona tabi tutulma prosedürleri tezin 3.2.5.2 kısmında anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyonun ve iyonize radyasyon uygulamasının ardından, kuyucuklardaki kullanılmış besiyeri uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa 70 µL ikili boyama solüsyonu (10 mL PBS içerisinde, 500 µL Hoechst 33342 (200 µg/mL), 100 µL PI (100 µg/mL) ve 100 µL RNase A (10 mg/mL)) ilave edilmiştir ve plaka alüminyum ile sarılarak 15 dk inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından DAPI (Hoechst (yeşil) ile boyanan apoptotik hücreler) ve FITC (propidyum iyodür, PI (kırmızı) ile boyanan nekrotik hücreler) filtreleri aracılığıyla inverted floresan mikroskop (Leica DMIL, Germany) altında apoptotik ve nekrotik hücreler incelenmiştir. Sonuçlar ise, her bir kuyuda rasgele seçilen 3 bölgede yapılan hücre sayımı sonucunda (100 hücre), yeşil ve kırmızı hücrelerin % değerleri olarak ifade edilmiştir.

3.2.5.4. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Proliferatif Etkisinin İncelenmesi

Hazırlanan PEI-HA/si, PEI-SS-HA/si, AuNP/si, AuPEI NP/si, AuPEI-HA/si, AuPEI-HA-DOX/si komplekslerin 48 (L929, CAPAN-1) ve 72 (MDA-MB-231) saat boyunca hücre proliferasyonuna etkisi, hücre temelli testlerden olan XCelligence mikroelektronik biyosensör sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu sistem ile hücrelerin canlılığı, sitotoksikite ve proliferasyon, dinamik, gerçek zamanlı ve etiketleme olmadan gerçekleştirilmektedir [229]. Bu ileri teknoloji ile, hazırlanan komplekslerin L929 fibroblast, CAPAN-1 pankreas kanseri ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının proliferasyonuna etkisi, cihazın (Roche Applied Science, Switzerland) uygulama prosedürüne göre sırasıyla 48, 48 ve 72 saat boyunca 10 dakika aralıklar ile yapılan ölçümler sayesinde incelenmiştir. xCELLigence sistemi 4 ana parçadan oluşmaktadır. Bunlar; RTCA analizleyici, RTCA SP ana parça, gerekli yazılımın entegre olduğu bilgisayar ve zemini altın mikroeletrotlar ile kaplanmış 96 well E-plate'dir. Bu çalışma kapsamında 96 gözlü E-plate'in kuyuları 100'er µL besiyeri (L929 ve MDA-MB-231 için DMEM, CAPAN-1 için IMDM) ile doldurulmuş ve inkübatöre (37°C ve %5 CO₂ içeren nemli atmosferde) alınan cihaz içerisine yerleştirilerek 10 dakika boyunca hem cihazın, hem de E-plate sıcaklığının 37°C' ye sabitlenmesi sağlanmış ve 1 dakikalık arka plan okumasının ardından laminar akışlı kabin içerisine alınan E-plate'in kuyularına L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücreleri 100'er µL besiyeri içerisinde (5×10^3 hücre/kuyu) ekilmiş ve E-plate tekrar cihaz içerisine

yerleştirilerek, kuyuların okunabilirliğini doğrulayan 10 dakikalık okumanın ardından hücrelerin E-plate zeminine tutunup çoğalmaya başlamaları için 48 saatlik inkübasyon sürecine başlanmıştır. 48 saatin ardından hücreler çoğalma aşamasına geldiğinde, E-plate cihaz içerisinden çıkarılarak kuyulardan kullanılmış besiyeri uzaklaştırılmıştır. Ardından, sentezlenen konjugatların son hacimdeki (200 µL) konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde saf su ile dilüsyonları hazırlanmış ve son hacimdeki konsantrasyonu 25 nM olacak şekilde stok siRNA çözeltisinden alınan siRNA'lar bu dilüsyonlar üzerine ilave edilerek uygulama öncesinde aralarındaki etkileşim için 30 dk, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmışlardır. Son konsantrasyonda 25 ve 100 nM olacak şekilde sadece siRNA'lar da hücreler üzerine ayrı kuyucuklara olacak şekilde uygulanmıştır. Bu amaçla siRNA'ların hücre içerisine transfeksiyonunda kullanım etkinliği kanıtlanmış lipofektamin, transfeksiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Hücrelere uygulama öncesinde siRNA'ların lipofektamin ile etkileşimi için 49 µL OPTİ-MEM ile nazikçe pipetleme ile karıştırılan 1 µL Lipofektamin üzerine son hacimdeki konsantrasyonu 25 ve 100 nM olacak şekilde siRNA ilave edilmiş ve 30 dk, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hazırlanan tüm bu formülasyonlar hücreler üzerine uygulanarak tekrar cihaz içerisine yerleştirilen E-plate'teki hücrelerin çoğalma durumları ve dolayısıyla hücre indeksi değerleri L929 ve CAPAN-1 için 48 saat, MDA-MB-231 hücre hattı için 72 saat boyunca okunmaya devam edilmiştir.

3.2.5.5. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Farklı Hücre Hatlarındaki Hedef Gen İfadelenmesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

3.2.5.5.1. Hücrelerin Hazırlanan Konjugat/siRNA Kompleksler ile Muamelesi

Bu çalışma kapsamında CXCR4 proteininin siRNA ile inhibe olduğunu mRNA seviyesinde göstermek amacıyla eş zamanlı PCR analizi uygulanmıştır. Bu amaçla, öncelikle CAPAN-1 ve MDA-MB-231 hücreleri 12-kuyucuklu plakalara 0,5 mL IMDM ve DMEM (sırasıyla %20 ve %10 FBS içeren) besiyerleri içerisinde 2×10^5 hücre/mL olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, kuyucuklarda tutunan hücrelerin üzerinden kullanılmış besiyeri uzaklaştırılmış ve aynı kuyucuklara

Çizelge 3.4'te belirtilen miktarlarda serumu azaltılmış OPTİ-MEM besiyeri ilave edilmiştir. Sonrasında, hazırlanan kompleksler (Son hacimde 200 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde sonikatör yardımı ile RNAz içermeyen saf suda çözdürülen konjugatlar yine son hacimde 50 nM olacak şekilde stok siRNA (100 µM) çözeltisinden gereken miktarda alınan CXCR4 siRNA'lar ile 30 dakika etkileştirilmişlerdir) tek (CAPAN-1) ve iki (MDA-MB-231) tekrarlı olacak şekilde OPTİ-MEM besiyeri içeren kuyucuklara Çizelge 3.4'te belirtilen şekilde uygulanmış ve transfeksiyon amacıyla 48 saatlik inkübasyon için 12-kuyucuklu plakalar 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatöre alınmıştır.

Çizelge 3.4.12-kuyucuklu plakaların kuyucuklarına ekilen CAPAN-1 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerine eklenen kompleksler ve miktarları

Kod	Örnek Adı	OPTİ-MEM Hacmi (µL)	Konjugat Konstr. (µg/mL)	Son siRNA (pmol)	Miktarı
1	Kontrol grubu	1000	-	-	
2	GADPH siRNA (+ Kontrol Grubu)	994,5	-	50	
3	NC siRNA (- Kontrol Grubu)	994,5	-	50	
4	CXCR4 siRNA (susturucu)	994,5	-	50	
5	Konsantre CXCR4 siRNA (susturucu)	993,5	-	150	
6	AuPEI	950	200	-	
7	AuPEI/siRNA	949	200	50	
8	PEI-HA	950	200	-	
9	PEI-SS-HA	950	200	-	
10	PEI-HA/siRNA	949	200	50	
11	PEI-SS-HA/ siRNA	949	200	50	
12	AuPEI-HA-DOX	950	200	-	
13	AuPEI-HA-DOX/ siRNA	949	200	50	
14	AuPEI-HA-DOX (2)/siRNA	899	400	50	

3.2.5.5.2. RNA İzolasyonu

3.2.5.5.1. kısmında verilen Çizelge 3.4'teki örneklerle 48 saat inkübe edilen hücrelerden, RNA izolasyonu yapmak için aşağıdaki işlem takip edilmiştir (High pure RNA isolation kit, Version 12).

Öncelikle kuyucuklardan besiyeri atılmış, hücreler PBS ile yıkanmış, %0,05 tripsin ile hücreler kaldırılarak santrifüj tüplerine alınmış ve santrifüjlenmiştir (2,500 x rpm, 2 dk). Ardından, elde edilen pellet üzerine 200 µL PBS ilave edilip yavaşça pipetlenerek homojen hale getirilmiş ve hücrelerin bulunduğu falkon tüplere 400 µL parçalama çözeltisi (Lysis Buffer) ilave edilip 15 sn vortekslenmiştir. Falkon tüp içerisindeki hücreler max. 700 µL olacak şekilde kolona aktarılmış ve santrifüjlenmiştir (8,000 x g, 15 sn). Kolonun altındaki sıvı atılmış, 90 µL DNaz inkübasyon tamponu ve 10 µL DNaz I karışımı eklenmiş ve mikropipetle nazikçe karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Ardından, yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle 500 µL yıkama çözeltisi-1 ilave edilmiş ve santrifüjlenmiş (8000 x g, 15 sn), ardından 500 µL yıkama çözeltisi-2 ilave edilmiş ve santrifüj işlemi tekrarlanmıştır (8000 x g, 15 sn). Daha sonra kolonun altındaki sıvı atılmış, ikinci kez 200 µL yıkama çözeltisi 2 ilave edilip santrifüjlenmiş (8000 x g, 2 dk) ve yine kolonun altındaki sıvı atılıp, altta bulunan tüpler temiz 1,5 mL'lik santrifüj tüpleri ile değiştirilmiştir. Bundan sonra elüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için ise 50 µL ayırma çözeltisi (elution buffer) eklenmiş ve santrifüjlenmiştir (8000 x g, 1 dk). Santrifüj tüpleri alınıp hemen buzdolabına kaldırıldıktan sonra kolonların altına tekrar yeni santrifüj tüpleri alınıp elüsyon işlemi 50 µL ayırma çözeltisinin ilavesi ile tekrarlanmış ve bu elüsyonun ardından da yine alttan santrifüj tüpleri alınıp hemen derin dondurucuya alınmışlardır (-80°C).

cDNA'ya dönüştürme reaksiyonundan önce elde edilen toplam RNA'ların konsantrasyonları, örneklerden 1'er µL alınarak NanoDrop cihazı ile ölçülmüştür. Ölçme işlemi için kör olarak elüsyon tamponu kullanılmıştır.

3.2.5.5.3. cDNA Sentezi

Her bir gruptan izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlemek için aşağıdaki protokol takip edilmiştir (Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit, Version 08).

İlk olarak RNA'lerden cDNA sentezi için elde edilen total RNA'ların miktarları her bir örnek için 1 µg olarak ayarlanmış ve her iki hücre hattına da ait bu RNA örneklerinin, primer (Random hexamer primer) ve su karışımı ile birlikte son hacmi 11,4 µL olacak şekilde kalıp primer karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Kalıp primer karışımı (1 örnek için)

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Toplam RNA	Değişebilir	1 ng-4µg
Random Hexamer Primer, 600 pmol/ µL	2 µL	60 µM
Su, PCR saflığında	Değişebilir	Toplam hacmi ayarlamak için =11,4 µL
Toplam Hacim	11,4 µL	

Çizelge 3.5'da belirtilen şekilde PCR tüpleri içerisinde karışımlar hazırlandıktan sonra 65°C'de 10 dk Termal Cycle Cihazında (Techne TC-Plus) inkübe edilmişlerdir. Bu adım RNA'nın denatürasyonunu sağlamak için uygulanmıştır. Daha sonra ise PCR amacıyla ters transkriptaz karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 3.6). İnkübasyondan çıkarılan PCR tüpleri içerisine hazırlanan bu karışımdan 8,6 µL ilave edilip, vorteks kullanılmadan pipetaj ile nazikçe karıştırılarak son hacmi 20 µL olan PCR karışımı elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. Ters transkriptaz karışımının bileşenleri ve miktarları (1 örnek için)

Bileşen Adı	Miktarı (µL)	Son Konsantrasyon
Transcriptase Reaction Buffer	4	1x (8 mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor (40 U/µL)	0,5	20 U
Deoxynucleotide Mix	2	1 mM
DTT	1	5 mM
Transcriptor Reverse Transcriptase	1,1	10 U
Son Hacim	8,6	

Kalıp primer karışımı üzerine ters transkriptaz karışımı ilave edildikten sonra elde edilen PCR karışımlarına ısı döngüleyici kullanılarak önerilen geri transkripsiyon mekanizması koşulları uygulanmış (Termal Cycle cihazında 55°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk inkübe edilmiştir), böylece cDNA'lar elde edilmiştir. Ardından tüpler

hemen buza alınmış yeteri kadar soğumaları sağlandıktan sonra -20°C’de RT-PCR primer analizi yapılana kadar muhafaza edilmişlerdir.

3.2.5.5.4. Rölatif Kantitatif Real Time PCR Çalışması

siRNA’lar ve konjugat/siRNA kompleksleri ile ayrı ayrı muamele edilen CAPAN-1 ve MDA-MB-231 hücrelerinde CXCR4 geninin ifadelenmesi seviyesinde etkisinin araştırılması için RT-PCR primer analizi yapılmıştır. Hedef genlerin analizi için referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. RT-PCR çalışması Fast Start Essential DNA Green Master (Version 06) kiti kullanımı ile Roche LightCycler® 480 II Sistemi’nde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında ilk olarak NanoDrop ile stok cDNA miktarları belirlenmiş, ardından RT-PCR amacıyla reaksiyona girecek cDNA’ların 5 µL’sinde 100 ng olacak şekilde gerekli dilüsyonları yapılmıştır. RT-PCR’da kullanılacak olan primerlerin (forward ve reverse) GAPDH ve CXCR4 için ayrı ayrı stok çözeltilerinden (100 µM) RT-PCR son hacminde (20 µL) 0,5 µM olacak şekilde 10x konsantre çözeltileri hazırlanmıştır. Ardından 1,5 mL reaksiyon tüplerinde analizi yapılacak her bir örnek için RT-PCR karışımı Çizelge 3.7’de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7. PCR karışımının bileşenleri ve miktarları

Reajan	Hacim (µL)
Su, PCR saflığında (Vial 2)	3
PCR Primer, 10x kons.	2
Master Mix, 2x kons. (Vial 1)	10
Toplam Hacim	15

Tüp içerisinde hazırlanan karışım, Light Cycler 96-Multiwell Plakasına her örnek için ayrı bir kuyucuğa olmak üzere aktarılmıştır. Ardından, kalıp olarak kullanılacak ve 20 ng/µL olacak şekilde hazırlanan cDNA’lar da aynı kuyucuklara 5’er µL olarak ilave edilmiş (Negatif kontrol olarak kalıp cDNA yerine aynı miktarda (5 µL) saf su kullanılmıştır) ve dikkatlice pipetlemenin hemen ardından plakanın üst kısmı muntazam bir şekilde kapatılmıştır. Hazırlanan plaka, başka

bir plaka ile dengelendikten sonra santrifüj edilmiş (1,500 x g, 1dk); reaksiyon karışımlarını içeren plaka, Light Cycler 96 cihazına konularak, belirlenen PCR programı (Çizelge 3.8) çalıştırılmıştır. mRNA ekspresyon seviyesinin rölatif ölçümü için $\Delta\Delta CT$ eşitliği kullanılmıştır [230].

$$\Delta\Delta CT = ((C_{T,Target} - C_{T,Ref.}) - (C_{T,Target} - C_{T,Ref.})) \quad (2)$$

$$\text{Hedef genin ekspresyon seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (3)$$

Çizelge 3.8. Light Cycler 96 cihazında uygulanan PCR programı

Program Name	Temperature (°C)	Ramp (°C/s)	Duration (s)	Acquisition Mode
Pre- Incubation	Cycles (1), Analysis Mode (None)			
	95	4,4	600	None
Amplification	Cycles (65), Analysis Mode (Quantification)			
	95	4,4	10	None
	57	2,2	15	None
	72	4,4	15	Single
Melting	Cycles (1), Analysis Mode (Melting Curves)			
	95	4,4	5	None
	65	2,2	60	None
	97	-	-	Continuous

3.2.6. İstatistiksel Analiz

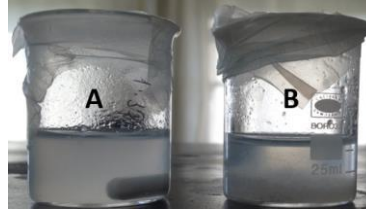
Verilerin istatistiksel analizi student t-test ile gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama değer $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık p değerinin 0,05 ve 0,01'den küçük olması ile belirtilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. PEI Temelli Non-viral Taşıyıcıların Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

4.1.1. Polietilenimin-Hyalüronik Asit Konjugatlarının Sentezinde Optimizasyon Çalışmaları Sonuçları

Optimizasyon çalışmaları kapsamında yöntem optimizasyonu çalışması için üç farklı yöntemin (elektrosprey, damla ilave ve homojenizasyon) etkinliği değerlendirilmiştir: (i) elektrosprey yönteminde petriye dökülen PEI çözeltisi sabit bir dönme hızında iken şırınga ile PEI çözeltisi üzerine HA çözeltisi spreylenecek, ancak petride topaklaşmalar olmuş ve homojen bir çözelti elde edilememiştir; (ii) damla ilave yöntemi ile şırıngaya alınan HA karışımı, manyetik karıştırıcıda karıştırılan PEI çözeltisi (20 mL) üzerine damla damla ilave edilmiş, parçacıklar çözelti içerisinde gözle net bir şekilde görülebilmiş ve parçacık boyut dağılımının homojenizasyon yöntemindekine göre çok daha geniş olduğu saptanmıştır; (iii) homojenizatör ile gerçekleştirilen yöntemde ise şırıngaya alınan HA hızlı bir şekilde homojenizatör daldırılmış (20,000 rpm karıştırma hızında) PEI çözeltisine ilave edilmiştir. Çok fazla hava kabarcığı olduğu halde homojen bir çözelti elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Konjugat sentezinde elde edilen reaksiyon karışımları. A) Homojenizasyon yöntemi B) Damla ilave yöntemi (çökelti oluşumu)

Elde edilen son gelişmeler ışığında, PEI bazlı gen taşıyım vektörlerinin çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanımı artmıştır. PEI'nin en iyi yanı, DNA'yı nanoparçacıklara sıkıştırması (kolay alım), onu nükleazlara karşı koruması ve nükleer lokalizasyon için sitozole polimer-DNA kompleksinin salımını kolaylaştıran içsel endosomolitik aktiviteye sahip olmasıdır. Hücre içerisine

endositik veziküller ile alınan PEI, sahip olduğu protonlanabilen amin grupları sayesinde proton sünger etkisi ile endozom asidifikasyonunu engelleyerek endozom içerisine daha fazla proton alımına ve sonuç olarak şişerek patlamalarına neden olur. Böylece bPEI bazlı vektörler, içeriklerini bu asidik kompartmanlardan erken fazda (lizozomal yıkım olmadan) sitozole salabilirler [221].

PEI'nin yüksek yük yoğunluğu özelliğinden etkilenilerek yapılan bu tez çalışması kapsamında fonksiyonel karboksil taşıyan anyonik glikozaminoglikan olan HA'ya, toksik olmayan düşük molekül ağırlıklı bPEI'ler, sahip oldukları amin grupları ile karbodiimit aracılı birleştirme kimyası kullanılarak kovalent olarak bağlanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan HA, düşük moleküler ağırlıklı bPEI ile biyobozunur amid bağı oluşumu ile birleştirilmesinde kalıp olarak davranması öngörülerek tercih edilmiştir. Ayrıca sentezlenen konjugatlar sadece biyobozunur ve biyoyumlu olmakla kalmayıp, aynı zamanda serum proteinleri ve diğer dokularla spesifik olmayan etkileşimleri de azaltır ve son olarak, sentezlenen konjugatlar CD44 ve RHAMM aşırı eksprese eden hücrelere hedefli gen taşınımı için kullanılabilir [221]. Bu noktalar gözönünde bulundurularak sunulan tez çalışması kapsamında bPEI'nin değişen miktarları ile HA-NHS'ler reaksiyona sokulmuş ve PEI-HA konjugatı serisi hazırlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları kapsamında reaksiyona girecek PEI: HA (a/a) oranları; 2:1, 5:1, 20:1, 30:1, 50:1, 100:1, 200:1 olarak belirlenmiştir [222]. PEI-HA konjugatlarının sentezi için öncelikle HA, aktif NHS esterlerine dönüştürülmüş ardından suda çözünabilir çapraz bağlayıcı ajan olan EDAC karbodiimiti kullanılarak, amid bağlarını vermek üzere PEI'deki primer aminlerin yapıya bağlanması amacıyla değişen oranlarda PEI, HA çözeltisine ilave edilmiştir. Belirlenen oranlarda gerçekleştirilen reaksiyonlar sonrasında liyofilize edilen reaksiyon karışımlarının karakterizasyonu amacıyla dinamik ışık saçılımı yönteminin uygulandığı Zeta Sizer cihazı ile, liyofilizasyonun hemen ardından 0. saatte yapılan analize göre PEI:HA oranı 20:1, 30:1, 50:1, 100:1, 200:1 iken nanoparçacık boyutları (hidrodinamik çap) sırasıyla, 532.53 ± 111.45 nm, 599.6 ± 27.47 nm, 330 ± 19.12 nm, 365.5 ± 24.42 nm, 468.13 ± 119.00 nm bulunmuş, 330 ± 19.12 nm ortalama boyut ve $+13.73 \pm 2.84$ mV zeta potansiyeli ve kabul edilebilir sınır değerinin altında bulunan polidispersite (0.58 ± 0.05) değerleri

ile en iyi PEI:HA (a:a) oranı 50:1 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu oranın altında, HA'nın konjugattaki oranının artışı ile konjugat etrafındaki hidrasyon derecesinin yükselmesi sonucunda boyutta artış görülmüştür. Deiyonize su içerisinde Zeta sizer ile analiz edilen 50:1 oranı ile elde edilen konjugatların 72 saat boyunca her 24 saatte bir ortalama boyut ve yük analizi yapılmış, 72. saatin sonunda ise ortalama parçacık boyutu $271,23 \pm 16,65$ nm, zeta potansiyeli $+10,14 \pm 3,14$ mV ve polidispersitesi $0,55 \pm 0,08$ bulunmuştur (Çizelge 4.1). Elde edilen bu değerlere bakıldığında 72 saatin sonunda sentezlenen bu konjugatların stabilitesini korudukları söylenebilir.

Tripathi vd.'nin karbodiimit kimyasını kullanarak oluşturdukları kovalent bağlı PEI-HA konjugatlarında en iyi konjugasyon verimi (%5,41) ile PEI:HA oranı 30:2 (a/a) iken (%6,7) sağlanmıştır [221]. Ortalama boyut da yine bu oran 30:1'den 30:2'ye indikçe (PEI'nin konjugattaki miktarı arttıkça) 527 nm'den 490 nm'ye düşmüştür. Ölçülen yüzey yükleri ise suda +26 mV ve +30 mV arasında çıkmıştır. Sunulan bu tez çalışması kapsamında çalışılan PEI:HA (20, 30, 50, 100 ve 200 a/a) konjugatlarında ise HA'nın konjugattaki içeriğinin azalması ile birlikte boyutta benzer bir azalma görülmemiştir ve değişen PEI:HA oranı ile birlikte yüzey yükleri +3 ile +30 mV arasında değişmiştir. Tripathi vd.'nin aynı çalışmasında, konjugatların %10 FBS içeren ortamdaki boyutları da ölçülmüş ve ortalama boyutlarda sudakine göre bir azalma tespit edilmiş ve bunun, konjugatların çevresinde değişen ortam kaynaklı bir dehidrasyon ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür [221]. Benzer sonuç, bu tez kapsamında çalışılan ilgili örnek gruplarında da (PEI:HA (30) DMEM, PEI:HA (50) DMEM) tespit edilmiştir. PEI:HA (30, suda) örneği boyutu 24. saatte 322,6 nm ölçülmüşken, PEI:HA (30, DMEM) örneği boyutu 20,21 nm ölçülmüştür. Yine, PEI:HA (50, suda) örnek grubunun boyutu 24. saatte 247,17 nm ölçülmüşken, PEI:HA (50, DMEM) örnek grubu için 65,83 nm ölçülmüştür. Her iki örnek grubu için benzer azalmalar 48. ve 72. saatlerde tekrarlanan ölçümlerde de saptanmıştır. Jiang vd.'nin EDC/NHS mekanizmasını kullanarak yapmış olduğu başka bir çalışmada yine farklı oranlarda PEI:HA konjugatları (20:1, 5:1 ve 2:1) hazırlanmış, bu konjugatlarda HA'nın PEI ile modifikasyonun derecesi arttıkça yüzey yüklerinde de artış olduğu

tespit edilmiştir (2:1, 5:1 ve 20:1 için sırasıyla, +3,6 mV, +13,2 mV ve +24,9 mV) [222].

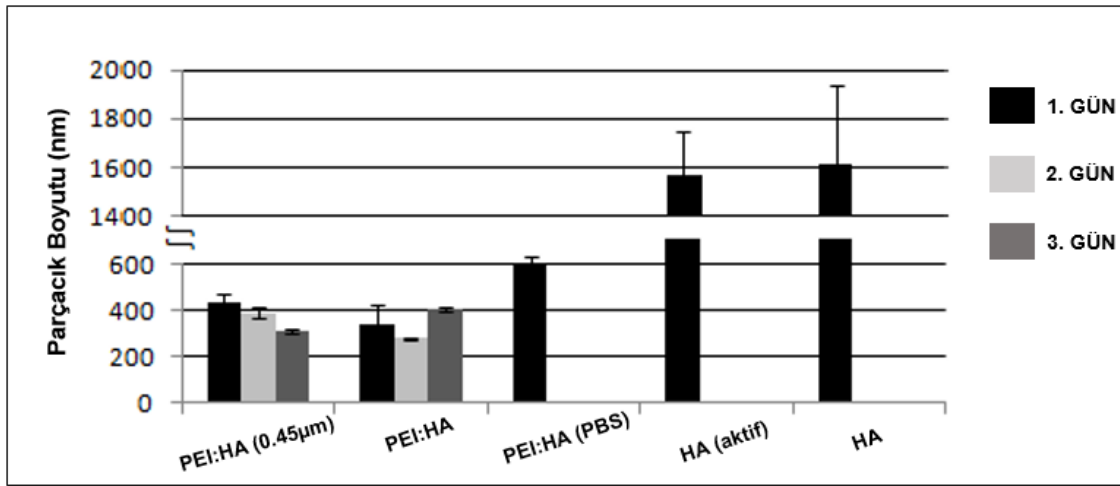
Tez çalışması kapsamında disülfid bağları içeren çapraz bağlı PEI-SS'nin siRNA taşınımında yüksek molekül ağırlıklı bPEI kadar etkili olabileceği ve bPEI molekülleri arasındaki disülfid bağlanmaların sitozolde glutatyon ile parçalanabilme özelliği sayesinde sitotoksitede önemli derecede azalma sağlayabileceği ve siRNA'ların sitozole salınarak terapötik etkilerini gösterebilmelerinin de sağlanabileceği düşünülerek, indirgeyici amidasyon reaksiyonu ile aşı-kopolimer formunda PEI-SS-HA konjugatları elde edilmiş, bu sayede hem yapının serum stabilitesi arttırılmış hem de siRNA'nın HA reseptörü aracılı endositozu sayesinde hedefe spesifik hücresel alımı kolaylaştırılmıştır [139, 231]. Sentezinde PEI:HA için 50:1 oranının kullanıldığı, ancak yapısında disülfid bağı içeren PEI-SS-HA konjugatlarının da DLS yöntemi ile yapılan analiz sonuçlarına göre sentezlenen bu konjugatların boyutu $203,37 \pm 3,57$ nm, polidispersitesi $0,38 \pm 0,02$ ve zeta potansiyeli ise $+35,83 \pm 1,43$ mV bulunmuştur (Çizelge 4.1). Zeta potansiyelinin 30 mV'un üzerinde bulunması, sentezlenen bu parçacıkların oldukça kararlı ve polidispersitesinin 0,38 bulunması ise parçacık boyutunun üniform olduğunu kanıtlamaktadır.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında HA'nın reaksiyon ortamında iken kendiliğinden parçacık oluşturması da araştırılmış, DLS yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre (ortalama boyut $1565,67 \pm 180,93$ nm) kendiliğinden parçacık oluşturmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca oluşturulan reaksiyon karışımındaki nanoparçacıkların (PEI:HA, 50:1) boyut dağılımının azaltılması amacıyla PEI:HA sentez karışımının yarısı diyaliz öncesi filtreden geçirilmiş, yarısı ise direkt diyalize alınmıştır. PEI-HA reaksiyon karışımının filtreden ($0,45 \mu\text{m}$) geçirilmesi sonucunda da filtreden geçirilmeyen reaksiyon karışımına göre parçacık boyutunda küçülme görülmemiştir ($433,53 \pm 37,98$ nm, 0. saat) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Sentezlenen konjugatların dinamik ışık saçılımı ile analizi sonuçları

	0. saat				24. saat				48. saat				72. saat			
	Ort. Boyut (nm)	PDI	Z (mV)		Ort. Boyut (nm)	PDI	Z (mV)		Ort. Boyut (nm)	PDI	Z (mV)		Ort. Boyut (nm)	PDI	Z (mV)	
HA	1610,33±329,77	0,95±0,05	-52,37±4,34		4637,33±600,65	1,00±0,0	-17,1±10,41		-	-	-		-	-	-	
HA aktif	1565,67±180,93	0,98±0,01	-105,10±6,34		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
PEI:HA (50) (+0.45µm)	433,53±37,98	0,44±0,02	22,40±2,58		389,5±21,68	0,49±0,06	21,37±1,69		311,9±8,54	0,44±0,02	29,53±0,26		-	-	-	
PEI:HA (50) PBS	593,87±37,95	0,58±0,03	-4895±1130,85													
PEI:HA (20)	532,53±111,45	0,92±0,07	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
PEI:HA (30)	599,6±27,47	0,8±0,12	18,7±6,29		322,6±31,6	0,50±0,05	26,63±5,35		299±14,01	0,49±0,05	20,73±2,71		395,07±42,45	0,59±0,09	-	
PEI:HA (30)DMEM	-	-	-		20,21±0,02	0,59±0,00	-		24,38±1,22	0,68±0,03	-		25,92±0,85	0,72±0,04	-	
PEI:HA (50)	330±19,12	0,58±0,05	13,73±2,84		247,17±18,53	0,42±0,02	18,53±4,15		105,57±2,74	0,51±0,03	5,76±3,00		271,23±16,65	0,55±0,08	10,14±3,14	
PEI:HA (50)DMEM	-	-	-		65,83±24,34	0,37±0,03	-		20,88±0,56	0,58±0,02	-		25,78±0,65	0,54±0,03	-	
PEI:HA (100)	365,5±24,42	0,67±0,18	3,34±1,46		155,37±3,35	0,57±0,02	18,53±4,69		-	-	-		-	-	-	
PEI:HA (200)	468,13±119,00	0,69±0,07	17,93±1,91		176,33±6,16	0,68±0,07	26,2±6,89		-	-	-		-	-	-	
PEI-SS-HA	203,37±3,57	0,38±0,02	35,83±1,43		186,40±0,95	0,35±0,02	30±1,25		163,6±1,19	0,402±0,02	24±0,26		154,8±0,17	0,34±0,04	20,4±0,18	
PEI-SS HA.DMEM	-	-	-		79,21±0,34	0,62±0,00	-		120,33±1,94	0,43±0,04	-		123,97±1,42	0,35±0,03	-	

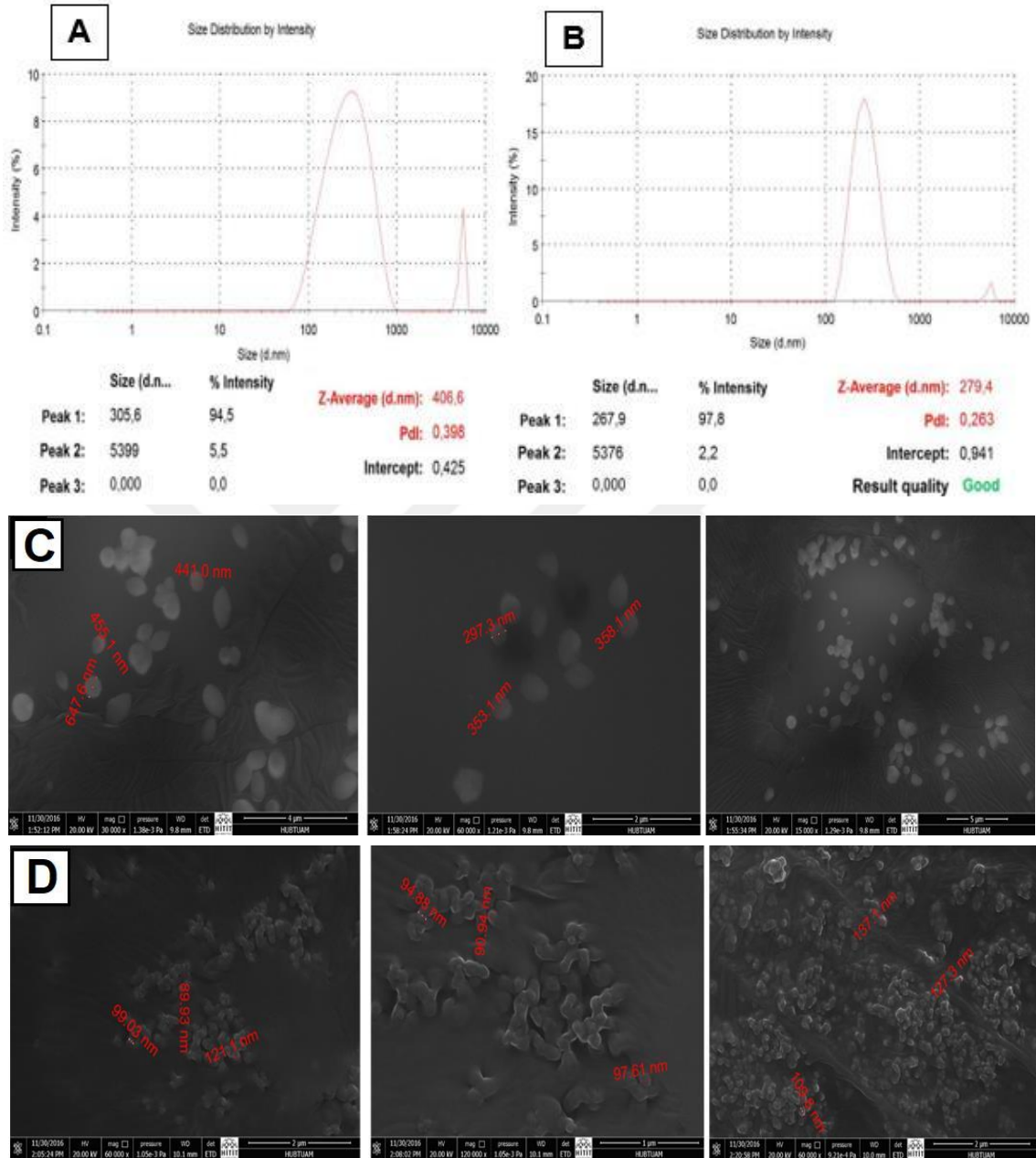
Diyaliz öncesinde filtreden geçirilmiş (PEI:HA (0,45 μm)), filtreden geçirilmemiş (PEI:HA), deiyonize su yerine 0,1 M PBS (pH 7,4) içerisinde analiz edilen PEI:HA (PBS) konjugatları, ddH₂O'da çözödürölen HA ve EDC/NHS içeren reaksiyon ortamındaki HA (aktif) polimer çözöltülerine ait DLS yöntemi ile elde edilen analiz sonuçları kullanılarak bar grafiğı elde edilmiştir (Şekil 4.2). PEI:HA (filtresiz) örneğinde parçacık boyutu diğör örneklere göre daha küçük olmuş ve parçacık boyutu ortalaması $\pm$ std hata, üç gün tekrarlanan analiz sonucuna göre $341,86 \pm 36,5$ nm bulunmuştur. Aynı örneğıe ait PDI değeri ($0,46 \pm 0,08$)'de yapılan literatür taramasına göre kabul edilebilir sınır değerin altında ($<0,7$) bulunmuştur.



Şekil 4.2.Elde edilen örneklere HA ve PEI:HA örneklrine ait boyut analiz sonuçları bar grafiğı

PEI-HA (filtresiz) ve PEI:HA (filtreli) örneğlerinin boyut ile ilgili karakterizasyon çalışmaları yapıldığı Zeta sizer cihazı çıktılarına ise Şekil 4.3'te yer verilmiştir. PEI:HA (filtreli) örneğı içerisindeki parçacıkların %94,5'inin boyutu 305,6 nm ve polidispersite indeksi (PDI) 0,398 iken (Şekil 4.3.A), PEI:HA (filtresiz) örneğı içerisindeki partiköllerin %97,8'inin boyutu 267,9 nm ve polidispersite indeksi (PDI) 0,263 bulunmuştur (Şekil 4.3.B). Aynı örneklere ait 1-5 μm ölçek aralığındaki SEM görüntülerine Şekil 4.3.C ve Şekil 4.3.D'de yer verilmiştir. Buna göre, PEI:HA (filtreli) örneğıne ait görüntüde (Şekil 4.3.C) PEI:HA nanopartiköllerinin PEI:HA (filtresiz) örneğıne göre birbirinden daha ayrı konumlandıkları görölmüştür. Filtreden geçirilmeyen PEI:HA (filtresiz) örneğı

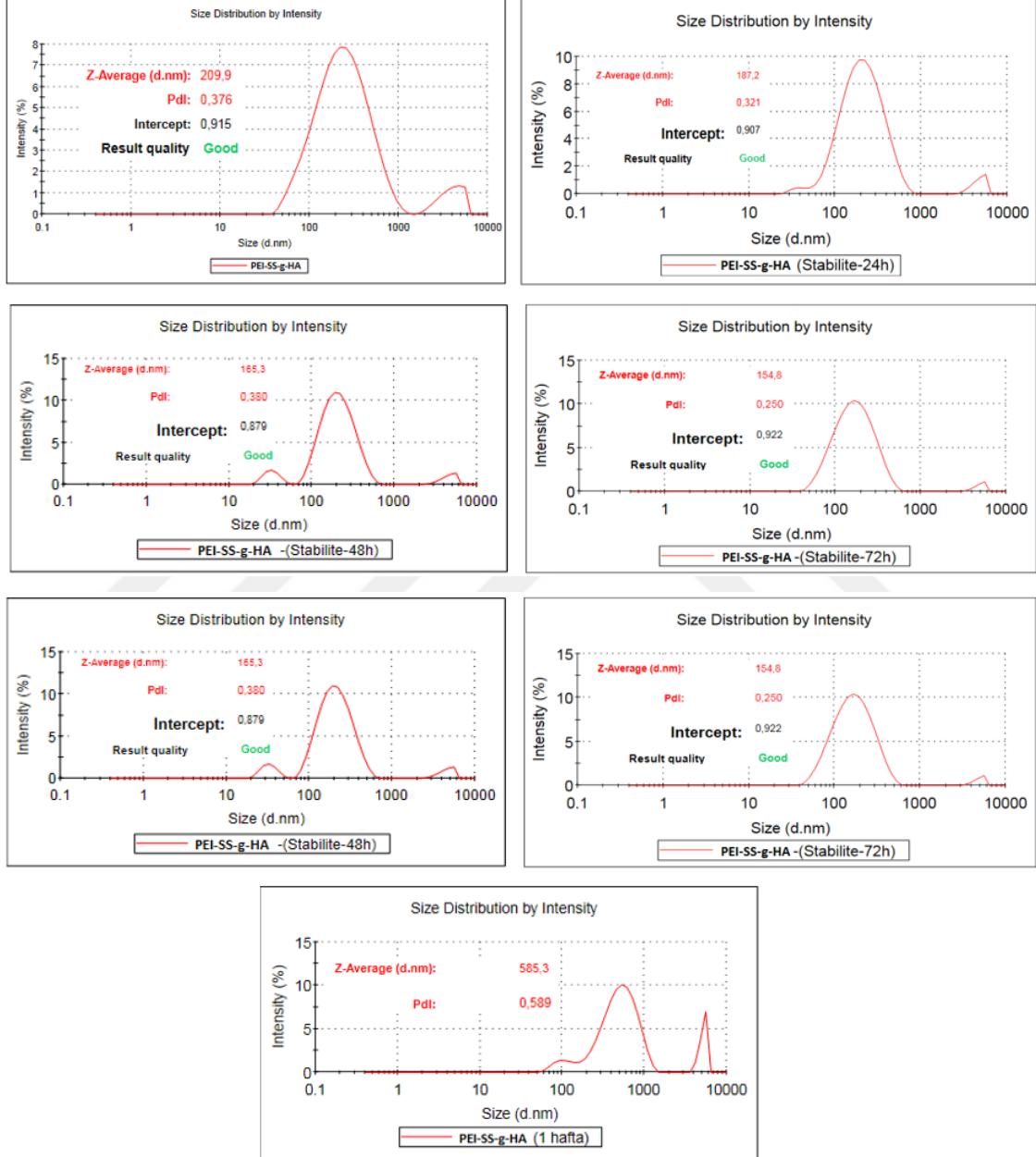
görüntüsünde (Şekil 4.3.D) ise parçacıkların birbirleri ile daha sıkı bir şekilde konumlandıkları görülmüştür.



Şekil 4.3. Sentezlenen PEI:HA konjugatlarının karakterizasyonu. A) PEI:HA (filtreli) örneğinin parçacık boyut analizi; B) PEI:HA (filtresiz) örneğinin parçacık boyut analizi; C) PEI:HA (filtreli) örneğinin SEM görüntüsü; D) PEI:HA (filtresiz) örneğinin SEM görüntüsü

4.1.2. Sentezlenen Biyobozunur PEI-SS-HA Konjugatların Karakterizasyonu

Sentezlenen biyobozunur PEI-SS-HA konjugatların boyutlarının zamana bağlı değişimi, dinamik ışık saçılımı yönteminin kullanıldığı Zetasizer cihazı ile belirlenmiştir (Şekil 4.4). Buna göre parçacık boyut dağılım karaktestiğinin 72 saate kadar korunduğu görülmüştür.



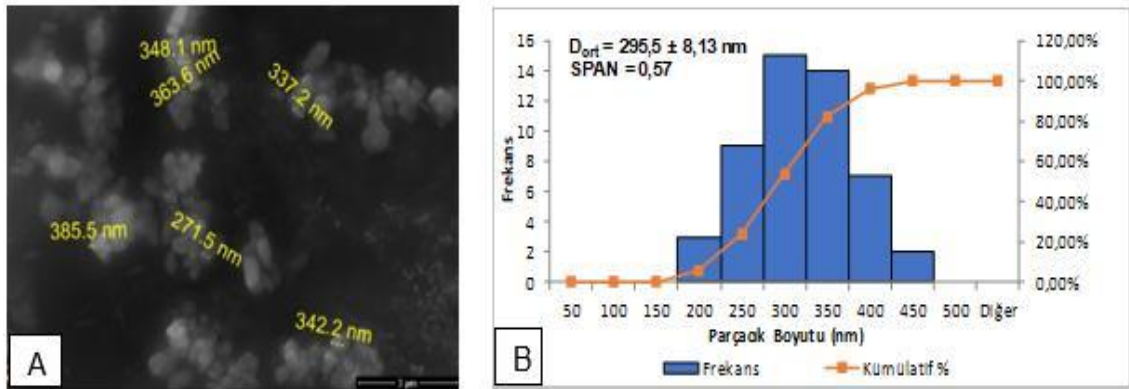
Şekil 4.4. PEI-SS-HA konjugatlarının zamana bağlı parçacık boyut dağılımı

Şekil 4.5.A'da, biyobozunur PEI-SS-HA konjugatının temsili SEM görüntüsü verilmiştir. SEM görüntüsü kullanılarak sayılan (n = 50) PEI-SS-HA

nanoparçacıklarının boyutları ölçülmüş ve Image J software programı (NIH, ABD) yardımıyla boyut dağılım analizi yapılmıştır. Elde edilen nanoparçacık boyut dağılımları eşit aralıklarla çizilmiş histogramda gösterilmiştir (Şekil 4.5.B). Ayrıca, PEI-SS-HA konjugatlarına ait kümülatif yüzde eğrisi de bu histogramda verilmiştir. PEI-SS-HA konjugatlarının parçacık boyut dağılım genişlik değeri (SPAN değeri), bu kümülatif yüzde eğrisinden, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır [232, 233].

$$SPAN = \frac{d[0.9]-d[0.1]}{d[0.5]} \quad (4)$$

Bu eşitlikte, $d[0.9]$, $d[0.5]$ ve $d[0.1]$ değerleri kümülatif yüzde eğrisindeki sırasıyla 90., 50. ve 10. yüzdelerdeki ortalama nanoparçacık boyutlarını göstermektedir. Buna göre, parçacık şekillerinin ağırlıklı olarak küresel olduğu gözlemlenmiştir. Hesaplanan ortalama parçacık boyutunun 295,5 nm ve SPAN değerinin ise 0,57 olduğu görülmektedir. Hesaplanan bu düşük SPAN değeri, örneğin homojen bir boyut dağılımına sahip olduğunu da göstermektedir.



Şekil 4.5. PEI-SS-HA konjugatının SEM görüntüsü (A) ve parçacık boyut dağılım histogramı (B)

4.1.3. Lazer Ablasyon Tekniği Kullanılarak Sentezlenen AuPEI-HA-DOX Konjugatlarının Karakterizasyonu

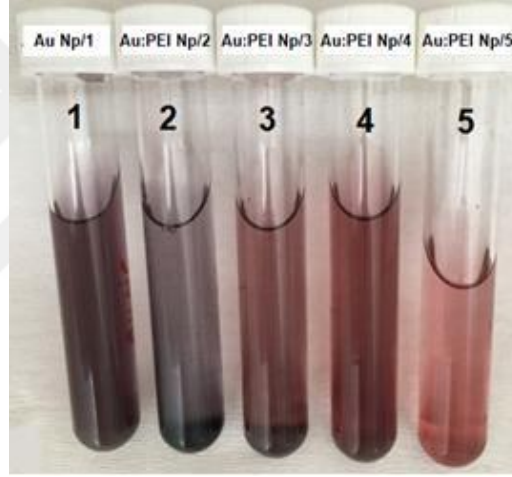
4.1.3.1. AuPEI NP'lerin Zeta Sizer ile Analizi

Au-PEI-HA-DOX konjugatları sentezi için öncelikle lazer ablasyon tekniği ile suda negatif zeta potansiyeline sahip AuNP'ler ile katyonik bPEI'nin, zıt yüklü iyonlarının arasında elektrostatik etkileşimlerin gerçekleşmesi (iyonik bağlanmalar) ile Au-PEI nanoparçacıklar sentezlenmiş, sonrasında sentezlenen nanoparçacıkların Zeta Sizer ile parçacık analizi yapılmıştır (Çizelge 4.2). DLS yönteminin kullanıldığı bu analiz sonuçlarına göre, optimum boyut (25 nm) ve PDI (0,62) değerine sahip parçacıkların AuPEI-NP (3) örnek grubuna ait olduğu düşünülmüştür. Kotcherlakota vd.'nin yapmış oldukları çalışmaya göre ise serbest AuNP'lerin boyutu 5,3 nm, yüzey yükü ise -60 mV olarak tespit edilmişken [234], bu tez kapsamında suda serbest AuNP'lerin boyutu 91 nm, zeta potansiyeli ise -17 mV olarak ölçülmüştür. AuNP'lerin boyutları arasındaki bu farklılığın temel sebebinin sentezlenen parçacıkların yüzey yüklerindeki farklılık olduğu düşünülmüştür. Kotcherlakota ve ark.'nın elde ettikleri AuNP'lerin -60 mV olan yüzey yükleri nedeniyle parçacıkların agrege olma eğilimi bu tez çalışması kapsamında elde edilen parçacıklara (-17 mV) göre oldukça azdır, dolayısıyla ölçülen parçacık boyutları (5 nm) da bu tez çalışmasında elde edilen sonuca göre (91 nm) oldukça düşüktür. Yine de lazer ablasyon tekniği ile sulu çözeltide oluşan AuNP'lerin eş zamanlı olarak sentez ortamında bulunan PEI ile kaplanması sonucunda, AuNP'ler agrege olmadan, çok daha küçük boyutta (25 nm) AuPEI Np'ler oluşturulabilmiştir. Bu da AuPEI Np'lerin sentezinde lazer ablasyon yönteminin başarılı bir şekilde uygulanabildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.2. AuNP ve değişen ağırlık oranlarında hazırlanan AuPEI NP'lerin Zetasizer ölçüm sonuçları

Örnek Adı	Boyut (nm)	Zeta potansiyeli (mV)	PDI
AuNP (1)	90,91±11,14	-17,30±1,14	0,42±0,02
Au-PEI Np (2)	282,97±21,21	-0,95±0,45	0,56±0,08
Au-PEI Np (3)	25,01±4,34	-0,91±0,3	0,62±0,07
Au-PEI Np (4)	79,46±19,33	-1,60±0,21	0,47±0,06
Au-PEI Np (5)	226,57±2,36	-0,73±0,25	0,36±0,04

Zetasizer ile ölçüm sonrasında 1 hafta dolapta (+4 °C) bekletilen örnekler dolaptan çıkarılarak stabilitelerinin göstergesi olarak çökelti oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Buna göre en stabil örneğin yapılan gözleme göre de (Şekil 4.6), DLS yönteminde elde edilen sonuca benzer bir şekilde Au-PEI Np (3) olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca nanoparçacık süspansiyonlarındaki kırmızıya doğru kayma daha büyük nanoparçacıkların varlığına işaret ederken, spektrumda maviye doğru kayma ise, daha küçük nanoparçacıkların oluştuğunu göstermektedir. Şekil 4.6'daki sentez ortamlarının görünümüne bakıldığında AuNP grubundaki parçacıkların boyutunun en küçük, AuPEI NP (5) grubundaki parçacıkların ise en büyük olması beklenmektedir. Ancak DLS yöntemi ile yapılan ölçüm sonrasında en küçük parçacık boyutuna sahip grubun AuPEI NP (3), en yüksek parçacık boyutuna sahip grubun ise AuPEI NP (2) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.6. Lazer ablasyon tekniği ile sentezlenen AuPEI Np'lerin sentez ortamı görünümü

4.1.3.2. Sentezlenen AuPEI-HA-DOX Konjugatların Zeta Sizer ile Analizi

Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen ve kanser terapisinde, NIR radyasyonu absorplayıp kanser hücreleri içerisinde ısı artışına ve dolayısıyla hücrelerin ölümüne neden olduğundan, termal ablasyon ajanı olarak da kullanılabileceği kanıtlanmış AuNP'lerin siRNA'lar ile oluşturacakları komplekslerin sahip oldukları negatif yüzey yükü nedeniyle stabil olmayacağı öngörülerek, bu parçacıkların güçlü endozomal kaçış kapasitesinden dolayı etkili nonviral gen taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan bPEI ile kaplanmaları

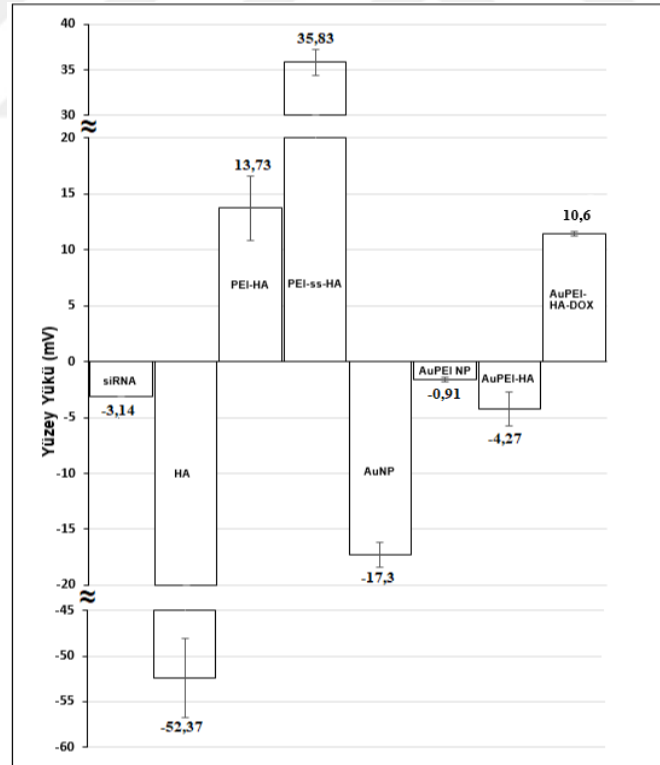
gerektiği düşünölmüş, ancak elde edilen parçacıklardaki bPEI kaynaklı pozitif yüzey yükü nedeniyle bu parçacıkların kan serum bileşenleri ile birleşerek vücut içerisinde agregasyona ve emboliye sebebiyet verebileceği de gözönüne alınmıştır. Ayrıca pozitif yüklü nanoparçacıkların negatif yüklü hücre membranına spesifik olmayan bir şekilde tutunmasının siRNA'nın yine spesifik olmayan bir şekilde salımına, dolayısıyla terapötik etkide önemli derecede azalmaya sebep olabileceği de düşünölmüş, tüm bu öngörüler ışığında, siRNA'ların hedefe spesifik taşınımını sağlayacak şekilde siRNA taşıyıcısı olarak sentezlenen AuPEI Np'lerin dış yüzeyine hyalüronik asit kovalent olarak bağlanmıştır. Yine aynı parçacıkların doksorubisin kemoterapötik ajanı ile etkileştirilmesi sonucunda elde edilen nihai AuPEI-HA-DOX parçacıklarının sahip oldukları pozitif (+10,6 mV) yüzey yükü sayesinde siRNA'ları serum içeren hücre kültür ortamında nükleazlarca parçalanmadan hücre içersine taşıyabilecekleri sonucuna varılmıştır. Ayrıca nihai konjugatta bulunan hyalüronik asitin de serum komponentleri ile spesifik olmayan etkileşimleri minimuma indireceği düşünölmüştür.

Sentezlenen AuPEI-HA-DOX (1:1/50 µg) ve AuPEI-HA-DOX (1:1/100 µg) örneklerinin parçacık boyutları, AuPEI Np'lerine göre oldukça büyük çıkmıştır (Çizelge 4.3). Buna rağmen, bu parçacıkların PDI değerleri kabul edilebilir sınır değerler arasında olup (sırasıyla 0,55 ve 0,56), sahip oldukları Zeta yükleri sayesinde (sırasıyla +11,47 mV ve +10,60 mV) siRNA'lar ile elektrostatik etkileşime girebilecekleri sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.3. Değişen ağırlık oranlarında AuPEI-HA ve değişen ağırlık oranlarında AuPEI-HA-DOX konjugatlarının Zetasizer ile analiz sonuçları

Örnek Adı	Boyut (nm)	Zeta potansiyeli (mV)	PDI
AuPEI-HA (1:1)	365,90±10,19	-4,27±1,52	0,56±0,01
AuPEI-HA (2:1)	446,27±14,43	0,07±0,37	0,78±0,10
AuPEI-HA-DOX (1:1/50 µg)	720,63±18,33	11,47±0,23	0,55±0,02
AuPEI-HA-DOX (1:1/100 µg)	691,50±4,37	10,60±0,44	0,56±0,03
AuPEI-HA-DOX (1:1/150 µg)	1012,0±31,09	8,92±1,14	0,57±0,02
AuPEI-HA-DOX (2:1/50 µg)	537,33±10,45	7,25±0,73	0,90±0,06
AuPEI-HA-DOX (2:1/100 µg)	575,07±14,96	2,92±1,05	1,00±0,00
AuPEI-HA-DOX (2:1/150 µg)	765,60±87,10	9,36±0,97	0,92±0,08

Sentezin farklı aşamalarındaki parçacıkların ve siRNA'nın tek başına zeta potansiyeli de DLS yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.7). Buna göre elde edilen PEI-HA, PEI-SS-HA ve AuPEI-HA-DOX bileşiklerinin sahip oldukları yüzey yükleri sayesinde (sırasıyla, +13,73 mV, +35,83 mV ve +10,6 mV) hedef siRNA molekülleri ile etkili bir şekilde elektrostatik olarak etkileşebilecekleri sonucuna varılmıştır. Lazer ablasyon tekniği ile elde edilen AuNP'lerin katyonik özellikteki bPEI ile kaplanması sonucunda yüzey yükündeki artış beklenen bir sonuçtur. Yine bPEI kaplı altın NP'lerin HA ile konjugat oluşturmaları sonrasında yüzey yükündeki azalma da beklenildiği üzere gerçekleşmiştir. Sonuç olarak anyonik yapılı doğal bir polisakkarit olan HA, lazer ablasyon yöntemi ile sentezlenen AuNP'ler ve bunların önce bPEI ardından HA ile oluşturdıkları konjugatların sahip oldukları yüzey yükleri (sırasıyla -52,37 mV, -17,3 mV, -0,91 mV ve -4,27 mV) nedeniyle siRNA molekülleri ile daha zayıf bir elektrostatik etkileşim gösterebilecekleri sonucuna varılmıştır.



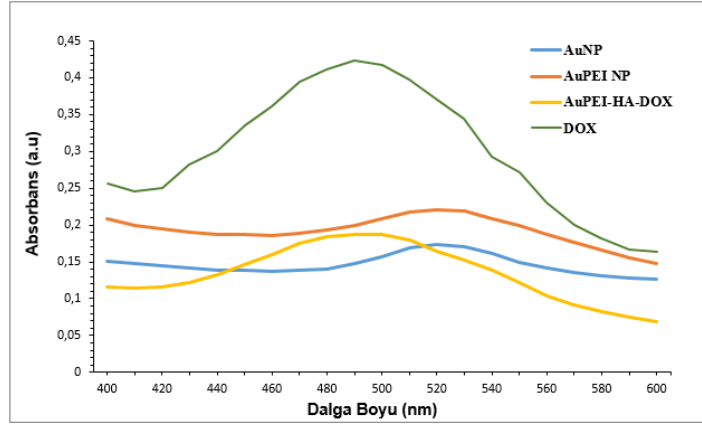
Şekil 4.7. Sentezlenen parçacıkların deiyonize suda zeta potansiyel analizi. Sonuçlar Ort $\pm$ Std. Hata olarak verilmiştir (n=3).

4.2. Sentezlenen Parçacıkların Kimyasal zelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. Sentezlenen Parçacıkların UV-Vis Spektroskopi ile Analizi

Lazer ablasyon tekniği ile sentezlenmiş olan AuNP'lerin, bPEI'nin farklı derişimlerinin kullanımı ile PEI kaplanmış AuPEI NP'lerin, ve damla ilave yöntemi ile öncelikle aktifleştirilmiş HA ile reaksiyona sokulması ve sonrasında Doksorubisin ile muamele edilmesi ile elde edilen parçacıkların (AuPEI-HA-DOX) optik özelliklerinden yararlanarak kalitatif analizi, hazırlanan grupların UV-Vis spektrumlarında yüzey plazmon rezonans (SPR) tepe noktalarının gözlemlenmesi ile yapılmış (şekil 4.8), ardından Zeta sizer ile analizleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar izelge 4.3'de verilmiştir.

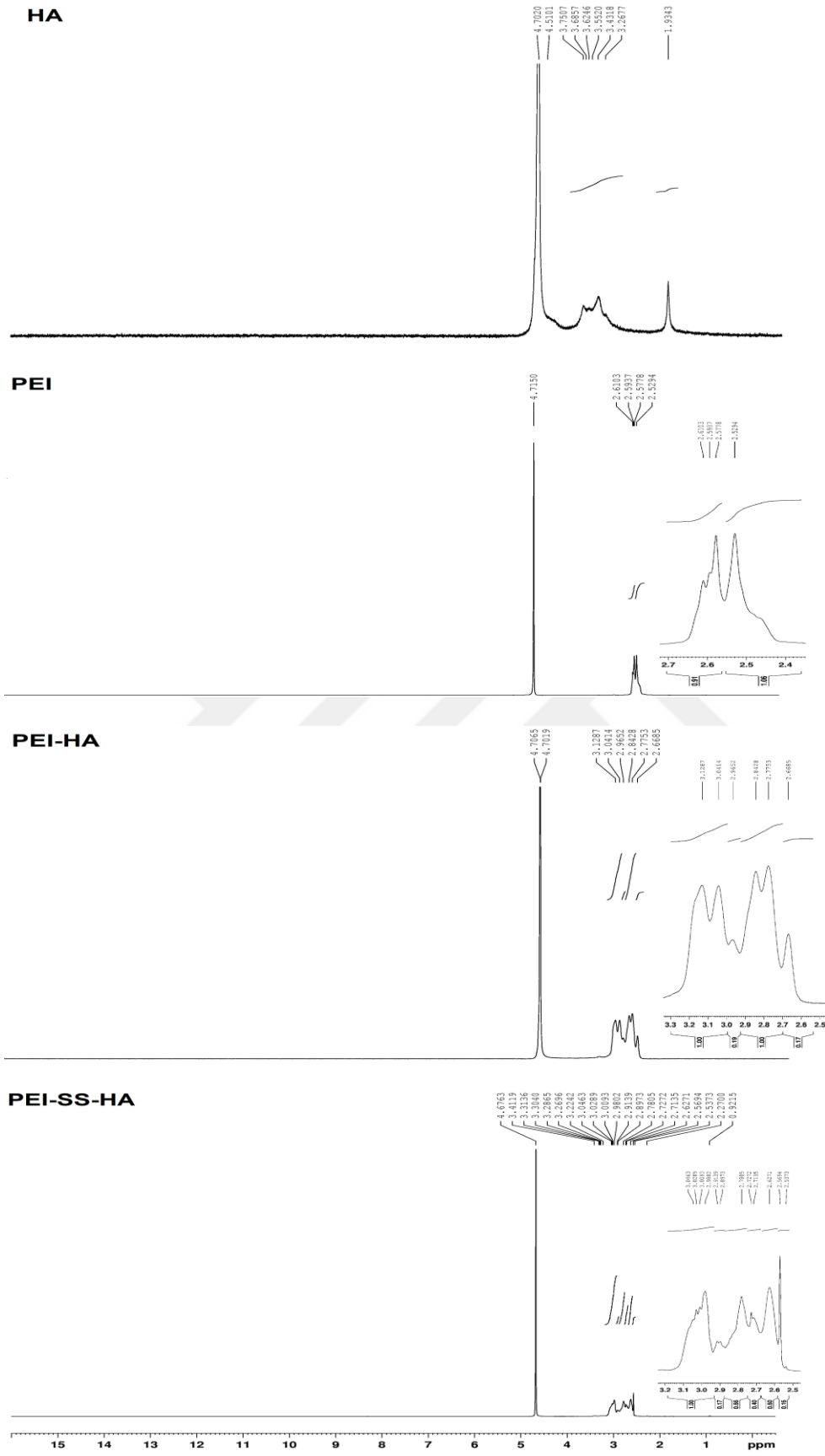
Bu tez çalışmasında lazer ablasyon yöntemi ile üretilen AuNP'ler 520 nm dalga boyunda SPR pikine sahip iken, Doksorubisin 490 nm dalga boyunda SPR pikine sahiptir. Dolayısıyla sentezlenen AuPEI-HA-DOX parçacıklarında Doksorubisinden dolayı, AuNP'nin 520 nm'de gelen karakteristik piki 490 nm'ye kayma göstermiştir (şekil 4.8). Kotcherlakota ve ark'nın sentezlemiş oldukları AuNP'lere ait UV-Vis spektrumunda ise parçacıklar 515 nm'de absorpsiyon piki vermiştir [234]. Manocha ve Margaritis tarafından yapılan doksorubisinin kontrollü salımı çalışmasında, DOX'in karakteristik λ_{max} değerinin 480 nm olduğu bildirilmiş, DOX'in ę-PGA ile kompleks oluşturması sonrasında ise DOX'in SPR pikinde 15 nm kayma meydana gelerek oluşan kompleksin 495 nm'de SPR piki verdiği bildirilmiştir [235]. Chen ve ark. tarafından uluslararası literatüre girmiş olan bir diğer çalışmada ise PEI-FI-(PEG-HA) konjugatlarının DOX ile yüklenmesi sonrasında oluşan kompleksin yine 480 nm'de absorpsiyon piki verdiği bildirilmiştir [224]. Sonuç olarak gerek AuNP'lere, gerekse DOX içeren nihai Au-PEI-HA-DOX'lere ait belirlenen absorpsiyon pik değerlerinin literatürde bildirilen değerler ile uyuruğu görülmektedir.



Şekil 4.8. Sentezlenen AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA-DOX parçacıklarına ve Dokсорubisine (40 µg/mL) ait absorpsiyon spektrumu

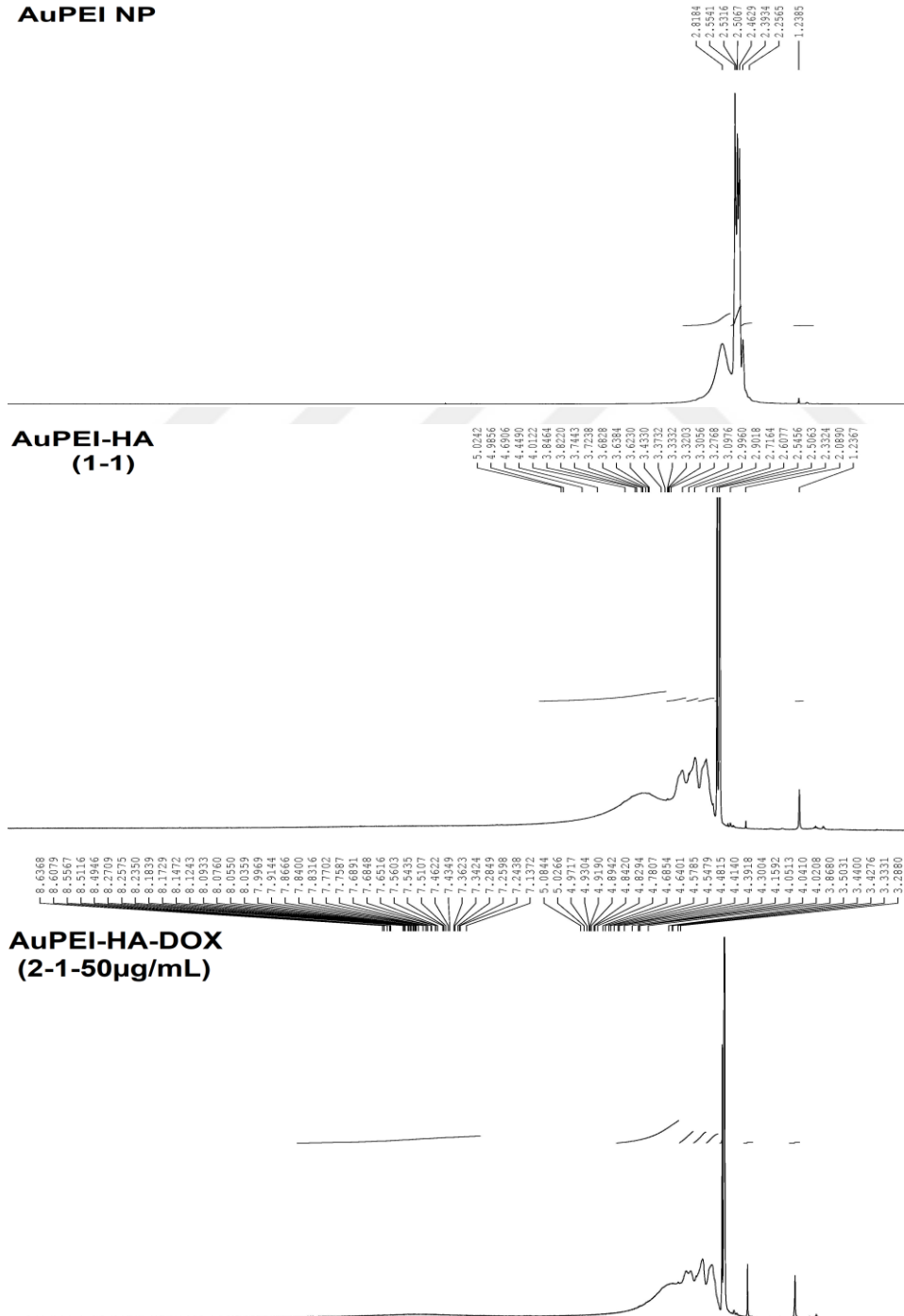
4.2.2. ¹H-NMR Analizi

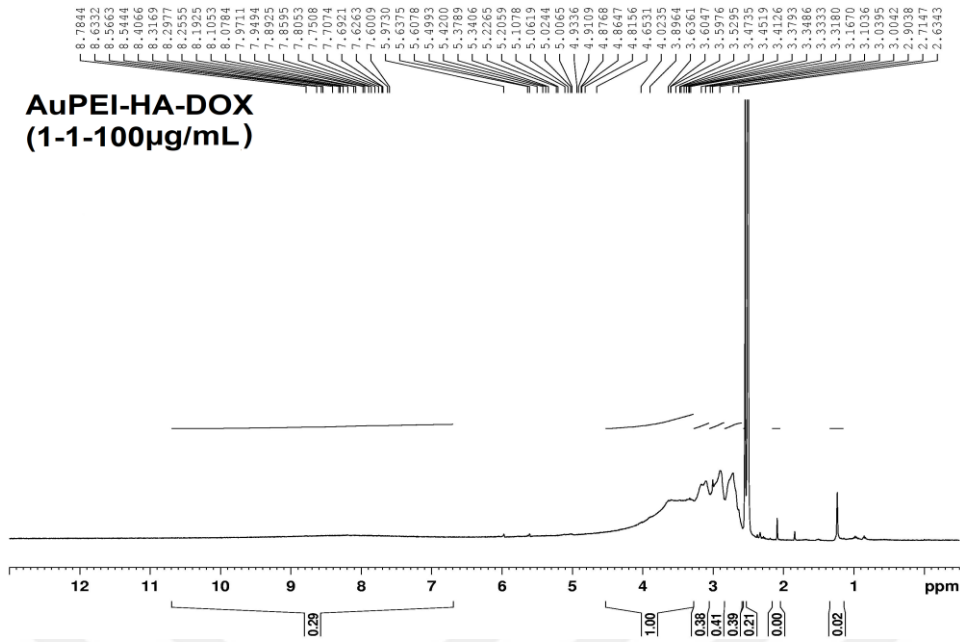
NMR analizi sonuçlarına göre 3,2-3,7 ppm arasındaki HA karakteristik pikleri PEI ile konjugasyon sonucunda 2,5-3,2 ppm aralığına kayma göstermiştir. 1,9 ppm'deki karakteristik pik hyalüronik asit molekülünde bulunan metil (-CH₃) grubuna ait proton ile ilişkili iken, 3,2-3,7 ppm aralığındaki sinyaller D-glukuronik ve N-asetil glukozamin protonlarına aittir [222, 236, 237]. 4,8 ppm civarında gelen pik iz miktardaki suya (D₂O) ait olup, PEI'nin karakteristik 2,5-2,6 ppm civarındaki pikleri konjugat oluşumu sırasında 2,7-2,8 aralığına kaymıştır. PEI-SS-HA yapısındaki sülfid grubuna komşu protonların ise (CH₂ grubundaki) 2,57 ppm'de pik verdiği görülmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Sentezlenen konjugatların ^1H -NMR spektrumları (0-16 ppm)

AuPEI NP konjugatındaki 2,3-2,8 ppm arasında gelen çoklu pikler bPEI'den kaynaklı amin gruplarındaki protonların ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$) varlığını göstermektedir (Şekil 4.10) [139, 238]. 3,0-5,0 ppm arasındaki pikler ise yapıya eklenen hyalüronik asitin şeker iskeletine ait protonlara aittir (Şekil 4.10) [239]. AuPEI-HA-DOX konjugatlarındaki DOX'ın aromatik halkalarından kaynaklı, belirgin olmayan sinyaller ise AuPEI-HA-DOX (2-1-50 $\mu\text{g/mL}$) grubunda 7,1-8,6 ppm, yine AuPEI-HA-DOX (1-1-100 $\mu\text{g/mL}$) grubunda ise 7,6-8,8 ppm arasında gözlemlenmiştir (Şekil 4.10) [223].



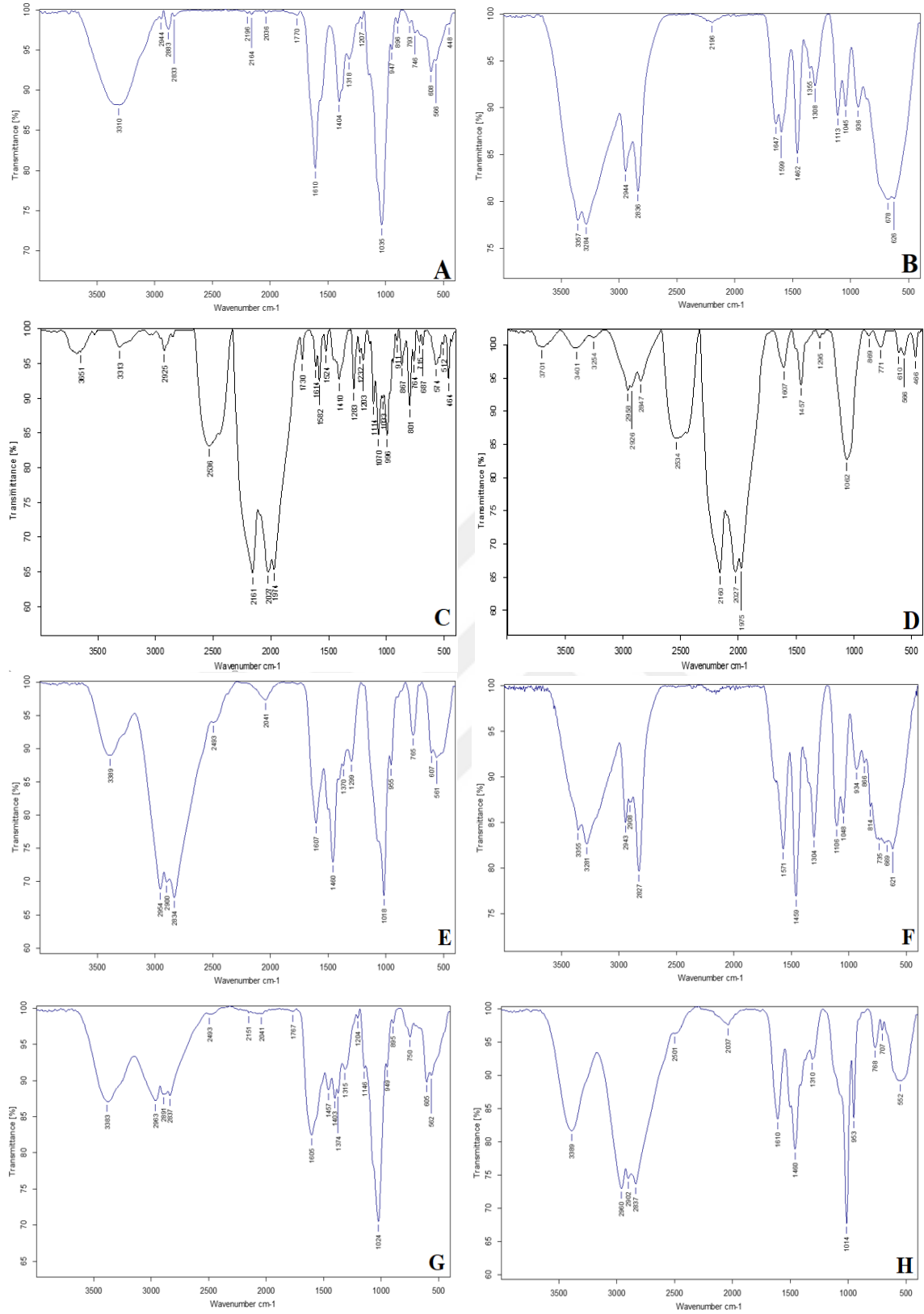


Şekil 4.10. Sentezlenen konjugatların ^1H -NMR spektrumları (0-13 ppm)

4.2.3. FT-IR Spektrumu Analizi

Sentezlenen parçacıkların karşılaştırmalı kimyasal karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen FT-IR spektrumu analizine ait sonuçlar Şekil 4.11'de görülmektedir. HA'nın FT-IR spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.11.A), 3310 cm^{-1} 'deki pikin $-\text{OH}$ grubunun molekül içi ve molekül arası gerilme titreşiminden, 2883 cm^{-1} 'deki pikin CH_2 grubu kaynaklı simetrik gerilme titreşiminden, 1610 cm^{-1} ve 1404 cm^{-1} 'deki piklerin COO^- grubunun simetrik ve asimetrik titreşiminden ve 1035 cm^{-1} 'deki pikin ise C-O-C hemiasetalik sistem sakkarit birimlerinden kaynaklı olduğu anlaşılmıştır [240]. PEI'nin FT-IR spektrumuna bakıldığında 2944 ve 2836 cm^{-1} 'deki piklerin sırasıyla CH_2 grubunun asimetrik ve simetrik titreşiminden, 1462 cm^{-1} 'deki pikin CH_2 'nin düzlem içi bükülmesinden [241], 1599 ve 1113 cm^{-1} 'lerdeki piklerin ise sırasıyla, NH ve C-N gruplarındaki bükülme titreşiminden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Şekil 4.11.B) [242, 243]. Doksorubisin'in FT-IR spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.11.C) ise 3651 cm^{-1} 'deki pikin $-\text{OH}$ grubunun hidrojen bağı gerilme titreşiminden, 1730 cm^{-1} 'deki pikin C=O gerilme titreşiminden, 1582 cm^{-1} 'deki pikin kinon içindeki hidrojen bağından, 1283 cm^{-1} 'deki pikin C-O-C gerilme titreşiminden, 1114 cm^{-1} 'deki pikin tersiyer alkoldeki C-O titreşiminden, 1070 cm^{-1} 'deki pikin sekonder alkoldeki C-O titreşiminden, 996 cm^{-1} 'deki pikin ise primer alkoldeki C-O titreşiminden

kaynaklandığı anlaşılmıştır [244]. PEI-HA konjugatına ait FT-IR spektrumunda (Şekil 4.11.D) 1062 cm^{-1} ve 1637 cm^{-1} 'de gelen piklerin HA'nın bPEI ve HA arasında oluşan amid bağı kaynaklı olduğu düşünülmüştür ki, HA'nın sakkarit birimlerinden (C-O-C) ve COO^- grubundan kaynaklı 1035 cm^{-1} ve 1610 cm^{-1} 'deki piklerde ve bPEI'nin C-N ve NH gruplarından kaynaklı 1113 cm^{-1} ve 1599 cm^{-1} 'deki piklerde meydana gelen kaymalar da bu sonucu desteklemektedir. PEI-SS-HA konjugatına ait FT-IR spektrumunda da yine 1018 cm^{-1} ve 1607 cm^{-1} 'de gelen piklerin bPEI ve HA arasında meydana gelen amid bağı oluşumlarına ait olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.11.E). PEI kaplı AuNP'lerine (AuPEI) ait FT-IR spektrumunda (Şekil 4.11.F) gelen 2827 cm^{-1} 'deki pikin CH_2 grubunun simetrik titreşiminden, 1571 cm^{-1} 'deki pikin NH grubundaki bükülme titreşiminden, 1459 cm^{-1} 'deki pikin CH_2 'nin düzlem içi bükülmesinden ve 1106 cm^{-1} 'lerdeki pikinse C-N grubundaki bükülme titreşiminden kaynaklı olduğu, dolayısıyla AuNP'lerine bPEI polimerlerinin başarıyla kaplanabildiği anlaşılmıştır. AuPEI-HA konjugatına ait FT-IR spektrumunda 1605 cm^{-1} ve 1024 cm^{-1} 'de gelen piklerin de yine bPEI'nin amin grupları ile HA'nin karboksil grupları arasında oluşan amid bağlarına ait oldukları anlaşılmıştır (Şekil 4.11.G). AuPEI-HA konjugatına doksorubisin bağlanması sonucunda Şekil 4.11.G'deki spektrumda yapıdaki OH gruplarına ait olduğu bilinen 3383 cm^{-1} 'de gelen pikin daralması da yine OH gruplarının doksorubisin kaynaklı COOH ve NH_2 ile bağlanmaları sonucunda gerçekleşmiştir. Ayrıca, AuPEI-HA-DOX konjugatına ait spektrumda AuPEI-HA'ninkine göre yine OH grubuna ait olduğu bilinen pikin (3383 cm^{-1}) absorbansında meydana gelen artış yapıya doksorubisin kaynaklı yeni OH gruplarının da yapıya girdiğini göstermektedir (Şekil 4.11.H).



Şekil 4.11. Sentezlenen konjugatların FT-IR spektrumları. A) Hyalüronik asit; B) PEI; C) Doksorubisin; D) PEI-HA; E) PEI-SS-HA; F) AuPEI NP; G) AuPEI-HA; H) AuPEI-HA-DOX

4.2.4. Elementel Analiz

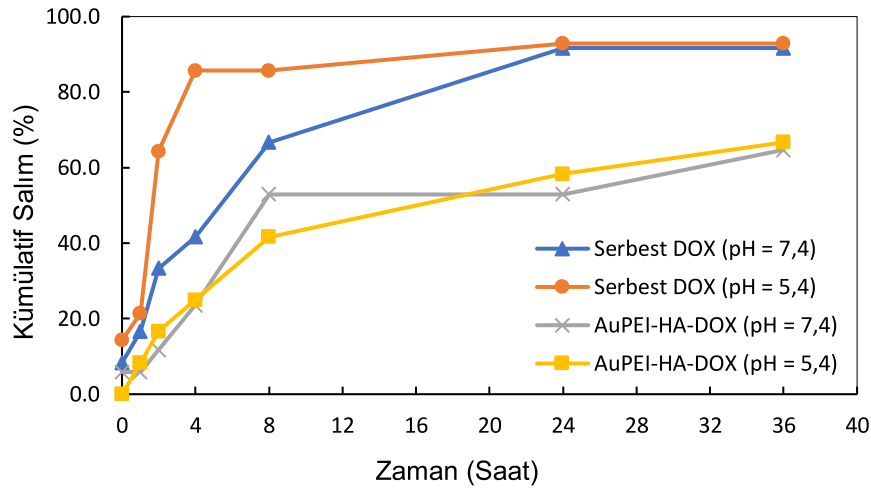
Elementel analiz sonuçlarından da anlaşıldığı üzere, sentezlenen PEI-HA konjugatında hyalüronik asit polisakkaritine göre %N miktarı artmıştır (%17,97). Hyalüronik asitteki $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ teorik N miktarı %4 iken, bu oranın PEI ile konjugat oluşumu sonrasında %17,97'ye çıkması sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Elementel analiz sonucundan yararlanılarak yapılan hesaplama göre 1 mol HA başına 2,25 mol bPEI'nin konjuge edilebildiği sonucuna ulaşılmıştır. Yine glutatyon ile indirgenebilen biyobozunur PEI-SS-HA konjugatındaki sülfürün oranı %1,05 bulunmuş, sentezlenen konjugatlardaki en yüksek %S oranı ile sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. PEI-SS-HA konjugatındaki diğer elementlerin yüzdeleri ise PEI-HA'ya göre beklenildiği gibi anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. AuPEI-HA konjugatında ise HA'nın yapıya bağlanması sonucu AuPEI konjugatına göre %N, %C ve %H düşmüştür (sırasıyla %8,60, %35,78 ve %6,34). AuPEI konjugatındaki PEI'nin %N, %C ve %H değerleri teorik olarak sırasıyla %33, %55 ve %12 iken AuPEI konjugatı için bu değerler sırasıyla %23,49, %41,74 ve %9,62 bulunmuştur. Yapıya HA bağlandığında ise tüm bu elementlerin % değerlerindeki düşme beklenen bir sonuçtur. Oluşan AuPEI-HA konjugatına doksorubisinin bağlanması sonucunda doksorubisin $(C_{27}H_{29}NO_{11})$ yapısındaki NH_2 grubu nedeniyle %N değerinde (%17,12) meydana gelen artış da yine beklenen bir sonuçtur. Konjugatlardaki toplam azot, karbon, hidrojen ve kükürt içerikleri, her bir element için ağırlık yüzdesi olarak belirtilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Konjugatların elementel analiz sonuçları

Örnek adı	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]
Hyalüronik asit	2,99	34,29	5,15	0,00
PEI-HA	17,97	34,31	8,29	0,35
PEI-SS-HA	17,82	34,01	8,43	1,05
AuPEI	23,49	41,74	9,62	0,04
AuPEI-HA	8,60	35,78	6,34	0,00
AuPEI-HA-DOX	17,12	31,25	8,34	0,00

4.3. Sentezlenen Konjugattan Doksorubisinin *In Vitro* Salımı

DOX'in sentezlenen AuPEI-HA-DOX konjugatından farklı pH koşullarında salımı, pH değişikliğinin ilaç-polimer bağlarının kopmasındaki etkisinin değerlendirilmesi ile araştırılmıştır. Bunun için belirlenen pH'lar 5,4 (asidik lizozom/endozom ortamını ve tümör mikroçevresini taklit etmek için) ve 7,4 (normal fizyolojik çevreyi taklit etmek için) olmuştur. Şekil'de gösterildiği gibi AuPEI-HA-DOX konjugatından zamana ve pH'a bağlı olarak DOX salımı gerçekleşmiştir. 36 saat sonra pH 7,4'te konjugattan DOX'in ~%65'i salınırken, pH 5,4'te ~%67'si salınmıştır. Sonuç olarak pH'nın düşmesi ile birlikte DOX'in konjugattan salımı %2'lik bir artış göstermiştir. Serbest DOX ise beklenildiği üzere, her iki pH'da da serbest halde iken AuPEI-HA konjugatı ile etkileşimde gösterdiği salımına göre daha hızlı gerçekleşmiştir. Elde edilen sonuçlar, Chen vd.'nin PEI-FI-(PEG-HA)/DOX konjugatından DOX'in salımı ile ilgili çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Chen ve ekibi de DOX'in serbest formda iken daha hızlı salındığını ve pH 5,4'te elde ettikleri konjugattan DOX'in salımının (%60,6) pH 7,4'dekine göre (%52,1) daha yüksek olduğu sonucuna ulaşmışlardır [224]. Ayrıca, bu çalışma kapsamında DOX'in asidik pH 5,4 koşulunda AuPEI-HA-DOX konjugatından salım hızı, fizyolojik pH 7,4'da gözlemlenene göre daha hızlı bulunmuş, bunun da DOX'in asidik pH'da protonlanma dolayısıyla daha hidrofilik bir davranış sergilemesi ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

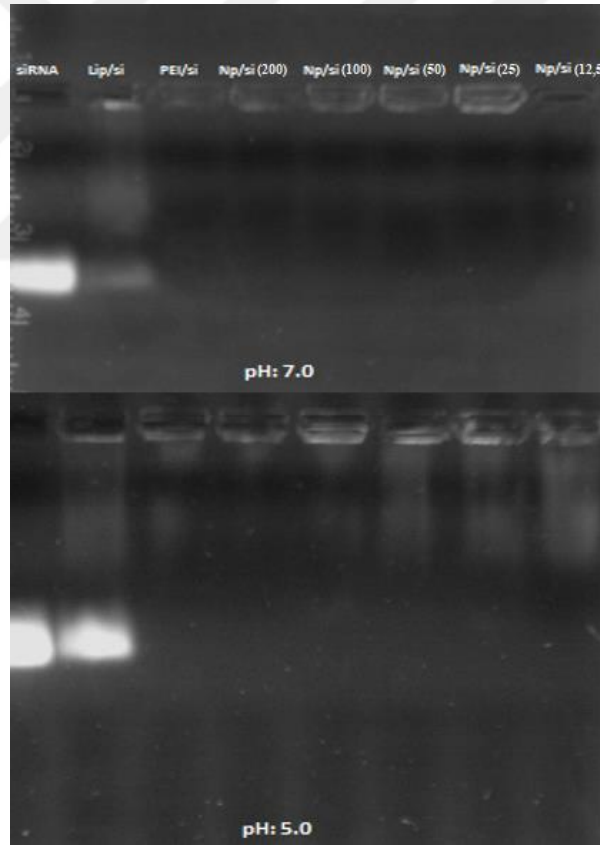


Şekil 4.12. Doksorubisinin AuPEI-HA-DOX konjugatından farklı pH'larda (pH 5,4 ve 7,4), 37°C'de zamana bağlı kümülatif salımı

4.4. Sentezlenen Konjugatların siRNA ile Etkileşiminin Belirlenmesi

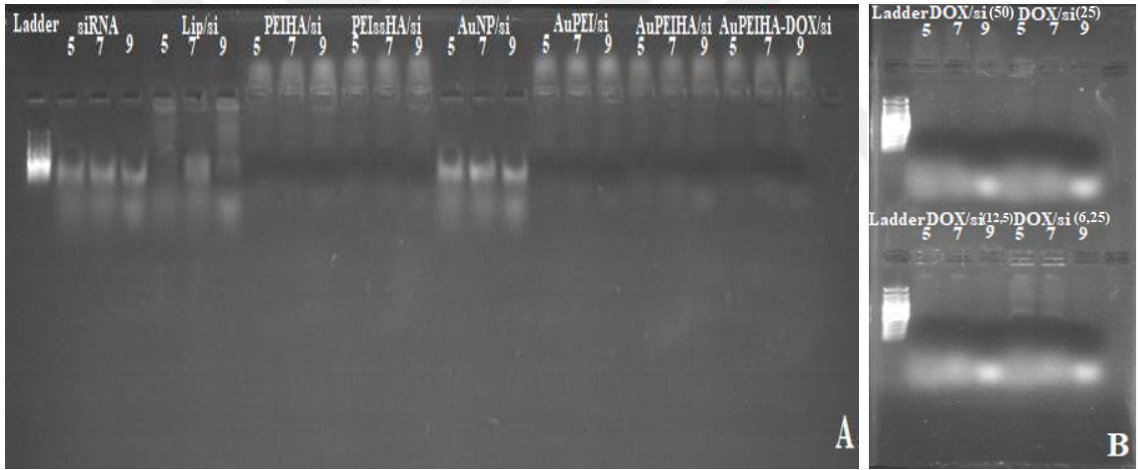
4.4.1. Jelde Gecikme Analizi

İlk olarak hazırlanan PEI-SS-HA siRNA taşıyıcı parçacıkların değişen miktarlarının, aynı miktardaki siRNA (0,1 nmol) molekülleri ile hem pH 5,0 hem de pH 7,0'de etkileşimleri incelenmiş ve pH 7,0'de ticari Lipofektamin transfeksiyon ajanı ve tüm sentezlenen nanoparçacıkların değişen miktarlarının siRNA'lar ile iyi bir şekilde etkileşimde olduğu, pH 5,0'te ise hem lipofektamin transfeksiyon ajanının hem de sentezlenen nanoparçacıkların azalan miktarlarının siRNA molekülleri ile etkileşiminin zayıfladığı ve bunun sonucunda siRNA'ların salınmaya başladığı jelde siRNA'ların yaptığı artan ışıma ile görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Sentezlenen PEI-SS-HA konjugatların pH 5,0 ve 7,0'de siRNA ile etkileşiminin karşılaştırılması

İkinci aşamada ise sentezlenen tüm parçacıkların siRNA ile üç farklı pH'da (5, 7 ve 9) etkileşimi jelde geciktirme analizi ile araştırılmış ve bu çalışmaya ait jel görüntüleri Şekil 4.14.A ve Şekil 4.14.B'de verilmiştir. Şekil 4.14.A'da görüldüğü üzere, AuNP hariç sentezlenen tüm parçacıkların (100 µg/mL) her üç ortamda (pH 5, 7 ve 9) siRNA ile etkileşimi gerçekleşmiştir. siRNA'ların AuNP'ler ile etkileşememe nedeninin ise AuNP'lerin sahip olduğu negatif yüzey yükü (-17,3 mV) olduğu düşünülmüştür. AuPEI-HA-DOX parçacıklarının siRNA'ya oranının azalması (50, 25, 12,5 ve 6,25 a/a) durumunda ise yine pozitif yüzey yüküne sahip parçacıkların ortamdaki konsantrasyonu azaldığından, AuPEI-HA-DOX /siRNA etkileşiminin azaldığı da siRNA'nın jelde sürüklenmesi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.14.B). Yine Şekil 4.14.B'de görüldüğü üzere, pH 9 ortamında siRNA salımı pH 5 ve pH 7 olan ortamlara göre daha yüksek olmuştur.



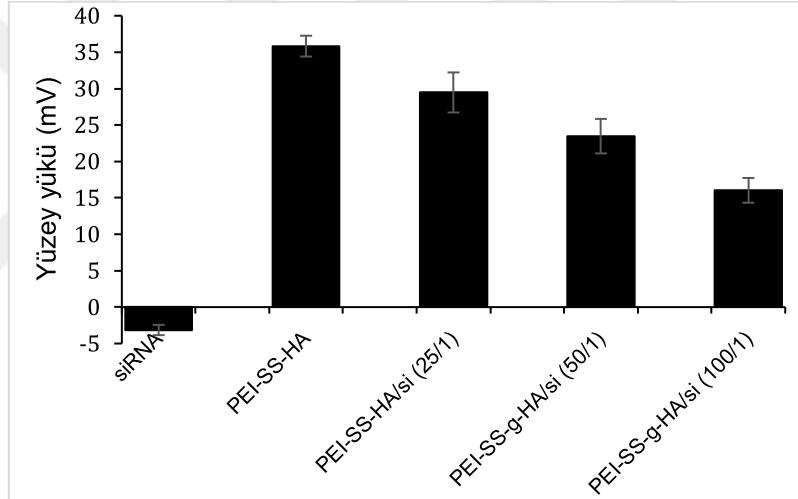
Şekil 4.14.Sentezlenen parçacıkların üç farklı pH'da (5, 7, 9) siRNA ile etkileşimi.

A) Parçacık/siRNA oranı (100, a/a), B) AuPEI-HA-DOX/si oranı (50, 25, 12,5 ve 6,25, a/a)

4.4.2. Dinamik Işık Saçılımı

siRNA taşıyıcısı olarak sentezlenen PEI-SS-HA parçacıklarının değişen oranlarının siRNA ile oluşturdukları komplekslerin yük değişimi Zeta Sizer ile ölçülmüş, aralarındaki etkileşimin kompleksin yükünü nasıl değiştirdiği araştırılmıştır (Şekil 4.15).

Dinamik ışık saçılımı yöntemi ile analiz sonucunda siRNA molekülleri, PEI-SS-HA nanoparçacıkları ve PEI-SS-HA nanoparçacıklarının değişen miktarlarının siRNA'lar ile oluşturduğu PEI-SS-HA/siRNA (25/1, 50/1, 100/1, (a/a)) konjugatların yüzey yükleri sırasıyla -3,14 mV, +35,83 mV, +29,47 mV, +23,47 mV ve +16,03 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15). Buna göre sentezlenen nanoparçacık/siRNA oranı arttıkça oluşan kompleksin zeta potansiyel (mV) değeri düşmektedir. Elde edilen bu sonuçlar, Park vd.'nin (2010) PEI-SS-b-HA/siRNA etkileşimi ile ilgili elde ettiği sonuçlar ile örtüşmektedir. Park vd. yapmış oldukları çalışmada (PEI-SS)-b-HA/siRNA (15, 23 ve 38, (a/a)) parçacıkları için yüzey yüklerini dinamik ışık saçılımı yöntemi ile ölçmüş ve sırasıyla +12,1 mV, +6,8 mV ve +1,8 mV olarak bulmuşlardır [139].



Şekil 4.15. PEI-SS-HA/siRNA kompleksinin artan parçacık oranlarında ζ potansiyeli karakteristiği

4.5. *In vitro* Transfeksiyon Sonuçları

4.5.1. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Hücresel Alımının Değerlendirilmesi

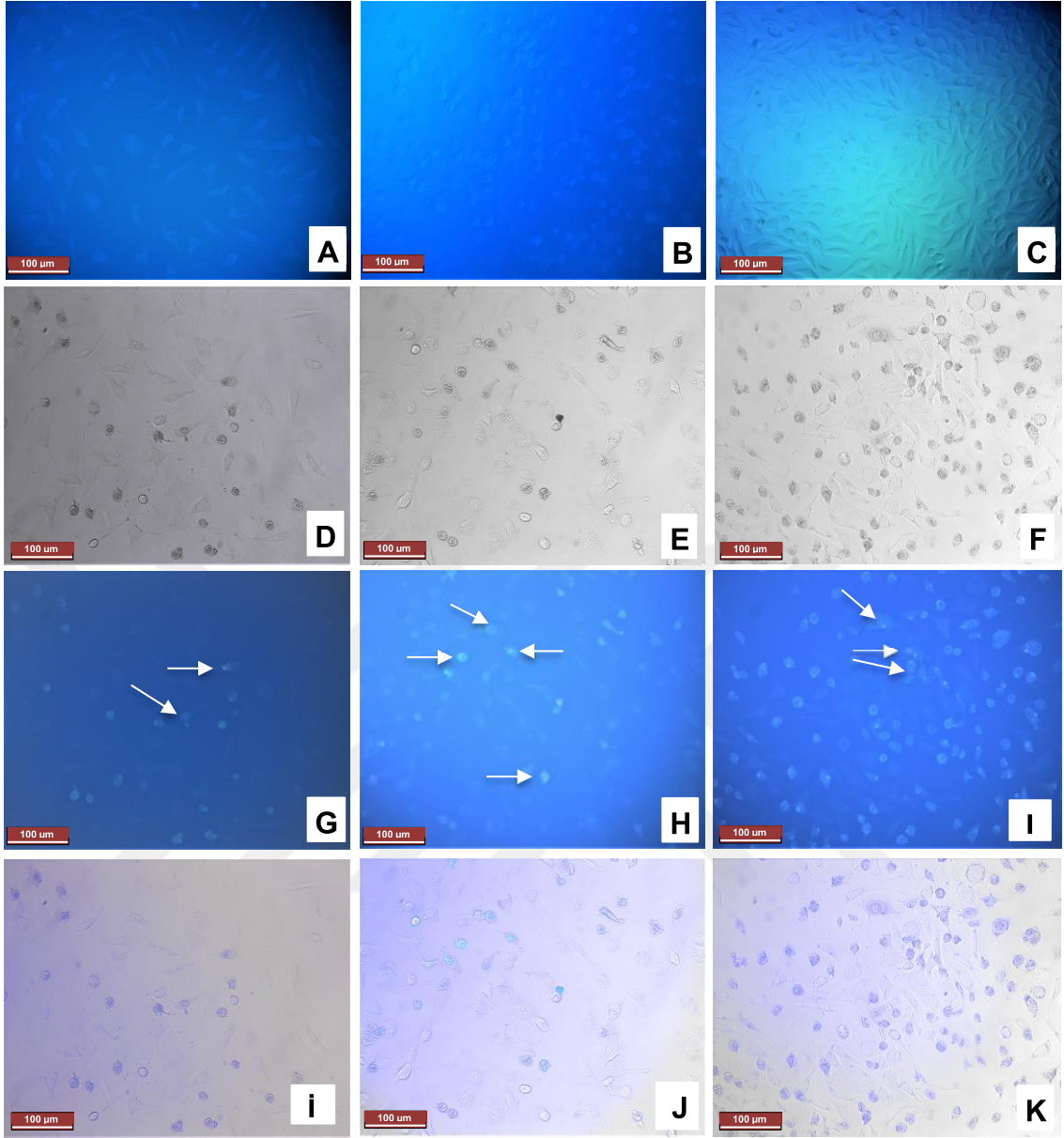
Bu çalışmada sentezlenen konjugatların L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerine alımı, floresan işaretli siRNA'lar (FAM-siRNA) ile oluşturdukları kompleksler aracılığıyla değerlendirilmiştir. Çalışmada değerlendirilmek üzere belirlenen gruplar ise sırasıyla, çıplak FAM-siRNA, Lipofektamin:FAM-siRNA (1:1 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$), PEI-HA:FAM-siRNA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$:50 nM), PEI-SS-HA:FAM-siRNA (100

$\mu\text{g/mL}$:50 nM), AuNP:FAM-siRNA (100 $\mu\text{g/mL}$:50 nM), AuPEI NP: FAM-siRNA (100 $\mu\text{g/mL}$:50 nM), AuPEI-HA: FAM-siRNA (100 $\mu\text{g/mL}$:50 nM) ve AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (100 $\mu\text{g/mL}$:50 nM) olmuştur. Çalışmada hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Belirlenen gruplardan çıplak siRNA ve Lipofektamin:FAM-siRNA, AuNP:FAM-siRNA, AuPEI NP:FAM-siRNA'ya ait görüntülerde FAM-siRNA kaynaklı ışımaya gözlenmemiş, sentezlenen konjugatlar aracılığıyla FAM-siRNA'nın hücre içerisine alımının az da olsa görüldüğü gruplar ise PEI-HA:FAM-siRNA, PEI-SS-HA:FAM-siRNA, AuPEI-HA:FAM-siRNA olmuş, en yüksek ışımalar (ışımalar görüntüler üzerinde beyaz oklarla gösterilmiştir) ise AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA grubunda görülmüştür (Şekil 4.16).

4.5.2. Sentezlenen Konjugatların Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Tüm örneklerin farklı konsantrasyonlarının (12,5-200 $\mu\text{g/mL}$) her üç hücre hattı üzerinde (L929 fare fibroblast, MDA-MB-231 meme kanseri ve CAPAN-1 pankreas kanseri) 24 saatlik hücre canlılığına etkisi WST-1 sitotoksikite testi ile araştırılmış ve 440 nm'de yapılan okuma sonucunda, her üç hücre hattı için kontrol grubunda elde edilen absorbans değerlerinin ortalamalarına göre örneklerin uygulandığı kuyulardaki absorbans değerleri kullanılarak % canlılık değerleri elde edilmiştir ve 3 tekrarlı yapılan deneyden elde edilen % canlılık değerleri standart hataları ile birlikte verilmiştir (Çizelge 4.5).

Uygulanan her bir parçacığın 100 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu için ayrı ayrı olmak üzere üç farklı hücre hattındaki % hücre canlılıklarına etkisi Şekil 4.16'da bar grafikleri şeklinde ifade edilmiş, elde edilen ortalama % hücre canlılık değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılıkları ise student T-testi ile belirlenmiştir.



Şekil 4.16. Konjugat/FAM siRNA komplekslerinin hücresel alımı. A) L929 Kontrol grubu, B) MDA-MB-231 Kontrol grubu, C) CAPAN-1 Kontrol grubu, D) L929 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (Aydınlık alan), E) MDA-MB-231 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (Aydınlık alan), F) CAPAN-1 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (Aydınlık alan), G) L929 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (DAPI filtresi), H) MDA-MB-231 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (DAPI filtresi), I) CAPAN-1 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (DAPI filtresi), J) L929 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (D-G birleşim), K) MDA-MB-231 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (E-H birleşim), L) CAPAN-1 AuPEI-HA-DOX:FAM-siRNA (F-I birleşim)

Çizelge 4.5. Sentezlenen konjugatların farklı konsantrasyonlarının üç farklı hücre hattı üzerindeki sitotoksitesisi (24 st.)

Konsantr. (µg/mL)	L929 Hücre Canlılığı (%) ± Std. Hata							
	PEI (2kDa)	PEI-HA	PEI-SS-HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI-HA	AuPEI-HA-DOX	DOKSORUBİSİN
0	100±0,01	100±0,01	100±0,01	100±0,002	100±0,002	100±0,002	100±0,002	100±2,12
12,5	107,64±15,96	112,13±9,98	96,23±6,12	107±6,55	104,3±3,85	111,7±1,42	133±2,56	56,74±3,84
25	111,46±18,53	110,78±9,18	97,57±12,14	118,3±1,77	106,6±7,49	127,4±16,67	108±0,29	49,09±1,89
50	118,84±22,07	98,11±5,37	102,16±4,61	127,8±9,44	101,1±11,36	106,3±8,41	121±7,71	38,78±1,96
100	95,45±9,88	115,36±9,40	99,73±6,99	117,8±4,53	112,8±6,06	104±9,26	111±8,11	37,21±0,65
200	87,99±2,93	98,65±3,27	76,82±5,30	148,8±15,48	125,9±3,21	124,5±3,99	103±5,27	-

Konsantr. (µg/mL)	MDA-MB-231 Hücre Canlılığı (%) ± Std. Hata							
	PEI (2kDa)	PEI-HA	PEI-SS-HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI-HA	AuPEI-HA-DOX	DOKSORUBİSİN
0	100±0,01	100±0,01	100±0,01	100±0,02	100±0,02	100±0,02	100±0,02	100±4,58
12,5	84.77±2.61	95,37±11,52	84,91±5,15	121,6±14,11	115,4±11,67	85,59±3,79	92,8±9,77	47,1±1,98
25	88.72±1.21	102,40±5,50	98,63±3,42	115,3±13,43	93,14±2,57	91,25±9,82	77,5±3,18	43,59±2,71
50	73.06±4.03	113,21±5,64	125,21±30,28	187,3±26,97	111,8±5,23	92,28±12,88	67,1±16,07	41,94±1,19
100	69.82±2.75	110,46±2,68	91,60±2,43	128±0,91	112,5±2,19	83,53±5,35	88,2±7,59	38,66±2,59
200	63.19±3.96	85,93±1,36	79,76±0,51	120,6±2,49	110,8±4,92	78,56±4,7	82±2,76	-

Konsantr. (µg/mL)	CAPAN-1 Hücre Canlılığı (%) ± Std. Hata							
	PEI (2kDa)	PEI-HA	PEI-SS-HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI-HA	AuPEI-HA-DOX	DOKSORUBİSİN
0	100±0,03	100±0,03	100±0,03	100±0,455	100±0,455	100±0,455	100±0,455	100±5,97
12,5	69.71±0.79	90,80±14,99	109,30±11,96	136±7,11	92,44±16,37	119,3±17,25	107±18,06	73,15±3,53
25	76.70±4.02	88,90±16,41	72,68±32,22	118,7±0,76	84,38±14,63	121,1±22,97	104±21,56	60,78±2,95
50	67.38±1.80	75,62±7,68	85,48±4,54	121,1±7,92	81,61±13,01	106,9±18,97	110±13,81	52,04±2,44
100	70.52±4.95	50,44±2,88	57,05±3,43	70,36±6,22	46,22±3,42	86,74±10,15	102±20,39	40,71±3,21
200	59.88±1.67	50,77±3,84	43,42±1,40	70,62±4,14	50,83±5,58	69,72±2,39	81,6±14,03	-

Sentezlenen parçacıkların artan konsantrasyonlarının genel olarak MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücreleri üzerinde L-929 hücrelerine göre beklenen şekilde daha sitotoksik olduğu görülmüştür. L929 hücreleri üzerinde ise DOX'in serbest formu hariç, sentezlenen tüm bu parçacıkların dozuna bağlı bir sitotoksik etki görülmemiştir. Antrasiklin grubu bir antibiyotik olan ve antineoplastik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılan doksorubisinin, serbest formda uygulandığı durumda eşit konsantrasyonda diğer tüm konjugatlar ile karşılaştırıldığında, sitotoksik etkisi her üç hücre hattı üzerinde de beklenildiği üzere daha yüksek çıkmıştır. Serbest formda uygulanan Doksorubisin için hesaplanan yarı maksimum inhibisyon konsantrasyon değerleri (IC50) ise L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücre hatları için sırasıyla 24,84  g/mL, <12,5  g/mL ve 66,6  g/mL bulunmuştur. IC50 değerinin d  mesi ile sitotoksik etkinin yükseldiği bilindiğinden, doksorubisin kimyasalının sitotoksik etkisinin en yüksek MDA-MB-231 hücreleri üzerinde olduğu belirlenmiştir.

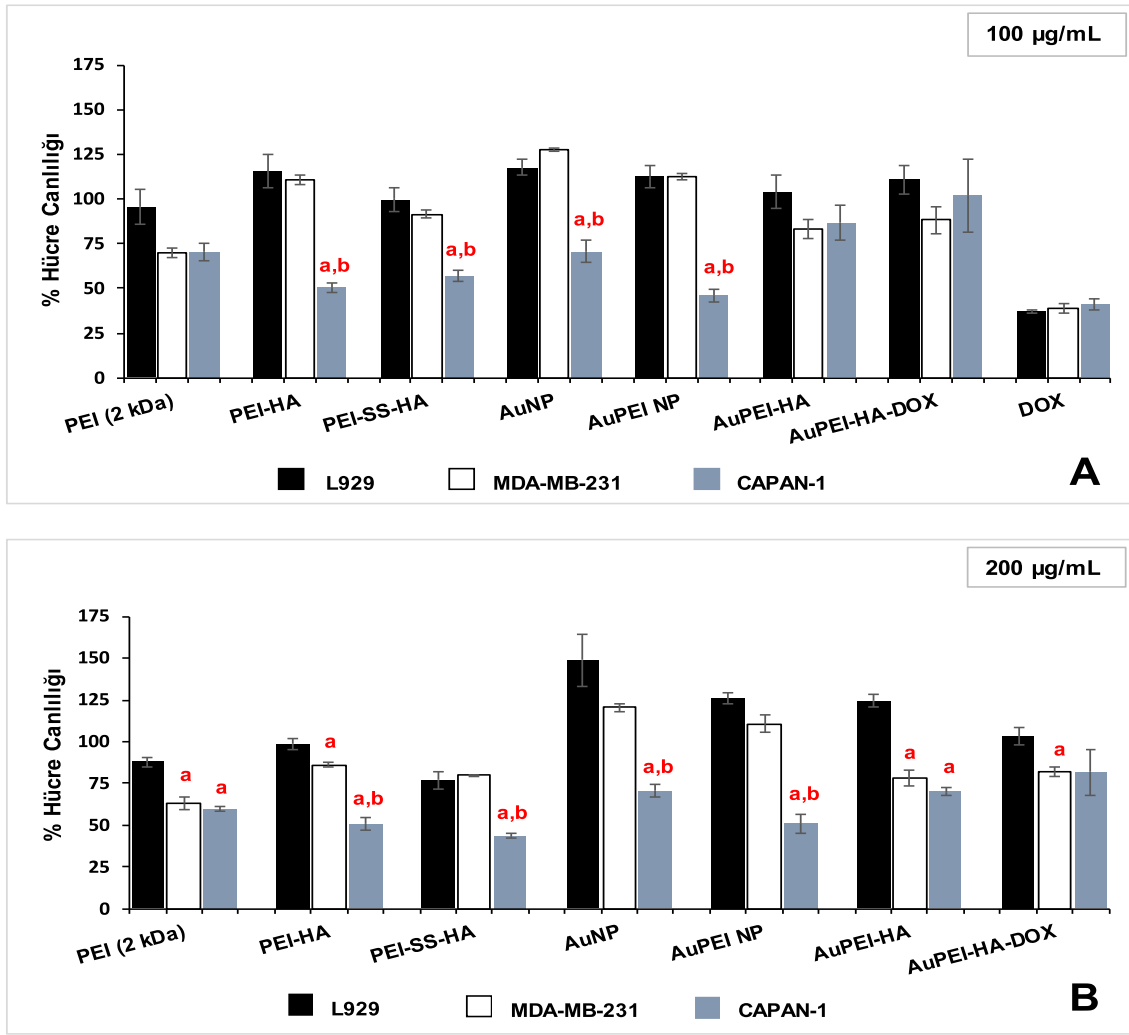
Çizelge 4.5'teki hücre canlılık değerleri gözönüne alındığında sentezlenen polimerik konjugatlara bağlanan doksorubisinin (AuPEI-HA-DOX) ise IC50 değerinin her üç hücre hattı için de 200  g/mL'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Her üç hücre hattında da artan DOX konsantrasyonu ile birlikte hücre canlılıklarında azalma görülmüştür.

DOX-polimer konjugatları oluşturan Dong vd.'de benzer bir şekilde MCF-7 hücre canlılığının DOX konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir. Yine bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer bir şekilde serbest DOX'in sentezledikleri konjugatlara göre hücresel alım farklılıklarından dolayı MCF-7 hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Sentezledikleri konjugatlarda DOX konsantrasyonu artsa da, konjugatların düşük antiproliferatif etki gösterdiklerini bildirmişlerdir [223]. Bu tez çalışmasında sentezlenen Au-PEI-HA-DOX parçacıklarının da benzer bir şekilde artan konsantrasyonlarının her üç hücre hattı üzerinde de hücre canlılıklarına etkisi düşük olmuş, hücre canlılığı %67'nin altına d  memi tir.

Her üç hücre hattına da PEI-HA, PEI-SS-HA, AuNP ve AuPEI NP parçacıklarının 100 µg/mL konsantrasyonları uygulandığında CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerindeki hücre canlılık değerleri (sırasıyla, %50,44, %57,05, %70,36 ve %46,22) hem L929 hem de MDA-MB-231 hücrelerine göre anlamlı derecede az bulunmuştur (Şekil 4.17.A). Bu farklı hücre hatlarına 200 µg/mL konsantrasyonunda ayrı ayrı uygulanan AuPEI-HA-DOX haricindeki tüm parçacıkların ise CAPAN-1 hücrelerinin canlılık değerlerinin L929 hücrelerine göre anlamlı derecede düşmesine neden olmuş, yine bu parçacıklardan PEI (2 kDa), PEI-HA, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX, MDA-MB-231 hücre canlılığını L929 hücrelerine göre önemli derecede azaltmıştır (sırasıyla, %63,19, %85,93, %78,56 ve %82) (Şekil 4.17.B).

Bu çalışma kapsamında ayrıca, sentezlenen parçacıklar ve bu parçacıkların siRNA'lar (25 nM) ile oluşturdukları komplekslerin 100 µg/mL konsantrasyonları hem normal hem de kanserli hücrelere uygulanmış ve 24 saatin ardından bu kompleksler ile muamele edilen hücrelere radyoterapi de uygulandıktan sonra WST-1 hücre canlılık testi yapılmış ve elde edilen tüm gruplara ait % canlılık $\pm$ std. hata sonuçları Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

DOX'in *in vitro* salımı deneyinde elde edilen sonuçlara göre, hücreler üzerine ilave edilen AuPEI-HA-DOX konjugatından kültür ortamına salınan DOX miktarı teorik olarak ~200 nM (0,1 µg) bulunmuştur. Dolayısıyla, AuPEI-HA-DOX konjugatının, uygulandığı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi %33'ü geçmemiştir. Yine, AuPEI-HA veya AuPEI-HA-DOX konjugat uygulaması sonrasında elde edilen hücre canlılık değerleri arasında yapılan kıyaslamaya göre, sitotoksitede, yapıya eklenen DOX'den kaynaklı anlamlı bir artış gözlenmemiştir.

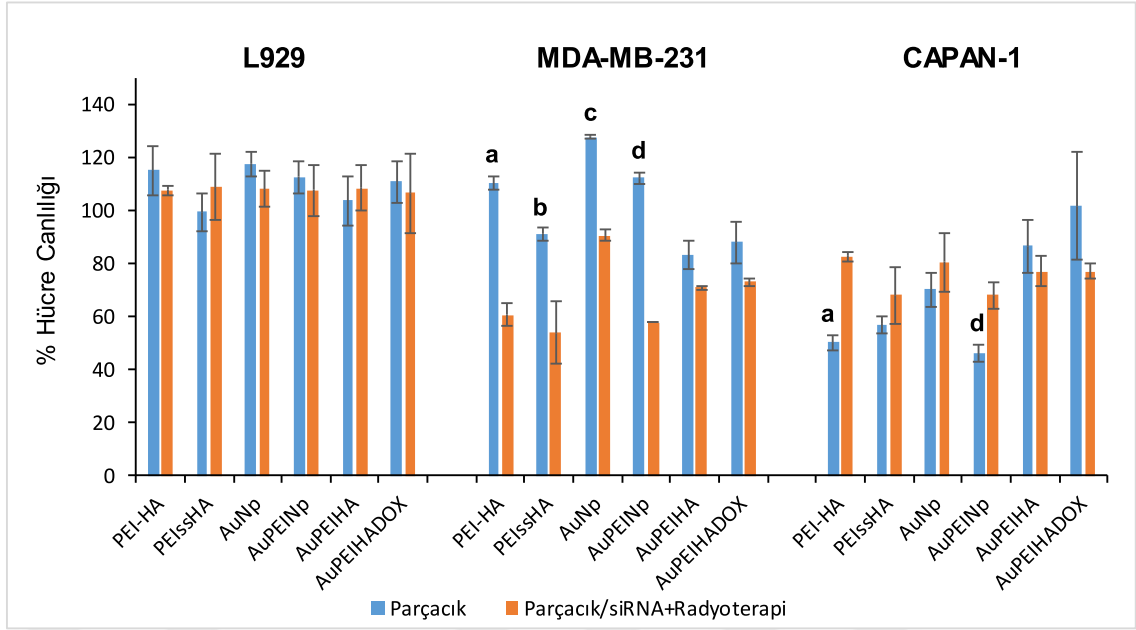


Şekil 4.17. Sentezlenen parçacıkların uygulandığı (24 st.) L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerin canlılıklarının karşılaştırılması. A) Parçacık konsantrasyonu 100 µg/mL, B) Parçacık konsantrasyonu 200 µg/mL. a: $p < 0,05$ L929 hücre hattına göre, b: $p < 0,05$ MDA-MB-231 hücre hattına göre.

Çizelge 4.6. Parçacık/siRNA kompleksleri uygulamasını takiben radyasyon terapi sonucundaki hücre canlılık değerleri (% canlılık $\pm$ std. hata)

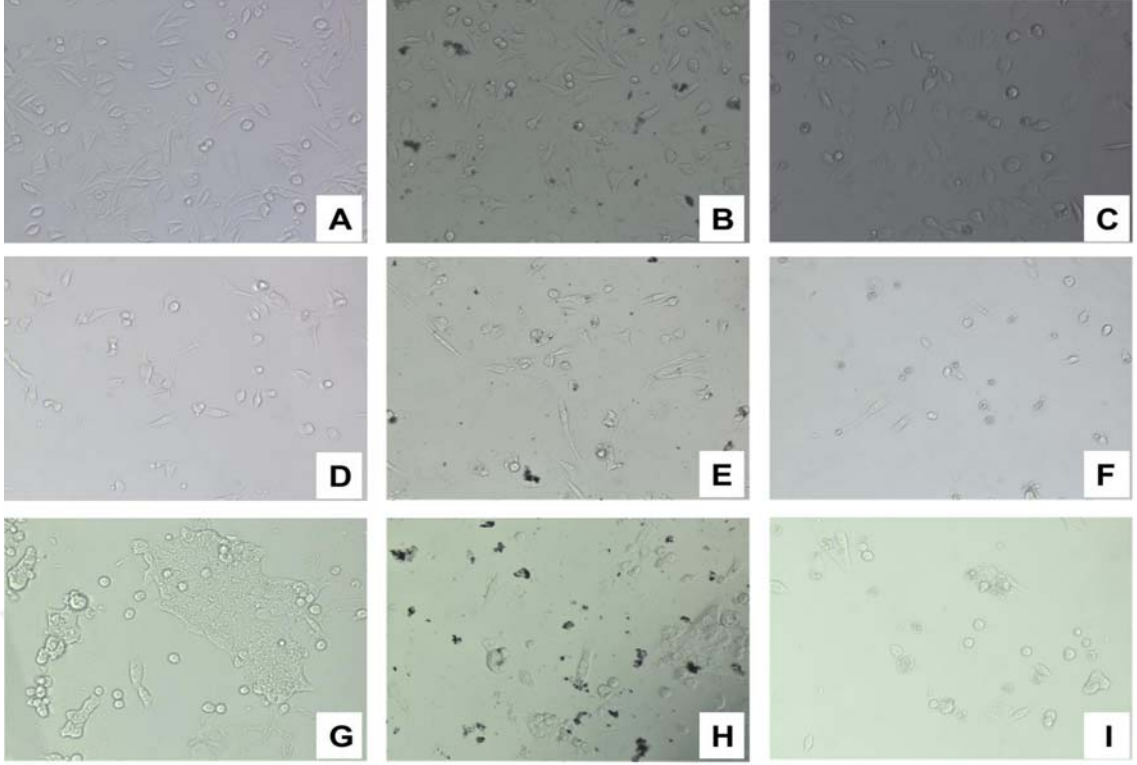
Örnek Adı	Hücre Canlılığı (%) $\pm$ Std. Hata		
	L929	MDA-MB-231	CAPAN-1
PEI-HA/siRNA	107,80 $\pm$ 2,06	60,79 $\pm$ 4,13	82,89 $\pm$ 1,82
PEIssHA/siRNA	109,10 $\pm$ 12,68	54,13 $\pm$ 11,59	68,16 $\pm$ 10,99
AuNp/ siRNA	108,34 $\pm$ 6,72	90,83 $\pm$ 2,32	80,69 $\pm$ 11,09
AuPEINp/ siRNA	108,02 $\pm$ 9,64	58,06 $\pm$ 0,00	68,26 $\pm$ 4,97
AuPEIHA/ siRNA	108,78 $\pm$ 8,67	71,07 $\pm$ 0,50	77,34 $\pm$ 5,64
AuPEIHADOX/ siRNA	106,72 $\pm$ 14,84	73,19 $\pm$ 1,61	77,34 $\pm$ 2,77

Her üç hücre hattına da sentezlenen parçacıkların (100 µg/mL) 24 saatlik uygulaması sonrasında ve ayrıca parçacıkların siRNA'lar (son konsantrasyon 25 nM) ile oluşturdukları komplekslere ilaveten radyoterapi uygulaması sonrasında yapılan WST-1 analizi sonuçları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlılığı Student T-testi ile de araştırılmıştır. Buna göre, L929 hücre hattında sadece parçacık uygulaması ve parçacık/siRNA kompleksi uygulamasına ilaveten radyasyon uygulaması sonrası, aralarında istatistiksel açıdan bir farklılık saptanmamış, MDA-MB-231 hücre hattında, PEI-HA, PEI-SS-HA, AuNP, AuPEI NP uygulaması ile yine aynı parçacıkların siRNA ile oluşturdukları komplekslerin uygulanmasını takiben radyoterapi uygulaması sonrasında % hücresel canlılık açısından anlamlı (sırasıyla, $p<0,01$, $p<0,05$, $p<0,01$ ve $p<0,01$) derecede azalma görülmüştür (sırasıyla, %60,8, %54,1, %90,8 ve %58,1) ve özellikle Au içeren konjugatlar için (AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX) radyasyon uygulamasının sitotoksitesiyi artırıcı yönde etki ettiği görülmüştür ki AuNP'lerin, radyasyonu absorplama kapasitesi sayesinde kanser hücrelerinde ölüme neden olmasından dolayı bu beklenen ve istenilen bir sonuçtur. Shen vd.' de benzer bir çalışmada PEI-Au NR'leri sentezleyip bunların hem tek başına hem de siRNA ile oluşturdukları komplekslerin MDA-MB-231 ve SUM-159 hücreleri canlılığına etkileri ile bu uygulamalara ilaveten uygulanan radyasyon terapisinin hücre canlılığına etkilerini karşılaştırmış, radyasyon terapisinin hücre canlılığının azalmasında artırıcı bir etkisinin olduğunu kanıtlamışlardır [226]. CAPAN-1 hücre hattında ise PEI-HA ve AuPEI NP'lerin uygulanması durumunda benzer bir karşılaştırma yapıldığında bunun tam tersi bir şekilde % hücresel canlılık anlamlı ölçüde (sırasıyla, $p<0,01$ ve $p<0,05$) artmıştır (sırasıyla, %82,89 ve %68,26) (Şekil 4. 18).



Şekil 4.18. Parçacık uygulanan ve parçacık-siRNA kompleksleri uygulamasına ilaveten radyasyon terapisi uygulanan hücrelerin hücre canlılıklarının karşılaştırılması. Sonuçlar % hücre canlılığı $\pm$ std. hata olarak bildirilmiştir. a: $p < 0,05$ PEI-HA için, b: $p < 0,05$ PEI-SS-HA için, c: $p < 0,05$ AuNP için, d: $p < 0,05$ AuPEI NP için, e: $p < 0,05$ AuPEI-HA için, f: $p < 0,05$ AuPEI-HA-DOX için radyasyon terapisi sonrasında göre.

Bu çalışma kapsamında ayrıca her üç hücre hattının da, sentezlenen AuNP ve AuPEI-HA-DOX parçacıklarının 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları uygulandıktan 24 saat sonra ışık mikroskobu altındaki görüntüleri alınmıştır. Buna göre uygulamanın yapıldığı hücrelerin kontrol grubu hücrelerine kıyasla morfolojilerindeki farklılık araştırılmıştır (Şekil 4.19). Buna göre her üç hücre hattına da uygulanan AuNP'ler fotoğraflarda (B, E ve H) siyah, ölü hücreler ise yuvarlak şekilde görülmektedir. Uygulanan AuPEI-HA-DOX parçacıklar ilgili fotoğraflarda net bir şekilde gözlemlenememiş (C, F ve I), ölü hücreler de yine yuvarlak şekilde görülmektedir.



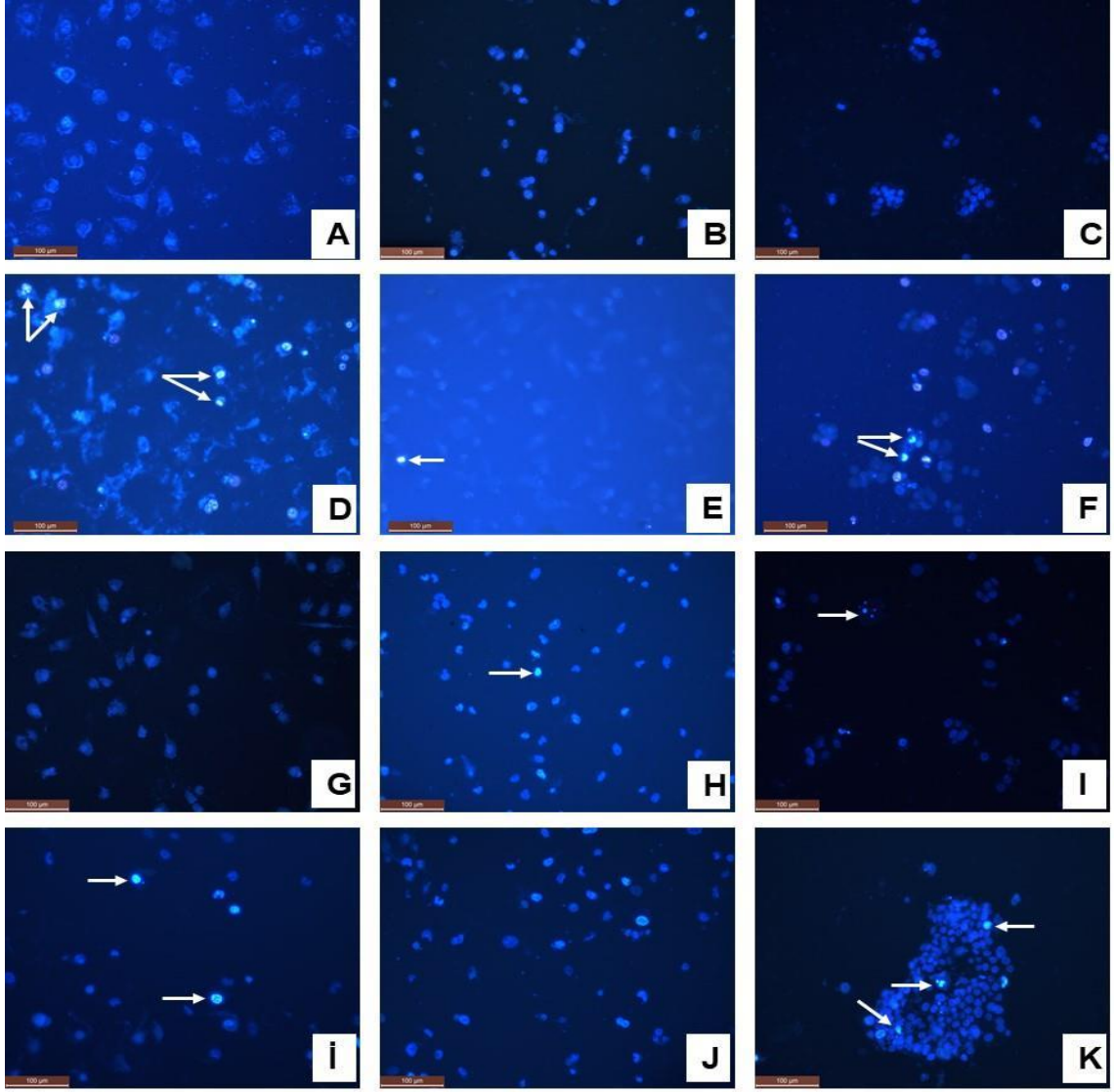
Şekil 4.19. 24 Saatlik uygulama sonrası hücrelerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri A-D-G) Sırasıyla L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 kontrol grupları; B-E-H) L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 (AuNP, 200 µg/µL, sırasıyla); C-F-I) L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 (AuPEI-HA-DOX, 200 µg/µL, sırasıyla)

4.5.3. Sentezlenen Konjugatların Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Apoptotik ve Nekrotik Etkilerinin Belirlenmesi

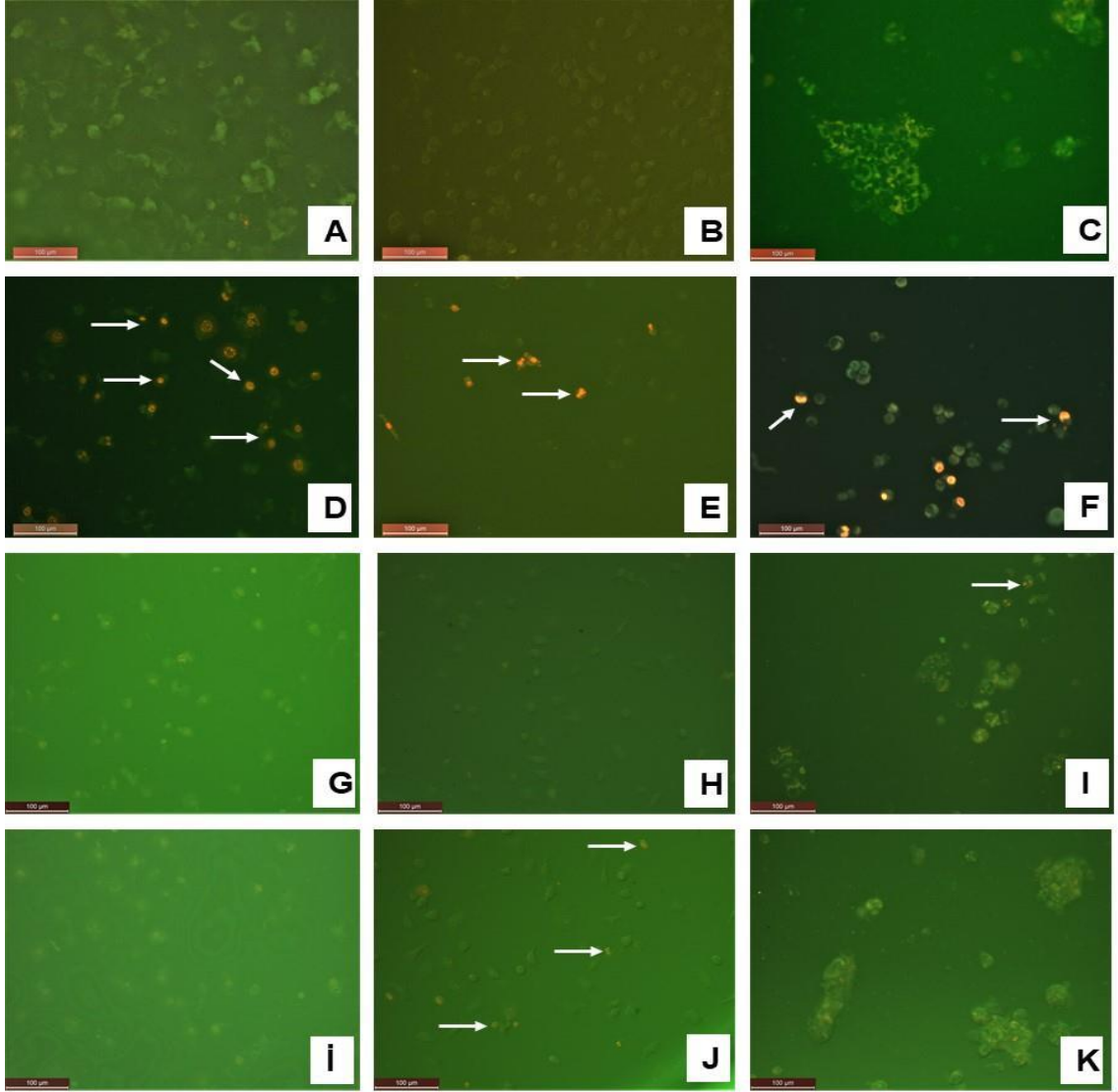
Apoptotik ve nekrotik indeksin belirlenmesi için ikili boyama yapılmıştır. Kontrol grubu olarak sadece besiyeri içeren hücreler kullanılmıştır. İkili boyama solüsyonunda bulunan hoechst 33342 apoptotik hücreleri boyayarak, DAPI filtresinde parlak mavi renkte göstermektedir (Şekil 4.20). Nekrotik hücreler ise hücre membranı zarar gördüğü için propidyum iyodürle boyanarak FITC filtresinde kırmızı renkte görülmektedir (Şekil 4.21).

Canlı hücreler DAPI filtresinde mavi renkte, FITC filtresinde yeşil renkte görülmektedir. Parçacıkların değişen konsantrasyonlarının (0-200 µg/mL)

uygulandığı 3 farklı hücre hattına ait olan hücrelerin ikili boyama sonrası DAPI ve FITC filtrelerine sahip inverted mikroskop ile görüntülemeleri yapılmış, her bir grup için ayrı ayrı olarak rastgele alınan 3 mikroskobik görüntüdeki apoptotik ve nekrotik hücrelerin normal hücrelere oranı hesaplanarak veriler apoptotik-nekrotik % indeks $\pm$ std. hata olarak verilmiştir (Çizelge 4.7). Her üç hücre hattında da parçacıkların uygulanması sonrasındaki apoptotik ve nekrotik etkiler değerlendirildiğinde, özellikle L929 hücre hattında apoptotik etkinin genel olarak ya çok az tespit edilebildiği ya da edilemediği söylenebilir. Nekrotik etki ise PEI-HA ve PEI-SS-HA parçacıklarının konsantrasyonuna bağlı olarak artmış, PEI (2 kDa), AuPEI NP, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX parçacıkları uygulamasından sonra ise konsantrasyondan bağımsız bir şekilde artış göstermiştir. En yüksek nekrotik etki ise %70 nekrotik indeks değeri ile PEI-SS-HA'nın 200 μ g/mL konsantrasyonunda saptanmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında L929 hücre hattındakine benzer bir şekilde apoptotik etki ya çok az görülmüş ya da görülmemiştir. En yüksek apoptotik etkide ise apoptotik indeks değeri %9'u geçmemiştir. Nekrotik etki ise PEI (2 kDa), PEI-HA ve PEI-SS-HA parçacıkları için en yüksek 100 μ g/mL konsantrasyonunda (nekrotik indeks değerleri sırasıyla, %28,5, %42,5 ve %22,5) saptanmış, tespit edilen en yüksek nekrotik etki ise %50 nekrotik indeks değeri ile AuPEI-HA-DOX parçacığının 200 μ g/mL konsantrasyonunda görülmüştür. CAPAN-1 hücre hattında diğer iki hücre hattındakinden farklı olarak apoptotik etkiler özellikle AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX parçacıklarının uygulanması durumunda gözlenmiş, ancak görülen apoptotik etkiler dozdan bağımsız bir şekilde artış göstermiştir. %22,5 apoptotik indeks değeri ile en yüksek apoptotik etki ise AuPEI-HA-DOX parçacığının 200 μ g/mL konsantrasyonunun uygulandığı durumda görülmüştür. Aynı hücre hattında genel olarak nekrotik etki apoptotik etkiye göre daha az tespit edilebilmiş, en yüksek nekrotik etki (Nekrotik indeks değeri %25) yine AuPEI-HA-DOX parçacığının 200 μ g/mL konsantrasyonunda saptanmıştır (Çizelge 4.7). Parçacıkların hücre canlılığına etkileri topluca değerlendirildiğinde, gerek hücre canlılığını azaltması (MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücre hatlarında) gerekse hem apoptozu (CAPAN-1 hücre hattında) hem de nekrozu artırması (MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücre hatlarında) açısından sentezlenen AuPEI-HA-DOX parçacıklarının kanserin hedefli terapisinde kullanılmaya aday oldukları söylenebilir.



Şekil 4.20. İkili boyama yöntemi ile apoptotik L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerinin gösterilmesi (beyaz oklar apoptotik hücreleri göstermektedir). A) L929 kontrol grubu, B) MDA-MB-231 kontrol grubu, C) CAPAN-1 kontrol grubu, D) PEI-HA (100 µg/mL) uygulanan L929 hücreleri, E) PEI-HA (100 µg/mL) uygulanan MDA-MB-231 hücreleri, F) PEI-HA (100 µg/mL) uygulanan CAPAN-1 hücreleri, G) AuPEI NP (100 µg/mL) uygulanan L929 hücreleri, H) AuPEI NP (100 µg/mL) uygulanan MDA-MB-231 hücreleri, I) AuPEI NP (100 µg/mL) uygulanan CAPAN-1 hücreleri, J) AuPEI-HA-DOX (100 µg/mL) uygulanan L929 hücreleri, K) AuPEI-HA-DOX (100 µg/mL) uygulanan MDA-MB-231 hücreleri, L) AuPEI-HA-DOX (100 µg/mL) uygulanan CAPAN-1 hücreleri



Şekil 4.21. İkili boyama yöntemi ile nekrotik L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerinin gösterilmesi (beyaz oklar nekrotik hücreleri göstermektedir). A) L929 kontrol grubu, B) MDA-MB-231 kontrol grubu, C) CAPAN-1 kontrol grubu, D) PEI-HA (100 µg/mL) uygulanan L929 hücreleri, E) PEI-HA (100 µg/mL) uygulanan MDA-MB-231 hücreleri, F) PEI-HA (100 µg/mL) uygulanan CAPAN-1 hücreleri, G) AuPEI NP (100 µg/mL) uygulanan L929 hücreleri, H) AuPEI NP (100 µg/mL) uygulanan MDA-MB-231 hücreleri, I) AuPEI NP (µg/mL) uygulanan CAPAN-1 hücreleri, İ) AuPEI-HA-DOX (100 µg/mL) uygulanan L929 hücreleri, J) AuPEI-HA-DOX (100 µg/mL) uygulanan MDA-MB-231 hücreleri, K) AuPEI-HA-DOX (100 µg/mL) uygulanan CAPAN-1 hücreleri

Çizelge 4.7. Sentezlenen konjugatların uygulandığı L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerinde % apoptotik ve nekrotik indeksler

Konsantr. ($\mu\text{g/mL}$)	L929 Hücre Hattı													
	Apoptotik % İndeks $\pm$ Std. Hata							Nekrotik % İndeks $\pm$ Std. Hata						
	PEI (2 kDa)	PEI-HA	PEI-SS-HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI-HA	AuPEI- HA-DOX	PEI (2 kDa)	PEI-HA	PEI-SS-HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI-HA	AuPEI- HA-DOX
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	4,50 $\pm$ 0,50	4,50 $\pm$ 0,50	4,50 $\pm$ 0,50	4,50 $\pm$ 0,50	4,50 $\pm$ 0,50	4,50 $\pm$ 0,50	4,50 $\pm$ 0,50
12,5	0,00 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 0,67	0,67 $\pm$ 0,67	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 0,67	1,00 $\pm$ 1,00	1,33 $\pm$ 0,67	0,00 $\pm$ 0,00	23,00 $\pm$ 1,00	21,50 $\pm$ 3,50	31,00 $\pm$ 1,00
25	0,83 $\pm$ 0,83	1,33 $\pm$ 1,33	3,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 1,00	3,00 $\pm$ 1,53	18,00 $\pm$ 2,00	12,00 $\pm$ 2,00	1,00 $\pm$ 1,00	13,00 $\pm$ 3,00	17,00 $\pm$ 7,00	12,00 $\pm$ 0,00
50	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 1,00	15,33 $\pm$ 8,51	21,33 $\pm$ 3,53	13,75 $\pm$ 1,25	4,00 $\pm$ 2,00	10,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	10,00 $\pm$ 0,00
100	0,00 $\pm$ 0,00	4,50 $\pm$ 0,50	2,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 2,00	48,33 $\pm$ 9,70	32,5 $\pm$ 7,50	33,50 $\pm$ 1,50	3,00 $\pm$ 1,00	19,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	8,00 $\pm$ 2,00
200	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 1,00	2,25 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	26,00 $\pm$ 2,00	40,00 $\pm$ 5,77	70,00 $\pm$ 2,00	9,00 $\pm$ 1,00	27,50 $\pm$ 2,50	2,00 $\pm$ 2,00	7,00 $\pm$ 3,00

Konsantr. ($\mu\text{g/mL}$)	MDA-MB-231 Hücre Hattı													
	Apoptotik % İndeks $\pm$ Std. Hata							Nekrotik % İndeks $\pm$ Std. Hata						
	PEI (2 kDa)	PEI-HA	PEI-SS- HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI+HA	AuPEI- HA-DOX	PEI (2 kDa)	PEI-HA	PEI-SS- HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI-HA	AuPEI-HA- DOX
0	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00
12,5	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	5,50 $\pm$ 0,50	6,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 1,00	4,00 $\pm$ 1,15	2,00 $\pm$ 1,15	2,00 $\pm$ 1,15	7,00 $\pm$ 1,00	4,50 $\pm$ 1,50	0,00 $\pm$ 0,00	10,00 $\pm$ 0,00
25	1,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 1,50	1,00 $\pm$ 1,00	1,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 2,00	2,25 $\pm$ 0,25	9,00 $\pm$ 1,00	1,50 $\pm$ 1,50	12,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 1,00	8,00 $\pm$ 0,00
50	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	8,00 $\pm$ 2,00	9,00 $\pm$ 1,00	3,00 $\pm$ 1,00	8,50 $\pm$ 0,50	5,00 $\pm$ 1,00	4,00 $\pm$ 2,00	2,00 $\pm$ 2,00	1,00 $\pm$ 1,00	20,00 $\pm$ 0,00	4,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 1,00
100	9,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 1,00	5,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	28,50 $\pm$ 4,50	42,50 $\pm$ 7,50	22,50 $\pm$ 2,50	1,00 $\pm$ 1,00	5,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	17,00 $\pm$ 1,00
200	4,00 $\pm$ 4,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 1,00	15,00 $\pm$ 5,00	21,00 $\pm$ 7,02	18,50 $\pm$ 3,50	16,00 $\pm$ 4,00	0,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	50,00 $\pm$ 0,00

Konsantr. (μ g/mL)	CAPAN-1 Hücre Hattı													
	Apoptotik % Indeks $\pm$ Std. Hata							Nekrotik % Indeks $\pm$ Std. Hata						
	PEI (2 kDa)	PEI-HA	PEI-SS-HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI-HA	AuPEI- HA-DOX	PEI (2 kDa)	PEI-HA	PEI-SS-HA	AuNP	AuPEI NP	AuPEI-HA	AuPEI-HA- DOX
0	-	-	-	0,50 $\pm$ 0,50	0,50 $\pm$ 0,50	0,50 $\pm$ 0,50	0,50 $\pm$ 0,50	-	-	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
12,5	-	-	-	9,00 $\pm$ 1,00	2,50 $\pm$ 0,50	11,00 $\pm$ 1,00	19,00 $\pm$ 1,00	-	-	-	0,00 $\pm$ 0,00	5,50 $\pm$ 0,50	12,00 $\pm$ 2,00	4,50 $\pm$ 0,50
25	-	-	-	13,00 $\pm$ 1,00	12,50 $\pm$ 2,50	8,00 $\pm$ 2,00	7,00 $\pm$ 1,00	-	-	-	9,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 2,00
50	-	-	-	15,00 $\pm$ 1,00	5,00 $\pm$ 0,00	9,00 $\pm$ 1,00	5,00 $\pm$ 3,00	-	-	-	0,00 $\pm$ 0,00	12,50 $\pm$ 2,50	10,00 $\pm$ 0,00	5,50 $\pm$ 0,50
100	-	0,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 0,50	9,50 $\pm$ 4,50	17,00 $\pm$ 1,00	2,00 $\pm$ 2,00	4,50 $\pm$ 0,50	-	0,00 $\pm$ 0,00	12,00 $\pm$ 0,10	2,00 $\pm$ 0,00	8,00 $\pm$ 2,00	2,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 1,00
200	-	-	-	11,00 $\pm$ 1,00	18,00 $\pm$ 2,00	8,00 $\pm$ 2,00	22,5 $\pm$ 2,50	-	-	-	4,50 $\pm$ 0,50	10,00 $\pm$ 2,00	10,00 $\pm$ 0,00	25,00 $\pm$ 5,00

Parçacık uygulamalarının (24 st.) yapıldığı her üç hücre hattı için, 100 µg/mL konsantrasyonunda parçacıkların uygulanması durumunda, apoptotik ve nekrotik hücrelerin % indeks değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığına student T-testi ile bakılmıştır. Buna göre MDA-MB-231 hücre hattında PEI-HA ve PEI-SS-HA örnekleri için apoptoz değeri L929'a göre anlamlı bir şekilde azalmıştır (sırasıyla, %4,5 ve %2,25). Yine MDA-MB-231 hücre hattında AuPEI-HA örneği için L929'a göre anlamlı bir artış olmuştur (%5). CAPAN-1 hücre hattında AuPEI NP için L929'a göre anlamlı bir artış olmuştur (%17). CAPAN-1 hücre hattında PEI-SS-HA, AuPEI NP ve AuPEI-HA-DOX örnekleri için de MDA-MB-231'a göre anlamlı artışlar olmuştur (sırasıyla, %6, %17 ve %4,5). % Nekrotik indeks değerlerine bakıldığında ise, MDA-MB-231 hücre hattında AuNP ve AuPEI NP örnekleri için nekroz değeri L929'a göre azalmış (%1 ve %5), AuPEI-HA-DOX örneği için ise artmıştır (%17). CAPAN-1 hücre hattında PEI-HA, PEI-SS-HA ve AuPEI NP örnekleri için nekroz L929'a göre azalmış (sırasıyla, %0, %12 ve %8), AuNP örneği için ise tam tersi olarak artmıştır (%10). Yine CAPAN-1 hücre hattında L929 ile yapılan karşılaştırma sonuçlarına benzer bir şekilde PEI-HA ve PEI-SS-HA örnekleri için nekroz MDA-MB-231'a göre azalmış (sırasıyla %0 ve %12), AuNP ve AuPEI NP örnekleri için ise tam tersi olarak artmıştır (sırasıyla, %10 ve %8) (Çizelge 4.7).

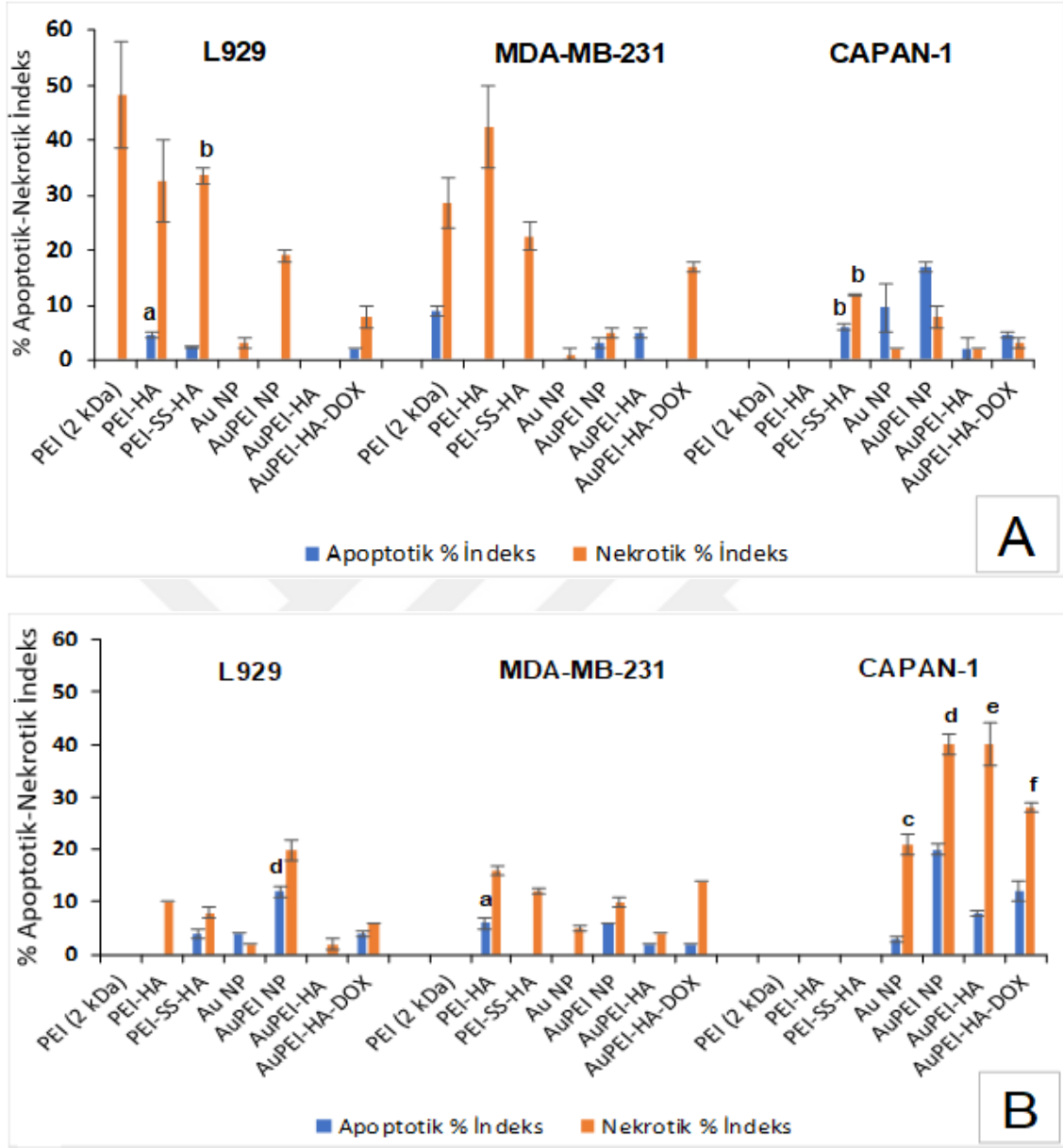
Bu çalışma kapsamında ayrıca, sentezlenen parçacıklar ve bu parçacıkların siRNA'lar ile oluşturdukları komplekslerin 100 µg/mL konsantrasyonları hem normal hem de kanserli hücrelere uygulanmış ve 24 saatin ardından bu kompleksler ile muamele edilen hücrelere radyoterapi de uygulandıktan sonra ikili boyama yöntemi ile elde edilen tüm gruplara ait apoptotik-nekrotik indeks sonuçları Çizelge 4.8'de gösterilmiştir. Buna göre siRNA'lı konjugatlarla muamele sonrasında radyoterapi uygulandığında en yüksek apoptotik indeks değeri AuPEI NP için, CAPAN-1 hücre hattında %20, en yüksek nekrotik indeks değeri ise AuPEI NP ve AuPEI-HA örnekleri için CAPAN-1 hücre hattında %40 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.8.Konjugatların ve radyoterapinin uygulandığı L929, MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerine ait apoptotik-nekrotik indeks sonuçları

Örnek Adı	Apoptotik %İndeks $\pm$ Std. Hata			Nekrotik %İndeks $\pm$ Std. Hata		
	L929	MDA-MB-231	CAPAN-1	L929	MDA-MB-231	CAPAN-1
Kontrol	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 1,00	20,00 $\pm$ 2,00
PEI-HA/siRNA	0,00 $\pm$ 0,00	6,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	10,00 $\pm$ 0,00	16,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00
PEI-SS-HA/siRNA	4,00 $\pm$ 1,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	8,00 $\pm$ 1,00	12,00 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00
AuNP/siRNA	4,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,50	2,00 $\pm$ 0,00	5,00 $\pm$ 0,50	21,00 $\pm$ 2,00
AuPEI NP/siRNA	12,00 $\pm$ 1,00	6,00 $\pm$ 0,00	20,00 $\pm$ 1,00	20,00 $\pm$ 2,00	10,00 $\pm$ 1,00	40,00 $\pm$ 2,00
AuPEI-HA/siRNA	0,00 $\pm$ 0,00	2,00 $\pm$ 0,00	8,00 $\pm$ 0,50	2,00 $\pm$ 1,00	4,00 $\pm$ 0,00	40,00 $\pm$ 4,00
AuPEI-HA-DOX/siRNA	4,00 $\pm$ 0,50	2,00 $\pm$ 0,00	12,00 $\pm$ 2,00	6,00 $\pm$ 0,00	14,00 $\pm$ 1,00	28,00 $\pm$ 1,00

Sentezlenen parçacıkların uygulanan her üç hücre hattına ait hücrelerdeki apoptotik-nekrotik % indeks değerleri ve parçacıkların siRNA'lar ile oluşturdukları kompleksleri takiben radyoterapi uygulanan her üç hücre hattına ait hücrelerdeki apoptotik-nekrotik % indeks değerleri arasında da kıyaslama yapılmış, farklılıkların anlamlılıkları Student t-test ile belirlenmiştir (Şekil 4.22). Buna göre, L929 hücrelerine PEI-HA örneğinin (100 μ g/mL) siRNA ile oluşturduğu kompleksin uygulanmasını takiben radyasyon terapisi uygulanması durumunda, sadece PEI-HA örneği uygulamasına göre apoptozun anlamlı bir şekilde ($p>0,05$) azaldığı (0,00 $\pm$ 0,00), MDA-MB-231'de ise tam tersi olarak anlamlı ölçüde ($p<0,05$) arttığı (6,00 $\pm$ 1,00), benzer karşılaştırma AuPEI için yapıldığında ise L929 hücrelerinde apoptozun anlamlı derecede ($p<0,01$) arttığı (12,00 $\pm$ 1,00) belirlenmiştir. CAPAN-1 hücrelerine PEI-SS-HA uygulamasını takiben radyasyon uygulanması durumunda ise sadece PEI-SS-HA örneği uygulamasına göre apoptoz anlamlı ($p<0,01$) bir şekilde azalmış (0,00 $\pm$ 0,00), AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX uygulamaları için benzer karşılaştırma yapıldığında ise hücreler üzerindeki nekrotik etkinin önemli ölçüde ($p<0,05$) arttığı (sırasıyla, 21,00 $\pm$ 2,00, 40,00 $\pm$ 2,00, 40,00 $\pm$ 4,00, 28,00 $\pm$ 1,00) belirlenmiştir (Şekil 4.22). Özetle, Au içeren AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX parçacıklarının uygulamasına ilaveten yapılan radyasyon terapisinin özellikle parçacıklar tarafından hedeflenmek istenen CAPAN-1 hücrelerinin nekrozunu anlamlı derecede arttırdığı görülmüş, ayrıca L929 hücre hattında apoptoz ve

nekroz açısından genel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır ki, her iki sonuç da bu tez çalışmasının önemli bulguları arasındadır.

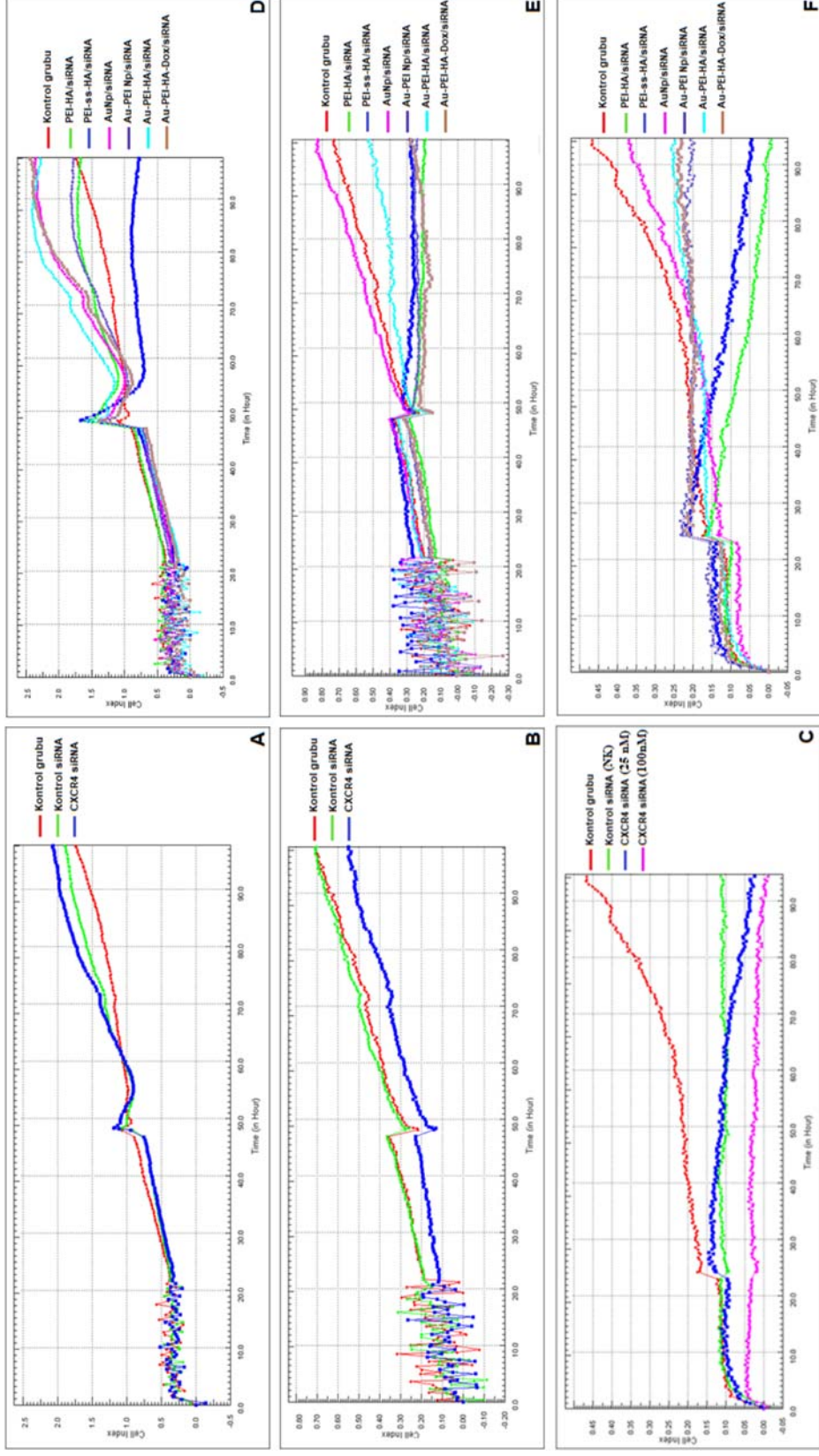


Şekil 4.22. Parçacık uygulanan (A) ve parçacık-siRNA kompleksleri uygulamasına ilaveten radyasyon terapisi uygulanan (B) hücreler üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerin karşılaştırılması. Sonuçlar apoptotik-nekrotik % indeks $\pm$ std. hata olarak bildirilmiştir. a: $p < 0,05$ PEI-HA için, b: $p < 0,05$ PEI-SS-HA için, c: $p < 0,05$ AuNP için, d: $p < 0,05$ AuPEI NP için, e: $p < 0,05$ AuPEI-HA için, f: $p < 0,05$ AuPEI-HA-DOX için radyasyon terapisi sonrasına göre.

4.5.4. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Farklı Hücre Hatları Üzerindeki Proliferatif Etkinin İncelenmesi

XCelligence mikroelektronik biyosensör sistemi ile hazırlanan PEI-HA/si, PEI-SS-HA/si, AuNP/si, AuPEI NP/si, AuPEI-HA/si, AuPEI-HA-DOX/si konjugatlarının 48 saat boyunca hücre proliferasyonuna etkisi incelenmiş ve zamana bağlı Cell Index (CI) değerleri kullanılarak elde edilen grafikler Şekil 4.23'te verilmiştir. Buna göre L929 ve CAPAN-1 hücre hatları için kontrol grubu (uygulama yapılmayan) ile kıyaslandığında, negatif kontrol siRNA veya CXCR4 siRNA'ların direkt uygulamalarının sonrasında (48 saat sonra) hücre çoğalmasında artış olmakla birlikte aralarında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Buna karşılık, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan negatif kontrol siRNA ve CXCR4'ün farklı konsantrasyonlarının uygulanmalarının sonrasında (72 saat sonra) hücre çoğalmasında, kontrol grubu ile kıyaslandığında azalma görülmüştür (Şekil 4.23.A-C).

Bu çalışma kapsamında hücreler üzerine, sentezlenen konjugatlar (100 µg/mL) ile birlikte etkileştirilen siRNA'lar (25 nM) uygulanmış ve hücre çoğalmasına etkilerine bakılmıştır (Şekil 4.23.D-F). Buna göre L929 hücre hattı için kontrol grubu hücrelerine kıyasla yalnızca PEI-SS-HA/siRNA komplekslerinin uygulanması sonrasında (48 saat sonra) hücre çoğalmasında azalma olmuştur (Şekil 4.23.D). L929 hücrelerine komplekslerin uygulanması sonrasında genel olarak hücre çoğalmamasının etkilenmemesi istenilen bir sonuç olup, hedefli terapinin başarısını göstermektedir. CAPAN-1 hücrelerine komplekslerin uygulanması sonrasında (48 saat sonra) ise AuNP/siRNA hariç diğer komplekslerin antiproliferatif etkileri görülmüştür. En yüksek antiproliferatif etki ise PEI-HA/siRNA, PEI-SS-HA/siRNA, AuPEI NP/siRNA, AuPEI-HA-DOX/siRNA kompleksleri uygulandığında gözlenmiştir (Şekil 4.23.E). MDA-MB-231 hücrelerine komplekslerin uygulanma süresi ise diğer hücrelerden farklı olarak 72 saat sürmüştür. Bu sürenin sonunda AuNP/siRNA'ların yine altının biyoyumlu olmasından dolayı en az, PEI-HA/siRNA ve PEI-SS-HA/siRNA komplekslerinin ise en çok antiproliferatif etkiye neden olduğu görülmüş, AuPEI NP/siRNA, AuPEI-HA/siRNA ve AuPEI-HA-DOX/siRNA komplekslerinin ise benzer bir antiproliferatif etki gösterdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.23.F).

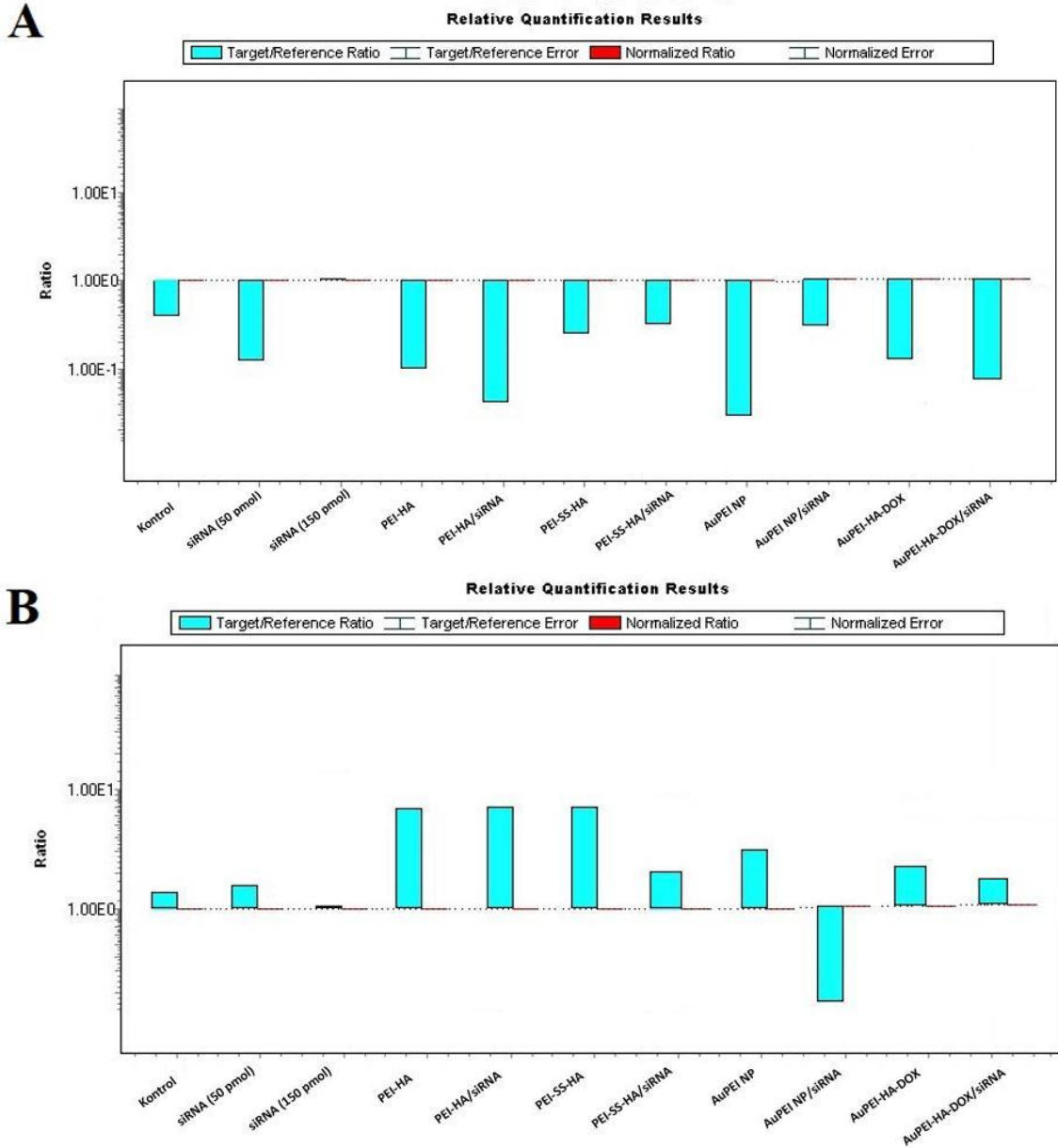


Şekil 4.23. L929, CAPAN-1 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına uygulanan parçacık: siRNA komplekslerinin (100 µg/mL: 25 nM) hücre proliferasyonuna etkisi. A-D) L929 hücrelerine yapılan uygulamalar (48 saatlik etki), B-E) CAPAN-1 hücrelerine yapılan uygulamalar (48 saatlik etki), C-F) MDA-MB-231 hücrelerine yapılan uygulamalar (72 saatlik etki).

4.5.5. Konjugat/siRNA Komplekslerinin Farklı Hücre Hatlarındaki Hedef Gen İfadelenmesi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Bu çalışma kapsamında sentezlenen konjugatlardan belirlenenlerin (PEI-HA, PEI-SS-HA, AuPEI NP, AuPEI-HA-DOX) ve bunların siRNA ile oluşturdukları komplekslerin CXCR4 gen ekspresyonuna etkisi hem CAPAN-1 hem de MDA-MB-231 hücre hatlarında araştırılmış ve çalışma ile ilgili rölatif miktarsal analiz sonuçları Şekil 4.24'te verilmiştir. Çalışma kapsamında CXCR4 gen ifadesinin değerlendirilmesi, GAPDH housekeeping geninin ifadesi ile yapılan karşılaştırmaya göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki hedef geni susturma etkinliği en yüksek AuPEI NP konjugatının uygulaması sonucunda gerçekleşmiş, AuPEI-HA-DOX/siRNA, PEI-HA/siRNA kompleksleri ve AuPEI-HA-DOX konjugatı uygulamalarında da anlamlı bir şekilde gen ifadenmesi azalmıştır (Şekil 4.24.A). CAPAN-1 hücre hattında ise yalnızca AuPEI/siRNA kompleksi uygulaması sonucunda hedef CXCR4 geni susturulabilmiştir (Şekil 4.24.B).

Sentezlenen konjugat ve bunların siRNA ile yapmış oldukları komplekslerin uygulanması sonrasında MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde hedef gen CXCR4'ün ifadenmesini baskılama miktarları da yine RT-PCR analizi sonucunda hesaplanmış ve CXCR4 gen ifadenmesinde 56 kat azalma ile en yüksek baskılamayı AuPEI NP'lerin sağladığı sonucuna ulaşılmıştır. Bunu ~25 katlık bir azalma sağlayan AuPEI-HA-DOX/siRNA konjugatları izlemiştir. CAPAN-1 hücre hattında ise gen ifadenmesinin AuPEI NP/siRNA uygulaması sonrasında ~6 kat azaldığı hesaplanmıştır. CXCR4 gen ifadenmesini azaltmaya yönelik Yu vd.'nin yapmış oldukları çalışmada ise sentezlenen kitosan nanoparçacıklarının CXCR4 siRNA ile oluşturdukları kompleksin gen susturma etkinliğini aynı konsantrasyondaki lipofektamin/siRNA kompleksininkine oldukça yakın (gen ifadenmesinde ~%50 azalma) bulmuşlardır [245]. Yine Park vd.'nin yapmış oldukları başka bir çalışmada, sentezlenen PEI-SS-b-HA konjugatların VEGF-siRNA ile oluşturdukları komplekslerin uygulanması ile hedef tümör dokularındaki VEGF mRNA seviyesinde 2 katlık bir azalma sağlanabilmiştir [139].

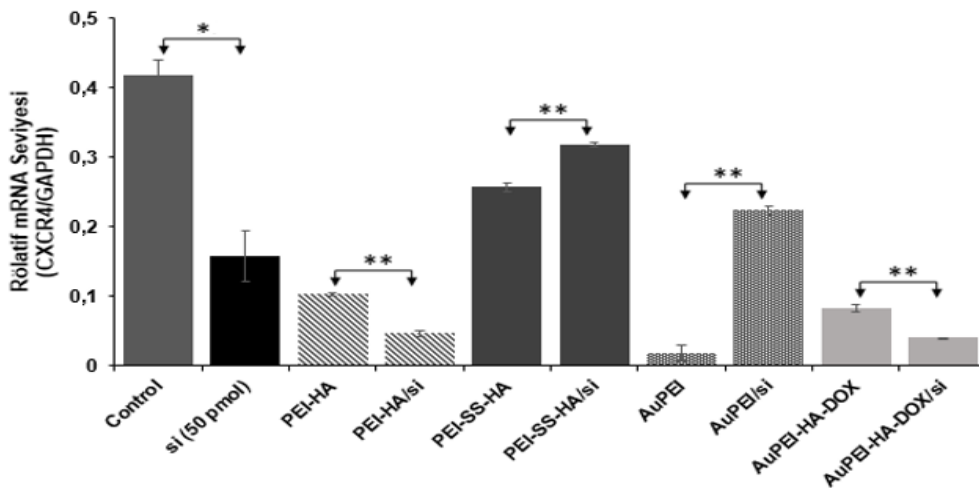


Şekil 4.24. Sentezlenen konjugat ve konjugat/siRNA komplekslerinin hedef gen CXCR4 ifadenmesi üzerindeki etkileri A) MDA-MB-231 hücre hattı üzerindeki gen ifadenmesine etkiler; B) CAPAN-1 hücre hattı üzerindeki gen ifadenmesine etkiler

Bu çalışmada kullanılan DOX'in tek başına, CXCR4 hedef geninin ifadenmesi üzerindeki etkisi ise yapılan literatür araştırması ile değerlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında hedef hücreler üzerine uygulanan AuPEI-HA-DOX konjugatından kültür ortamına salınan DOX'in teorik miktarı 200 nM olarak hesaplanmış, bu miktarın kanser hücrelerindeki hedef gen ekspresyonu üzerine etkisi öngörölmeye çalışılmıştır. Konu ile ilgili Fang vd.'nin yapmış olduğu çalışmada MCF-7 hücreleri üzerine serbest DOX'in 1,5 μ M konsantrasyonda uygulanması

sonucunda CXCR4 hedef gen ekspresyonu seviyesi %97,8 bulunmuştur [246]. Dragoj vd.'nin yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, doksorubisine dirençli olduğu bilinen NCI-H4601R hücrelerine 50 nM konsantrasyonda DOX uygulanması sonucunda da hedef gen CXCR4 ekspresyonu baskılanamamakla birlikte, kontrole göre ekspresyon seviyesinde yaklaşık 7 katlık bir artış görülmüştür [247]. Tüm bu veriler ışığında, RT-PCR çalışması sonucunda MDA-MB-231 hücre hattındaki hedef gen CXCR4 ekspresyonu üzerindeki baskılama etkisinin AuPEI-HA-DOX konjugatından hücre kültür ortamına salınan DOX'ten kaynaklanmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Dolayısı ile, elde edilen bu başarının sadece, konjugattaki DOX ile ilgili olmayıp, AuPEI-HA-DOX/siRNA kompleksinin kendisi ile ilgili olduğu sonucuna varılmıştır.

Gruplar arasında yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre ise tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde gen ifadenmesinin baskılandığı görülmüştür (Şekil 4.25). PEI-HA/siRNA ve AuPEI-HA-DOX/siRNA komplekslerinin de sırasıyla PEI-HA ve AuPEI-HA-DOX konjugatlarına göre gen ifadenmesini anlamlı olarak daha da azalttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Sentezlenen konjugat ve konjugat/siRNA komplekslerinin uygulandığı MDA-MB-231 hücrelerinde rölatif CXCR4 mRNA seviyesi

Sonuç olarak, sentezlenen tüm konjugat ve komplekslerin MDA-MB-231 hücrelerinde oldukça başarılı bir şekilde hedef gen CXCR4'ün ifadenmesini baskılayabildikleri, ancak CAPAN-1 hücreleri üzerinde aynı etkiyi gösteremedikleri tespit edilmiştir. CAPAN-1 pankreas kanseri hücrelerinde hedef gen ekspresyonu üzerinde istenilen başarının sağlanamamasındaki en önemli neden, bu hücre hattının kemoterapötik ajanlara direncinin oldukça yüksek olmasıdır. Dolayısı ile, çoklu ilaç dirençliliği gösteren bu hücrelere, özellikle kemoterapötik ajan olarak doksorubisin içeren AuPEI-HA-DOX konjugatı uygulaması ile, bu konjugatların hücre içerisine alımının yetersiz olmasından dolayı hedef gen ekspresyonu baskılanamamıştır. Başarının sağlanamamasındaki önemli nedenlerden bir diğeri ise, CAPAN-1 hücrelerinin kültür ortamındaki yayılımının oldukça sıkı bir şekilde gerçekleşmesi ve dolayısıyla hücreler arasındaki mesafenin MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla çok daha az olması nedeniyle hücrelere alımının daha az olmasıdır. Nedenlerden bir diğeri ise CAPAN-1 hücrelerinin kültür ortamında daha hızlı yayılması nedeniyle, birim hücre başına düşen parçacık sayısının daha az olmasının olabileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında meme ve pankreas kanseri hücrelerine siRNA'nın etkili taşınımı amacıyla PEI ve Au temelli taşıma sistemleri geliştirilmiş ve hedef CXCR4 geninin ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Sentezlenen taşıma sistemlerinden Au temelli, doksorubisin içeren konjugatlar literatürde ilk defa çalışılmış olup, bu parçacıklar sayesinde kanser terapisinde gen terapi, radyasyon terapisi ve kemoterapi kombinasyonel bir şekilde uygulanmıştır. Sentezlenen PEI temelli PEI-HA ve PEI-SS-HA konjugatları ise farklı araştırma grupları tarafından daha önce de çalışılmış olsa da bu çalışma kapsamında seçilen hedef genin susturulmasında ve hedef hücre hatlarından CAPAN-1'de ilk defa çalışılmıştır.

Çalışma kapsamında sentezlenen hem PEI, hem de Au temelli konjugatlarda bulunan HA sayesinde ise siRNA'ların, CD44 ve RHAMM aşırı eksprese eden kanser hücrelerine spesifik, reseptör aracılı endositoz aracılığıyla taşınımı gerçekleştirilebilmiştir.

PEI temelli konjugatların (PEI-HA ve PEI-SS-HA) sentezi için optimizasyon çalışmaları kapsamında belirlenen en uygun yöntem homojenizasyon, dinamik ışık saçılım yöntemi ile elde edilen sonuçlar ışığında belirlenen en uygun oran ise 50:1 (PEI'nin HA'ya oranı, a/a) olmuştur. Bu oran ile elde edilen PEI:HA ve PEI-SS-HA konjugatlarının ortalama hidrodinamik çapları sırasıyla, $330 \pm 19,12$ nm ve $203,37 \pm 3,57$ nm, zeta potansiyelleri ise sırasıyla $+13,73 \pm 2,84$ mV ve $+35,83 \pm 1,43$ mV olarak belirlenmiştir. Dinamik ışık saçılımı yönteminin uygulandığı zeta sizer cihazı ile 24 saat aralıklarla 72 saat boyunca alınan boyut ölçümlerine göre her iki konjugat türünde de zamana bağlı olarak bir aglomerasyon gerçekleşmemiş, parçacıklar, sulu çözeltileri şeklinde iken 72 saat boyunca stabilitelerini korumuşlardır. PEI temelli bu konjugatların SEM ile karakterizasyon sonuçlarına göre ise parçacık şekillerinin ağırlıklı olarak küresel olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen Au temelli konjugatların sentezinde ise ilk olarak yüksek saflıkta nanoparçacık sentezine imkan veren bir yöntem olan lazer ablasyon tekniği ile eş zamanlı olarak AuNP'ler ve PEI ile kaplı AuPEI NP'ler sentezlenmiş, zeta sizer ile yapılan analiz sonucuna göre parçacık boyutları sırasıyla 91 nm ve 25 nm olarak bulunmuştur. Lazer ablasyon tekniği ile sulu çözeltide oluşan AuNP'lerin eş zamanlı olarak sentez ortamında bulunan PEI ile kaplanması sonucunda, AuNP'ler agrege olmadan, çok daha küçük boyutta (25 nm) AuPEI NP'ler oluşturulabilmiştir. Ardından, sentezlenen AuPEI NP'lerin dış yüzeyine, yine karbodiimit aracılı birleştirme kimyası kullanılarak siRNA'ların hedefe spesifik taşınımını sağlayan HA molekülleri kovalent olarak bağlanmıştır. Elde edilen AuPEI-HA parçacıklarının doksorubisin kemoterapötik ajanı ile etkileştirilmesi sonucunda ise nihai olarak AuPEI-HA-DOX konjugatları oluşturulmuş, elde edilen bu nihai parçacıkların +10,6 mV olarak belirlenen yüzey yükü sayesinde, siRNA'ları serum içeren hücre kültür ortamında nükleazlarca parçalanmadan hücre içerisine taşıyabilecekleri, bu çalışma kapsamında yapılan ileri araştırmalar ile ispatlanmıştır. Bu çalışma kapsamında elde edilen PEI-HA, PEI-SS-HA ve AuPEI-HA-DOX konjugatlarının sahip oldukları pozitif yüzey yükleri sayesinde siRNA ile elektrostatik olarak etkileşebilecekleri sonucuna varılmıştır.

PEI-HA, PEI-SS-HA, AuPEI NP, AuPEI-HA ve AuPEI-HA-DOX konjugatları oluşumu ¹H-NMR ve FT-IR analizleri aracılığıyla da, spektrumlardaki karakteristik piklerin değerlendirilmesi ile ispatlanmıştır. Elementel analiz ile bPEI ve HA arasındaki konjugasyon derecesi 1 mol HA başına 2,25 mol bPEI olarak hesaplanmıştır. Glutasyon ile indirgenebilir, biyobozunur PEI-SS-HA konjugatında elde edilen %1,05'lik sülfür oranı ile sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiği kanıtlanmıştır.

AuPEI-HA-DOX konjugatından DOX'in iki farklı pH'da (5,0 ve 7,4) *in vitro* salımının araştırıldığı çalışmada ise, literatür ile uyumlu olarak serbest DOX'in kümülatif salımı beklenildiği üzere konjugattan salıma göre daha yüksek

gerçekleşmiş, DOX'in konjugattan salımı da yine literatür (ort. %57) ile yapılan kıyaslamaya göre ise daha yüksek bulunmuştur (ort. %66).

Tez çalışması kapsamında sentezlenen parçacıkların negatif yüklü siRNA (parçacık/siRNA, 100/1, a/a) ile elektrostatik etkileşim sayesinde kompleks oluşturması ise jelde geciktirme analizi ile araştırılmış, buna göre -17,3 mV zeta potansiyeline sahip AuNP'ler dışında tüm parçacıkların yapılarında bulunan katyonik bPEI sayesinde, beklenildiği üzere siRNA ile etkileşime girebildiği gösterilmiştir.

Konjugatların siRNA'ları L929 ve hedef MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücrelerine güvenli ve etkili taşıma yeteneği ise floresan işaretli siRNA (FAM-siRNA) ile oluşturdukları kompleksler aracılığıyla değerlendirilmiş, floresan ışık altında (DAPI filtresi) yapılan görüntülemeye göre hücre içerisine en çok alım MDA-MB-231 hücre hattında olup, en yüksek ışımaya AuPEI-HA-DOX/FAM-siRNA komplekslerinin uygulanması durumunda gözlenmiştir.

Parçacıkların belirlenen konsantrasyonlarının (12,5-200 µg/ml) farklı üç hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri ise WST-1 hücre canlılığı analiz yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre, uygulanan parçacıkların artan konsantrasyonlarının genel olarak hedef kanser hücre hatlarında (MDA-MB-231 ve CAPAN-1), L929 normal hücre hattına göre hücre canlılığında daha fazla azalmaya neden olmuş ancak, hücre canlılığı hiçbir hücre hattında ve hiçbir konsantrasyonda DOX uygulaması haricinde %43'ün altına düşmemiştir.

Bu çalışma kapsamında ayrıca, üç farklı hücre hattına da sentezlenen parçacıkların siRNA'lar ile oluşturdukları komplekslere ilaveten radyasyon terapisi de uygulanmış, sonrasında yapılan WST-1 analiz sonucunda elde edilen % canlılık değerleri, parçacıkların yalnız uygulanması sonrasında elde edilen değerler ile karşılaştırılmış ve yapılan kıyaslama sonucunda özellikle MDA-MB-231 hücre hattında, tüm parçacıklar için radyasyon terapisi sonrasında elde

edilen canlılık değerlerinde anlamlı azalma görülmüştür. Her iki hedef kanser hücre hattında da özellikle Au'nun radyasyonu absorplama kapasitesinden dolayı AuPE-HA-DOX nihai parçacıkların uygulanması durumunda, radyasyon sonrasında elde edilen % hücre canlılık değerlerinde düşüş saptanmıştır.

Sentezlenen parçacıkların üç farklı hücre hattı üzerindeki apoptotik veya nekrotik etkileri ise ikili boyama yöntemi ile araştırılmıştır. Bunun sonucunda, L929 normal hücre hattı üzerinde hiçbir parçacığın apoptotik etki değeri %5'in, nekrotik etki değeri ise 100 µg/mL'ye kadar %34'ün üzerinde çıkmamıştır. MDA-MB-231 ve CAPAN-1 hücre hatlarında AuPEI-HA-DOX parçacığının 200 µg/mL konsantrasyonunun uygulanması durumunda belirlenen apoptotik etki değerleri sırasıyla %15 ve %23 olmuştur. Yalnız parçacık uygulaması ve parçacık/siRNA kompleksi uygulamasını takiben radyasyon terapisi sonrasında elde edilen apoptotik-nekrotik indeks değerleri karşılaştırıldığında ise, özellikle CAPAN-1 hücre hattı için, genel olarak Au içeren konjugatların uygulanması durumunda, hem nekrotik indeks değerlerinde (anlamlı olarak) hem de apoptotik indeks değerlerinde artışların olduğu saptanmıştır.

Parçacık/siRNA komplekslerinin farklı hücre hatları üzerindeki proliferatif etkileri gerçek zamanlı proliferasyon sistemi (RTCA) ile de araştırılmış ve genel olarak WST-1 ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Komplekslerin hedef kanser hücre hatlarındaki hedef gen (CXCR4) ifadenmesi üzerindeki etkileri ise RT-PCR analiz yöntemi ile GAPDH housekeeping geninin ifadesi ile yapılan karşılaştırma sonucunda tespit edilmiş, buna göre genel olarak susturma etkinliği MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde, CAPAN-1 hücre hattına göre çok daha yüksek çıkmıştır. MDA-MB-231 hücre hattında hedef gen ifadenmesini en yüksek, 56 katlık bir azalma ile AuPEI NP'ler baskılayabilirken, bunu 25 katlık bir azalma ile AuPEI-HA-DOX/siRNA kompleksleri izlemiştir. CAPAN-1 hücre hattında ise yalnızca AuPEI/siRNA kompleksi uygulaması ile hedef gen ifadenmesi baskılanabilmiştir.

In vitro analizler aracılığıyla elde edilen tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, sentezlenen gerek PEI temelli, gerekse Au temelli parçacıkların MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde, CAPAN-1 hücrelerine göre daha etkili oldukları sonucuna varılmıştır. Bunun en önemli nedeni de hedef kanser hücrelerinin kültür ortamında yayılım karakterlerinin farklı olması, dolayısıyla parçacıkların hücresel alımındaki farklılıklardır.

Sonuç olarak özellikle, hedefe spesifik siRNA taşıyıcı sistemi olarak literatürde ilk defa sentezlenen AuPEI-HA-DOX konjugatlarının, meme kanserinin kombinasyonel gen terapi, radyasyon terapi ve kemoterapisinde etkili bir şekilde kullanılabilecekleri ve *in vitro* çalışmalar ile elde edilen bu sonuçlar ışığında *in vivo* çalışmalar için potansiyellerinin olduğu gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Y. Lee, S.H. Lee, J.S. Kim, A. Maruyama, X. Chen, T.G. Park, Controlled synthesis of PEI-coated gold nanoparticles using reductive catechol chemistry for siRNA delivery, *Journal of controlled release*, 155 (2011) 3-10.
- [2] C. Moore, Gold Nanoparticles Enhance Cancer-Killing Radiation Efficiency; Reduce Side-Effects, *Radiation Therapy News*, 2015.
- [3] L. Torrisi, Gold nanoparticles enhancing protontherapy efficiency, *Recent patents on nanotechnology*, 9 (2015) 51-60.
- [4] R. Nelson, Combining Radiation and Chemotherapy May Improve Outcomes, *CURE, Cancer Updates, Research & Education* 2013.
- [5] K. Jiang, J. Li, J. Yin, Q. Ma, B. Yan, X. Zhang, L. Wang, L. Wang, T. Liu, Y. Zhang, Targeted delivery of CXCR4-siRNA by scFv for HER2+ breast cancer therapy, *Biomaterials*, 59 (2015) 77-87.
- [6] G. Karp, *Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiments*, 5 ed., John Wiley & Sons, Inc. 2008.
- [7] G.M. Cooper, R.E. Hausman, *Hücre: Moleküler yaklaşım*, BRC Ofset. Ltd. Şti.2016.
- [8] R.W. Ruddon, *Cancer Biology*, 4. Edition ed., Oxford University Press, Inc., United States of America, 2007.
- [9] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, M.J. Thun, Cancer statistics, 2009, *CA: a cancer journal for clinicians*, 59 (2009) 225-249.
- [10] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA: a cancer journal for clinicians*, 61 (2011) 69-90.
- [11] WHO, Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020, *World Health Organisation*, Geneva, 2003.
- [12] K.D. Başkanlığı, 2015 Yılı Kanser İstatistikleri, in: H.S.G.M. TC. Sağlık Bakanlığı (Ed.)Ankara, Türkiye, 2015.
- [13] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *cell*, 144 (2011) 646-674.
- [14] M.W. Pickup, J.K. Mouw, V.M. Weaver, The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer, *EMBO reports*, 15 (2014) 1243-1253.

- [15] E.A. Golemis, P. Scheet, T.N. Beck, E.M. Scolnick, D.J. Hunter, E. Hawk, N. Hopkins, Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States, *Genes & development*, 32 (2018) 868-902.
- [16] N. Hansson, F. Moll, D. Schultheiss, M. Krischel, Remembering Charles B. Huggins' Nobel Prize for hormonal treatment of prostatic cancer at its 50th anniversary, *Eur Urol*, 69 (2016) 971-972.
- [17] B.A. Chabner, T.G. Roberts Jr, Chemotherapy and the war on cancer, *Nature Reviews Cancer*, 5 (2005) 65.
- [18] A. Bolinger, A. Zangwill, J. Slattery, L. Risler, D. Sultan, D. Glidden, D. Norstad, M. Cowan, Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation, *Bone marrow transplantation*, 28 (2001) 1013.
- [19] Y. Liu, X. Wang, M. Hussain, M. Lv, X. Dong, T. Wang, X. Xu, B. Liu, Theranostics Applications of Nanoparticles in Cancer Immunotherapy, *Medical Sciences*, 6 (2018) 100.
- [20] J. Couzin-Frankel, Cancer immunotherapy, American Association for the Advancement of Science, 2013.
- [21] R.S. Riley, C.H. June, R. Langer, M.J. Mitchell, Delivery technologies for cancer immunotherapy, *Nature Reviews Drug Discovery*, (2019) 1.
- [22] P. Sharma, K. Wagner, J.D. Wolchok, J.P. Allison, Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps, *Nature Reviews Cancer*, 11 (2011) 805.
- [23] R. Kokate, A Systematic Overview of Cancer Immunotherapy: An Emerging Therapy, *Pharm. Pharmacol. Int. J*, 5 (2017) 31-35.
- [24] D. Lowy, J. Schiller, Preventing Cervical Cancer: The Development of HPV Vaccines, National Cancer Institute, 2016.
- [25] Y.-L. Lin, Y. Meng, W. Jiang, B. Roux, Explaining why Gleevec is a specific and potent inhibitor of Abl kinase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (2013) 1664-1669.
- [26] Y. Xin, M. Huang, W.W. Guo, Q. Huang, L. zhen Zhang, G. Jiang, Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy, *Molecular cancer*, 16 (2017) 134.
- [27] E.R. Rayburn, R. Zhang, Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible?, *Drug discovery today*, 13 (2008) 513-521.

- [28] D. Cross, J.K. Burmester, Gene therapy for cancer treatment: past, present and future, *Clinical medicine & research*, 4 (2006) 218-227.
- [29] S.D. Patil, D.G. Rhodes, D.J. Burgess, DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review, *The AAPS journal*, 7 (2005) E61-E77.
- [30] O. Frank, C. Rudolph, C. Heberlein, N. von Neuhoff, E. Schröck, A. Schambach, B. Schlegelberger, B. Fehse, W. Ostertag, C. Stocking, Tumor cells escape suicide gene therapy by genetic and epigenetic instability, *Blood*, 104 (2004) 3543-3549.
- [31] T. Satoh, A. Irie, S. Egawa, S. Baba, In situ gene therapy for prostate cancer, *Current gene therapy*, 5 (2005) 111-119.
- [32] E. Vattemi, P. Claudio, Gene therapy for lung cancer: practice and promise, *Annali italiani di chirurgia*, 75 (2004) 279-289.
- [33] J.F. Tseng, R.C. Mulligan, Gene therapy for pancreatic cancer, *Surgical oncology clinics of North America*, 11 (2002) 537-569.
- [34] P.B. Hackett, S.C. Ekker, D.A. Largaespada, R.S. McIvor, Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression, *Advances in genetics*, 54 (2005) 189-232.
- [35] J. Casaca-Carreira, Y. Temel, I. Larrakoetxea, A. Jahanshahi, Distribution and penetration of intracerebroventricularly administered 2' OMePS oligonucleotide in the mouse brain, *Nucleic acid therapeutics*, 27 (2017) 4-10.
- [36] R.W. Collin, A. Garanto, Applications of antisense oligonucleotides for the treatment of inherited retinal diseases, *Current opinion in ophthalmology*, 28 (2017) 260-266.
- [37] F. Delie, M. Berton, E. Allémann, R. Gurny, Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide into poly (D, L-lactic acid) particles, *International journal of pharmaceutics*, 214 (2001) 25-30.
- [38] R.K. DeLong, U. Akhtar, M. Sallee, B. Parker, S. Barber, J. Zhang, M. Craig, R. Garrad, A.J. Hickey, E. Engstrom, Characterization and performance of nucleic acid nanoparticles combined with protamine and gold, *Biomaterials*, 30 (2009) 6451-6459.
- [39] B. Gill, J. Singh, V. Sharma, S.H. Kumar, Emulsomes: An emerging vesicular drug delivery system, *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 6 (2014).

- [40] M.G. Ferreira, L. Tillman, G. Hardee, R. Bodmeier, Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers, *International Journal of pharmaceutics*, 239 (2002) 47-59.
- [41] M.M. Janas, Y. Jiang, M.K. Schlegel, S. Waldron, S. Kuchimanchi, S.A. Barros, Impact of oligonucleotide structure, chemistry, and delivery method on in vitro cytotoxicity, *nucleic acid therapeutics*, 27 (2017) 11-22.
- [42] P. Järver, Ü. Langel, Cell-penetrating peptides—a brief introduction, *Bba-Biomembranes*, 3 (2006) 260-263.
- [43] J.H. Jeong, S.H. Kim, S.W. Kim, T.G. Park, Intracellular delivery of poly (ethylene glycol) conjugated antisense oligonucleotide using cationic lipids by formation of self-assembled polyelectrolyte complex micelles, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 6 (2006) 2790-2795.
- [44] T. Lee, H. Awano, M. Yagi, M. Matsumoto, N. Watanabe, R. Goda, M. Koizumi, Y. Takeshima, M. Matsuo, 2'-O-Methyl RNA/ethylene-bridged nucleic acid chimera antisense oligonucleotides to induce dystrophin Exon 45 skipping, *Genes*, 8 (2017) 67.
- [45] K. Schmidt, T.P. Prakash, A.J. Donner, G.A. Kinberger, H.J. Gaus, A. Low, M.E. Østergaard, M. Bell, E.E. Swayze, P.P. Seth, Characterizing the effect of GalNAc and phosphorothioate backbone on binding of antisense oligonucleotides to the asialoglycoprotein receptor, *Nucleic acids research*, 45 (2017) 2294-2306.
- [46] A.J. Sprangers, L. Hao, R.J. Banga, C.A. Mirkin, Liposomal spherical nucleic acids for regulating long noncoding RNAs in the nucleus, *Small*, 13 (2017) 1602753.
- [47] Y. Yamada, M. Tabata, Y. Yasuzaki, M. Nomura, A. Shibata, Y. Ibayashi, Y. Taniguchi, S. Sasaki, H. Harashima, A nanocarrier system for the delivery of nucleic acids targeted to a pancreatic beta cell line, *Biomaterials*, 35 (2014) 6430-6438.
- [48] A. Zimmer, Antisense oligonucleotide delivery with polyhexylcyanoacrylate nanoparticles as carriers, *Methods*, 18 (1999) 286-295.
- [49] M. Innus, Antisense cancer therapy: Do antisense oligonucleotides hold promise as a cure for cancer, *Chem. Sci. J*, 8 (2017) e117.
- [50] R.F. Gesteland, T.R. Cech, J.F. Atkins, *The RNA World*, 3rd Edition ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2006.

- [51] G. Ozcan, B. Ozpolat, R.L. Coleman, A.K. Sood, G. Lopez-Berestein, Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics, *Advanced drug delivery reviews*, 87 (2015) 108-119.
- [52] J. Wang, Z. Lu, M.G. Wientjes, J.L.-S. Au, Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers, *The AAPS journal*, 12 (2010) 492-503.
- [53] E.P. Consortium, Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project, *Nature*, 447 (2007) 799.
- [54] P. Carninci, T. Kasukawa, S. Katayama, J. Gough, M. Frith, N. Maeda, R. Oyama, T. Ravasi, B. Lenhard, C. Wells, The transcriptional landscape of the mammalian genome, *Science*, 309 (2005) 1559-1563.
- [55] P. Carninci, A. Sandelin, B. Lenhard, S. Katayama, K. Shimokawa, J. Ponjavic, C.A. Semple, M.S. Taylor, P.G. Engström, M.C. Frith, Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution, *Nature genetics*, 38 (2006) 626.
- [56] J. Cheng, P. Kapranov, J. Drenkow, S. Dike, S. Brubaker, S. Patel, J. Long, D. Stern, H. Tammana, G. Helt, Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution, *Science*, 308 (2005) 1149-1154.
- [57] N. Cloonan, A.R. Forrest, G. Kolle, B.B. Gardiner, G.J. Faulkner, M.K. Brown, D.F. Taylor, A.L. Steptoe, S. Wani, G. Bethel, Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing, *Nature methods*, 5 (2008) 613.
- [58] L.J. Core, J.J. Waterfall, J.T. Lis, Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters, *Science*, 322 (2008) 1845-1848.
- [59] J.M. Johnson, S. Edwards, D. Shoemaker, E.E. Schadt, Dark matter in the genome: evidence of widespread transcription detected by microarray tiling experiments, *TRENDS in Genetics*, 21 (2005) 93-102.
- [60] P. Kapranov, J. Cheng, S. Dike, D.A. Nix, R. Duttagupta, A.T. Willingham, P.F. Stadler, J. Hertel, J. Hackermüller, I.L. Hofacker, RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription, *Science*, 316 (2007) 1484-1488.
- [61] A.C. Seila, J.M. Calabrese, S.S. Levine, G.W. Yeo, P.B. Rahl, R.A. Flynn, R.A. Young, P.A. Sharp, Divergent transcription from active promoters, *science*, 322 (2008) 1849-1851.

- [62] J.Z. Levin, M. Yassour, X. Adiconis, C. Nusbaum, D.A. Thompson, N. Friedman, A. Gnirke, A. Regev, Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods, *Nature methods*, 7 (2010) 709.
- [63] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *nature*, 391 (1998) 806.
- [64] D.-H. Kim, M.A. Behlke, S.D. Rose, M.-S. Chang, S. Choi, J.J. Rossi, Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy, *Nature biotechnology*, 23 (2005) 222.
- [65] C. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D.P. Bartel, P.D. Zamore, Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes, *Cell*, 123 (2005) 607-620.
- [66] A. Khvorova, A. Reynolds, S.D. Jayasena, Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias, *Cell*, 115 (2003) 209-216.
- [67] S.M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, *Genes & development*, 15 (2001) 188-200.
- [68] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *nature*, 411 (2001) 494.
- [69] N. Agrawal, P. Dasaradhi, A. Mohmmmed, P. Malhotra, R.K. Bhatnagar, S.K. Mukherjee, RNA interference: biology, mechanism, and applications, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67 (2003) 657-685.
- [70] M.A. Matzke, J.A. Birchler, RNAi-mediated pathways in the nucleus, *Nature reviews genetics*, 6 (2005) 24.
- [71] B. Mansoori, S.S. Shotorbani, B. Baradaran, RNA interference and its role in cancer therapy, *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4 (2014) 313.
- [72] A. de Fougères, H.-P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman, Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics, *Nature reviews Drug discovery*, 6 (2007) 443.
- [73] V. Ambros, microRNAs: tiny regulators with great potential, *Cell*, 107 (2001) 823-826.
- [74] M. Georges, W. Coppieters, C. Charlier, Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease, *Current opinion in genetics & development*, 17 (2007) 166-176.

- [75] K. Jeyaseelan, W.B. Herath, A. Armugam, MicroRNAs as therapeutic targets in human diseases, *Expert opinion on therapeutic targets*, 11 (2007) 1119-1129.
- [76] E. Gottwein, N. Mukherjee, C. Sachse, C. Frenzel, W.H. Majoros, J.-T.A. Chi, R. Braich, M. Manoharan, J. Soutschek, U. Ohler, A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155, *Nature*, 450 (2007) 1096.
- [77] C.C. Esau, B.P. Monia, Therapeutic potential for microRNAs, *Advanced drug delivery reviews*, 59 (2007) 101-114.
- [78] M.S. Draz, B.A. Fang, P. Zhang, Z. Hu, S. Gu, K.C. Weng, J.W. Gray, F.F. Chen, Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections, *Theranostics*, 4 (2014) 872.
- [79] P. Zhang, K. An, X. Duan, H. Xu, F. Li, F. Xu, Recent advances in siRNA delivery for cancer therapy using smart nanocarriers, *Drug discovery today*, 23 (2018) 900-911.
- [80] C. Chakraborty, A.R. Sharma, G. Sharma, C.G.P. Doss, S.-S. Lee, Therapeutic miRNA and siRNA: moving from bench to clinic as next generation medicine, *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 8 (2017) 132-143.
- [81] S. Anthiya, A. Griveau, C. Loussouarn, P. Baril, M. Garnett, J.-P. Issartel, E. Garcion, MicroRNA-based drugs for brain tumors, *Trends in cancer*, 4 (2018) 222-238.
- [82] J. Chery, RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications, *Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs*, 4 (2016) 35.
- [83] A. Wittrup, J. Lieberman, Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics, *Nature Reviews Genetics*, 16 (2015) 543.
- [84] R.M. Kannan, Toward new design principles for superior gene silencing, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115 (2018) 3200-3201.
- [85] S. Arpicco, P. Milla, B. Stella, F. Dosio, Hyaluronic acid conjugates as vectors for the active targeting of drugs, genes and nanocomposites in cancer treatment, *Molecules*, 19 (2014) 3193-3230.
- [86] T.A. Brown, *Genetics: A molecular approach*, 6th edition ed., University of Tehran Press(press.ut.ac.ir), Tehran, 2013.
- [87] A.Z. Fire, Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture), *Angewandte Chemie International Edition*, 46 (2007) 6966-6984.

- [88] R.S. Bora, D. Gupta, T.K.S. Mukkur, K.S. Saini, RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities, *Molecular medicine reports*, 6 (2012) 9-15.
- [89] D.P. Cioca, Y. Aoki, K. Kiyosawa, RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines, *Cancer gene therapy*, 10 (2003) 125.
- [90] C. Nieth, A. Pribsch, A. Stege, H. Lage, Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi), *FEBS letters*, 545 (2003) 144-150.
- [91] J. Zhao, S.-S. Feng, Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents, *Nanomedicine*, 10 (2015) 2199-2228.
- [92] K. Wang, X. Zhang, Y. Liu, C. Liu, B. Jiang, Y. Jiang, Tumor penetrability and anti-angiogenesis using iRGD-mediated delivery of doxorubicin-polymer conjugates, *Biomaterials*, 35 (2014) 8735-8747.
- [93] M. Ebrahimian, S. Taghavi, A. Mokhtarzadeh, M. Ramezani, M. Hashemi, Co-delivery of doxorubicin encapsulated PLGA nanoparticles and Bcl-xL shRNA using alkyl-modified PEI into breast cancer cells, *Applied biochemistry and biotechnology*, 183 (2017) 126-136.
- [94] A. Scomparin, G. Tiram, R. Satchi-Fainaro, DNA and RNA nanotechnologies in medicine. Diagnosis and treatment of diseases, Springer 2013.
- [95] H. Hatakeyama, H. Akita, E. Ito, Y. Hayashi, M. Oishi, Y. Nagasaki, R. Danev, K. Nagayama, N. Kaji, H. Kikuchi, Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid, *Biomaterials*, 32 (2011) 4306-4316.
- [96] A. Schroeder, C.G. Levins, C. Cortez, R. Langer, D.G. Anderson, Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery, *Journal of internal medicine*, 267 (2010) 9-21.
- [97] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *Journal of controlled release*, 114 (2006) 100-109.
- [98] A. Babu, R. Muralidharan, N. Amreddy, M. Mehta, A. Munshi, R. Ramesh, Nanoparticles for siRNA-Based Gene Silencing in Tumor Therapy, *IEEE transactions on nanobioscience*, 15 (2016) 849-863.

- [99] J. Li, S. Xue, Z.-W. Mao, Nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics, *Journal of Materials Chemistry B*, 4 (2016) 6620-6639.
- [100] M. Demirel, Y. Yazan, Kah Lipit Nanopartiküller (SLN) *FABAD J. Pharm. Sci.*, 25 (2000) 167-179.
- [101] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages, *Research in pharmaceutical sciences*, 13 (2018) 288-303.
- [102] S.V. Kurkov, T. Loftsson, Cyclodextrins, *International journal of pharmaceutics*, 453 (2013) 167-180.
- [103] P. Jansook, S.V. Kurkov, T. Loftsson, Cyclodextrins as solubilizers: formation of complex aggregates, *Journal of pharmaceutical sciences*, 99 (2010) 719-729.
- [104] G. Tiwari, R. Tiwari, A.K. Rai, Cyclodextrins in delivery systems: Applications, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2 (2010) 72.
- [105] D. Cun, D.K. Jensen, M.J. Maltesen, M. Bunker, P. Whiteside, D. Scurr, C. Foged, H.M. Nielsen, High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 77 (2011) 26-35.
- [106] D. Sezlev Bilecen, J.C. Rodriguez-Cabello, H. Uludag, V. Hasirci, Construction of a PLGA based, targeted siRNA delivery system for treatment of osteoporosis, *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 28 (2017) 1859-1873.
- [107] F. Chai, L. Sun, X. He, J. Li, Y. Liu, F. Xiong, L. Ge, T.J. Webster, C. Zheng, Doxorubicin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications, *Int J Nanomedicine*, 12 (2017) 1791-1802.
- [108] S. Biswas, V.P. Torchilin, Dendrimers for siRNA Delivery, *Pharmaceutics (Basel, Switzerland)*, 6 (2013) 161-183.
- [109] J. Wu, W. Huang, Z. He, Dendrimers as carriers for siRNA delivery and gene silencing: a review, *TheScientificWorldJournal*, 2013 (2013) 630654.

- [110] R. Duncan, L. Izzo, Dendrimer biocompatibility and toxicity, *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (2005) 2215-2237.
- [111] A.M. Derfus, A.A. Chen, D.H. Min, E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, Targeted quantum dot conjugates for siRNA delivery, *Bioconjug Chem*, 18 (2007) 1391-1396.
- [112] A.P. Alivisatos, Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots, *Science*, 271 (1996) 933.
- [113] R. Hardman, A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors, *Environmental health perspectives*, 114 (2006) 165-172.
- [114] A.M. Schrand, M.F. Rahman, S.M. Hussain, J.J. Schlager, D.A. Smith, A.F. Syed, Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 2 (2010) 544-568.
- [115] E. Boisselier, D. Astruc, Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity, *Chem Soc Rev*, 38 (2009) 1759-1782.
- [116] N. Khlebtsov, L. Dykman, Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies, *Chem Soc Rev*, 40 (2011) 1647-1671.
- [117] J.W. Park, K.H. Bae, C. Kim, T.G. Park, Clustered magnetite nanocrystals cross-linked with PEI for efficient siRNA delivery, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 457-465.
- [118] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (1995) 7297-7301.
- [119] J.W. Park, H. Mok, T.G. Park, Epidermal growth factor (EGF) receptor targeted delivery of PEGylated adenovirus, *Biochemical and biophysical research communications*, 366 (2008) 769-774.
- [120] H. Mok, T.G. Park, Self-crosslinked and reducible fusogenic peptides for intracellular delivery of siRNA, *Biopolymers*, 89 (2008) 881-888.
- [121] T. Xia, M. Kovichich, M. Liong, H. Meng, S. Kabehie, S. George, J.I. Zink, A.E. Nel, Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous

silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs, *ACS Nano*, 3 (2009) 3273-3286.

[122] H. Meng, M. Xue, T. Xia, Z. Ji, D.Y. Tarn, J.I. Zink, A.E. Nel, Use of size and a copolymer design feature to improve the biodistribution and the enhanced permeability and retention effect of doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles in a murine xenograft tumor model, *ACS Nano*, 5 (2011) 4131-4144.

[123] V. Cauda, A. Schlossbauer, T. Bein, Bio-degradation study of colloidal mesoporous silica nanoparticles: Effect of surface functionalization with organo-silanes and poly(ethylene glycol), *Microporous and Mesoporous Materials*, 132 (2010) 60-71.

[124] H. Zhang, D.R. Dunphy, X. Jiang, H. Meng, B. Sun, D. Tarn, M. Xue, X. Wang, S. Lin, Z. Ji, R. Li, F.L. Garcia, J. Yang, M.L. Kirk, T. Xia, J.I. Zink, A. Nel, C.J. Brinker, Processing pathway dependence of amorphous silica nanoparticle toxicity: colloidal vs pyrolytic, *Journal of the American Chemical Society*, 134 (2012) 15790-15804.

[125] J.M. Rosenholm, V. Mamaeva, C. Sahlgren, M. Linden, Nanoparticles in targeted cancer therapy: mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage, *Nanomedicine (London, England)*, 7 (2012) 111-120.

[126] K.-m. Choi, S.-H. Choi, H. Jeon, I.-S. Kim, H.J. Ahn, Chimeric Capsid Protein as a Nanocarrier for siRNA Delivery: Stability and Cellular Uptake of Encapsulated siRNA, *ACS Nano*, 5 (2011) 8690-8699.

[127] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 50 (2000) 27-46.

[128] N.A. Peppas, J.Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology, *Advanced Materials*, 18 (2006) 1345-1360.

[129] S. Ramakrishnan, Hydrogel-siRNA for cancer therapy, *Cancer biology & therapy*, 11 (2011) 849-851.

[130] S.M. Dizaj, S. Jafari, A.Y. Khosroushahi, A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors, *Nanoscale research letters*, 9 (2014) 252.

- [131] A. Nagal, R.K. Singlab, Nanoparticles in different delivery systems: a brief review, *organ*, 1 (2013) 4.
- [132] D.C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D.B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos, Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors, *Pharmacological reviews*, 51 (1999) 691-744.
- [133] H. Ragelle, G. Vandermeulen, V. Préat, Chitosan-based siRNA delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 172 (2013) 207-218.
- [134] D. Haussecker, The business of RNAi therapeutics, *Human gene therapy*, 19 (2008) 451-462.
- [135] O.M. Merkel, D. Librizzi, A. Pfestroff, T. Schurra, K. Buyens, N.N. Sanders, S.S. De, M. Béhé, T. Kissel, Stability of siRNA polyplexes from poly (ethylenimine) and poly (ethylenimine)-g-poly (ethylene glycol) under in vivo conditions: effects on pharmacokinetics and biodistribution measured by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging, *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 138 (2009) 148-159.
- [136] E. Şalva, siRNA için uygun taşıyıcı sistem geliştirilmesi; İn Vitro ve İn Vivo Çalışmalar, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Marmara Üniversitesi, İstanbul 2009, pp. 284.
- [137] T. R. Nayak, L. K. Krasteva, W. Cai, Multimodality imaging of RNA interference, *Current medicinal chemistry*, 20 (2013) 3664-3675.
- [138] S.H. Kim, J.H. Jeong, S.H. Lee, S.W. Kim, T.G. Park, LHRH receptor-mediated delivery of siRNA using polyelectrolyte complex micelles self-assembled from siRNA-PEG-LHRH conjugate and PEI, *Bioconjugate chemistry*, 19 (2008) 2156-2162.
- [139] K. Park, M.-Y. Lee, K.S. Kim, S.K. Hahn, Target specific tumor treatment by VEGF siRNA complexed with reducible polyethyleneimine–hyaluronic acid conjugate, *Biomaterials*, 31 (2010) 5258-5265.
- [140] J.J. Lu, R. Langer, J. Chen, A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery, *Molecular pharmaceutics*, 6 (2009) 763-771.
- [141] J. Torrecilla, A. del Pozo-Rodríguez, M. yngeles Solinís, P.S. Apaolaza, B. Berzal-Herranz, C. Romero-López, A. Berzal-Herranz, A. Rodríguez-Gascón, Silencing of hepatitis C virus replication by a non-viral vector based on solid lipid

nanoparticles containing a shRNA targeted to the internal ribosome entry site (IRES), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 146 (2016) 808-817.

[142] P. Szabo, R. Zelko, Formulation and stability aspects of Nanosized solid drug delivery systems, *Current pharmaceutical design*, 21 (2015) 3148-3157.

[143] J. Pang, Y. Luan, X. Yang, Y. Jiang, L. Zhao, Y. Zong, Z. Li, Functionalized mesoporous silica particles for application in drug delivery system, *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12 (2012) 775-788.

[144] S.-H. Wu, C.-Y. Mou, H.-P. Lin, Synthesis of mesoporous silica nanoparticles, *Chemical Society Reviews*, 42 (2013) 3862-3875.

[145] C. Jing, H. Zhang, Inhibition of VEGF expression and SMMC 7721 cell growth by VEGFsiRNA, *Chinese Journal of Pathophysiology*, (1986).

[146] J. Conde, A. Ambrosone, V. Sanz, Y. Hernandez, V. Marchesano, F. Tian, H. Child, C.C. Berry, M.R. Ibarra, P.V. Baptista, Design of multifunctional gold nanoparticles for in vitro and in vivo gene silencing, *Acs Nano*, 6 (2012) 8316-8324.

[147] X. Qian, X.-H. Peng, D.O. Ansari, Q. Yin-Goen, G.Z. Chen, D.M. Shin, L. Yang, A.N. Young, M.D. Wang, S. Nie, In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags, *Nature biotechnology*, 26 (2008) 83.

[148] C.H.J. Choi, C.A. Alabi, P. Webster, M.E. Davis, Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (2010) 1235-1240.

[149] D. Kim, Y.Y. Jeong, S. Jon, A drug-loaded aptamer- gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer, *ACS nano*, 4 (2010) 3689-3696.

[150] S.C. Jang, O.Y. Kim, C.M. Yoon, D.-S. Choi, T.-Y. Roh, J. Park, J. Nilsson, J. Lötvall, Y.-K. Kim, Y.S. Gho, Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors, *ACS nano*, 7 (2013) 7698-7710.

[151] T.R. Lunavat, L. Cheng, D.-K. Kim, J. Bhadury, S.C. Jang, C. Lässer, R.A. Sharples, M.D. López, J. Nilsson, Y.S. Gho, Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells—Evidence of unique microRNA cargos, *RNA biology*, 12 (2015) 810-823.

- [152] R. Kole, A.R. Krainer, S. Altman, RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides, *Nature reviews Drug discovery*, 11 (2012) 125.
- [153] T.R. Lunavat, S.C. Jang, L. Nilsson, H.T. Park, G. Repiska, C. Lässer, J.A. Nilsson, Y.S. Gho, J. Lötvall, RNAi delivery by exosome-mimetic nanovesicles—implications for targeting c-Myc in cancer, *Biomaterials*, 102 (2016) 231-238.
- [154] Y. Le, Y. Zhou, P. Iribarren, J. Wang, Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease, *Cell Mol Immunol*, 1 (2004) 95-104.
- [155] F.R. Balkwill, The chemokine system and cancer, *The Journal of pathology*, 226 (2012) 148-157.
- [156] R.K. Ganju, S.A. Brubaker, J. Meyer, P. Dutt, Y. Yang, S. Qin, W. Newman, J.E. Groopman, The α -chemokine, stromal cell-derived factor-1 α , binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (1998) 23169-23175.
- [157] Z. Goldsmith, D. Dhanasekaran, G protein regulation of MAPK networks, *Oncogene*, 26 (2007) 3122.
- [158] L.J. Bendall, R. Baraz, J. Juarez, W. Shen, K.F. Bradstock, Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1 α in acute lymphoblastic leukemia, *Cancer research*, 65 (2005) 3290-3298.
- [159] J.-F. Wang, I.-W. Park, J.E. Groopman, Stromal cell-derived factor-1 α stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C, *Blood*, 95 (2000) 2505-2513.
- [160] S.R. Vlahakis, A. Villasis-Keever, T. Gomez, M. Vanegas, N. Vlahakis, C.V. Paya, G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways, *The Journal of Immunology*, 169 (2002) 5546-5554.
- [161] M. Mellado, A. Vila-Coro, C. Martinez, J. Rodriguez-Frade, Receptor dimerization: a key step in chemokine signaling, *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 47 (2001) 575-582.

- [162] U.M. Domanska, R.C. Kruizinga, W.B. Nagengast, H. Timmer-Bosscha, G. Huls, E.G. de Vries, A.M. Walenkamp, A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide, *European journal of cancer*, 49 (2013) 219-230.
- [163] T. Ishikawa, K.-I. Nakashiro, S.K. Klosek, H. Goda, S. Hara, D. Uchida, H. Hamakawa, Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma, *Oncology reports*, 21 (2009) 707-712.
- [164] R.J. Phillips, J. Mestas, M. Gharaee-Kermani, M.D. Burdick, A. Sica, J.A. Belperio, M.P. Keane, R.M. Strieter, Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and activation of hypoxia inducible factor-1 α , *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 22473-22481.
- [165] J.D. Kubic, J.W. Lui, E.C. Little, A.E. Ludvik, S. Konda, R. Salgia, A.E. Aplin, D. Lang, PAX3 and FOXD3 promote CXCR4 expression in melanoma, *Journal of Biological Chemistry*, 290 (2015) 21901-21914.
- [166] O. Salvucci, A. Bouchard, A. Baccarelli, J. Deschenes, G. Sauter, R. Simon, R. Bianchi, M. Basik, The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study, *Breast cancer research and treatment*, 97 (2006) 275-283.
- [167] F. Andre, W. Xia, R. Conforti, Y. Wei, T. Boulet, G. Tomasic, M. Spielmann, M. Zoubir, N. Berrada, R. Arriagada, CXCR4 expression in early breast cancer and risk of distant recurrence, *The oncologist*, 14 (2009) 1182-1188.
- [168] M. Kato, J. Kitayama, S. Kazama, H. Nagawa, Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma, *Breast Cancer Research*, 5 (2003) R144.
- [169] Q.D. Chu, N.T. Holm, P. Madumere, L.W. Johnson, F. Abreo, B.D. Li, Chemokine receptor CXCR4 overexpression predicts recurrence for hormone receptor-positive, node-negative breast cancer patients, *Surgery*, 149 (2011) 193-199.
- [170] L. Chang, M. Karin, Mammalian MAP kinase signalling cascades, *Nature*, 410 (2001) 37.
- [171] T.N. Hartmann, J.A. Burger, A. Glodek, N. Fujii, M. Burger, CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and

chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells, *Oncogene*, 24 (2005) 4462.

[172] A.Z. Fernandis, A. Prasad, H. Band, R. Klösel, R.K. Ganju, Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells, *Oncogene*, 23 (2004) 157.

[173] K.E. Luker, G.D. Luker, Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer, *Cancer letters*, 238 (2006) 30-41.

[174] X. Sun, G. Cheng, M. Hao, J. Zheng, X. Zhou, J. Zhang, R.S. Taichman, K.J. Pienta, J. Wang, CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis and cancer progression, *Cancer and Metastasis Reviews*, 29 (2010) 709-722.

[175] K. Cui, W. Zhao, C. Wang, A. Wang, B. Zhang, W. Zhou, J. Yu, Z. Sun, S. Li, The CXCR4-CXCL12 pathway facilitates the progression of pancreatic cancer via induction of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Journal of Surgical Research*, 171 (2011) 143-150.

[176] X. Li, Q. Ma, Q. Xu, H. Liu, J. Lei, W. Duan, K. Bhat, F. Wang, E. Wu, Z. Wang, SDF-1/CXCR4 signaling induces pancreatic cancer cell invasion and epithelial–mesenchymal transition in vitro through non-canonical activation of Hedgehog pathway, *Cancer letters*, 322 (2012) 169-176.

[177] F. Marchesi, P. Monti, B.E. Leone, A. Zerbi, A. Vecchi, L. Piemonti, A. Mantovani, P. Allavena, Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4, *Cancer research*, 64 (2004) 8420-8427.

[178] Y. Matsuo, N. Ochi, H. Sawai, A. Yasuda, H. Takahashi, H. Funahashi, H. Takeyama, Z. Tong, S. Guha, CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer, *International journal of cancer*, 124 (2009) 853-861.

[179] A.P. Singh, S. Arora, A. Bhardwaj, S.K. Srivastava, M.P. Kadakia, B. Wang, W.E. Grizzle, L.B. Owen, S. Singh, CXCL12/CXCR4 Protein Signaling Axis Induces Sonic Hedgehog Expression in Pancreatic Cancer Cells via Extracellular Regulated Kinase-and Akt Kinase-mediated Activation of Nuclear Factor κ B IMPLICATIONS FOR BIDIRECTIONAL TUMOR-STROMAL INTERACTIONS, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (2012) 39115-39124.

[180] R. Marechal, P. Demetter, N. Nagy, A. Berton, C. Decaestecker, M. Polus, J. Closset, J. Devière, I. Salmon, J.-L. Van Laethem, High expression of CXCR4

may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma, *British journal of cancer*, 100 (2009) 1444.

[181] T. Welsch, S. Keleg, F. Bergmann, L. Degrate, S. Bauer, J. Schmidt, Comparative analysis of tumorbiology and CD133 positivity in primary and recurrent pancreatic ductal adenocarcinoma, *Clinical & experimental metastasis*, 26 (2009) 701.

[182] P. Guo, J.-O. You, J. Yang, D. Jia, M.A. Moses, D.T. Auguste, Inhibiting metastatic breast cancer cell migration via the synergy of targeted, pH-triggered siRNA delivery and chemokine axis blockade, *Molecular pharmaceutics*, 11 (2014) 755-765.

[183] A. Egorova, A. Kiselev, M. Hakli, M. Ruponen, V. Baranov, A. Urtti, Chemokine-derived peptides as carriers for gene delivery to CXCR4 expressing cells, *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 11 (2009) 772-781.

[184] Y. Wang, Development of CXCR4-Inhibiting Nanoparticles for the Treatment of Metastatic Cancer, *Pharmaceutical Sciences University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska* 2016, pp. 229.

[185] U. Unzueta, M.V. Céspedes, N. Ferrer-Miralles, I. Casanova, J. Cedano, J.L. Corchero, J. Domingo-Espín, A. Villaverde, R. Mangues, E. Vázquez, Intracellular CXCR4⁺ cell targeting with T22-empowered protein-only nanoparticles, *International journal of nanomedicine*, 7 (2012) 4533-4544.

[186] C. Chittasupho, K. Lirdprapamongkol, P. Kewsuwan, N. Sarisuta, Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 88 (2014) 529-538.

[187] R.T. Wang, X.Y. Zhi, S.Y. Yao, Y. Zhang, LFC131 peptide-conjugated polymeric nanoparticles for the effective delivery of docetaxel in CXCR4 overexpressed lung cancer cells, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 133 (2015) 43-50.

[188] E.L. Snyder, C.C. Saenz, C. Denicourt, B.R. Meade, X.-S. Cui, I.M. Kaplan, S.F. Dowdy, Enhanced Targeting and Killing of Tumor Cells Expressing the CXCR4 Chemokine Receptor 4 by Transducible Anticancer Peptides, *Cancer Research*, 65 (2005) 10646.

- [189] C. de la Torre, I. Casanova, G. Acosta, C. Coll, M.J. Moreno, F. Albericio, E. Aznar, R. Mangués, M. Royo, F. Sancenón, R. Martínez-Máñez, Gated Mesoporous Silica Nanoparticles Using a Double-Role Circular Peptide for the Controlled and Target-Preferential Release of Doxorubicin in CXCR4-Expressing Lymphoma Cells, *Advanced Functional Materials*, 25 (2015) 687-695.
- [190] A. Egorova, M. Bogacheva, A. Shubina, V. Baranov, A. Kiselev, Development of a receptor-targeted gene delivery system using CXCR4 ligand-conjugated cross-linking peptides, *The journal of gene medicine*, 16 (2014) 336-351.
- [191] W.H. Driessen, N. Fujii, H. Tamamura, S.M. Sullivan, Development of peptide-targeted lipoplexes to CXCR4-expressing rat glioma cells and rat proliferating endothelial cells, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16 (2008) 516-524.
- [192] H. Hanaoka, T. Mukai, H. Tamamura, T. Mori, S. Ishino, K. Ogawa, Y. Iida, R. Doi, N. Fujii, H. Saji, Development of a ¹¹¹In-labeled peptide derivative targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors, *Nuclear medicine and biology*, 33 (2006) 489-494.
- [193] J. Kuil, T. Buckle, J. Oldenburg, H. Yuan, A.D. Borowsky, L. Josephson, F.W.B. van Leeuwen, Hybrid Peptide Dendrimers for Imaging of Chemokine Receptor 4 (CXCR4) Expression, *Molecular Pharmaceutics*, 8 (2011) 2444-2453.
- [194] J. Kuil, T. Buckle, H. Yuan, N.S. van den Berg, S. Oishi, N. Fujii, L. Josephson, F.W. van Leeuwen, Synthesis and evaluation of a bimodal CXCR4 antagonistic peptide, *Bioconjug Chem*, 22 (2011) 859-864.
- [195] S.G. Tarasov, V. Gaponenko, O.M. Howard, Y. Chen, J.J. Oppenheim, M.A. Dyba, S. Subramaniam, Y. Lee, C. Michejda, N.I. Tarasova, Structural plasticity of a transmembrane peptide allows self-assembly into biologically active nanoparticles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 9798-9803.
- [196] P. Guo, J.-O. You, J. Yang, M.A. Moses, D.T. Auguste, Using breast cancer cell CXCR4 surface expression to predict liposome binding and cytotoxicity, *Biomaterials*, 33 (2012) 8104-8110.
- [197] S. Nimmagadda, M. Pullambhatla, M.G. Pomper, Immunoimaging of CXCR4 expression in brain tumor xenografts using SPECT/CT, *Journal of*

nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine, 50 (2009) 1124-1130.

[198] B. Le Bon, N.V. Craynest, J.-M. Daoudi, C.D. Giorgio, A.J. Domb, P. Vierling, AMD3100 Conjugates as Components of Targeted Nonviral Gene Delivery Systems: Synthesis and in Vitro Transfection Efficiency of CXCR4-Expressing Cells, *Bioconjugate Chemistry*, 15 (2004) 413-423.

[199] A.C. Misra, K.E. Luker, H. Durmaz, G.D. Luker, J. Lahann, CXCR4-Targeted Nanocarriers for Triple Negative Breast Cancers, *Biomacromolecules*, 16 (2015) 2412-2417.

[200] D.-Y. Gao, T.-T. Lin, Y.-C. Sung, Y.C. Liu, W.-H. Chiang, C.-C. Chang, J.-Y. Liu, Y. Chen, CXCR4-targeted lipid-coated PLGA nanoparticles deliver sorafenib and overcome acquired drug resistance in liver cancer, *Biomaterials*, 67 (2015) 194-203.

[201] J. Li, Y. Zhu, S.T. Hazeldine, C. Li, D. Oupický, Dual-function CXCR4 antagonist polyplexes to deliver gene therapy and inhibit cancer cell invasion, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 51 (2012) 8740-8743.

[202] J. Li, D. Oupický, Effect of biodegradability on CXCR4 antagonism, transfection efficacy and antimetastatic activity of polymeric Plerixafor, *Biomaterials*, 35 (2014) 5572-5579.

[203] Y. Wang, J. Li, D. Oupický, Polymeric Plerixafor: effect of PEGylation on CXCR4 antagonism, cancer cell invasion, and DNA transfection, *Pharmaceutical research*, 31 (2014) 3538-3548.

[204] Y. Wang, J. Li, Y. Chen, D. Oupický, Balancing polymer hydrophobicity for ligand presentation and siRNA delivery in dual function CXCR4 inhibiting polyplexes, *Biomaterials Science*, 3 (2015) 1114-1123.

[205] Y. Wang, S.T. Hazeldine, J. Li, D. Oupický, Development of functional poly(amido amine) CXCR4 antagonists with the ability to mobilize leukocytes and deliver nucleic acids, *Advanced healthcare materials*, 4 (2015) 729-738.

[206] J. Li, A.-M. Lepadatu, Y. Zhu, M. Ciobanu, Y. Wang, S.C. Asaftei, D. Oupický, Examination of structure-activity relationship of viologen-based dendrimers as CXCR4 antagonists and gene carriers, *Bioconjugate chemistry*, 25 (2014) 907-917.

[207] S. Nimmagadda, M. Pullambhatla, K. Stone, G. Green, Z.M. Bhujwalla, M.G. Pomper, Molecular imaging of CXCR4 receptor expression in human

cancer xenografts with [64Cu]AMD3100 positron emission tomography, *Cancer Res*, 70 (2010) 3935-3944.

[208] R.A. De Silva, K. Peyre, M. Pullambhatla, J.J. Fox, M.G. Pomper, S. Nimmagadda, Imaging CXCR4 expression in human cancer xenografts: evaluation of monocyclam 64Cu-AMD3465, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 52 (2011) 986-993.

[209] Z.-H. Peng, Y. Xie, Y. Wang, J. Li, D. Oupický, Dual-Function Polymeric HPMA Prodrugs for the Delivery of miRNA, *Molecular Pharmaceutics*, 14 (2017) 1395-1404.

[210] Y. Xie, F. Yu, W. Tang, B.O. Alade, Z.-H. Peng, Y. Wang, J. Li, D. Oupický, Synthesis and Evaluation of Chloroquine-Containing DMAEMA Copolymers as Efficient Anti-miRNA Delivery Vectors with Improved Endosomal Escape and Antimigratory Activity in Cancer Cells, *Macromolecular Bioscience*, 18 (2018) 1700194.

[211] Y. Zhou, F. Yu, F. Zhang, G. Chen, K. Wang, M. Sun, J. Li, D. Oupický, Cyclam-Modified PEI for Combined VEGF siRNA Silencing and CXCR4 Inhibition To Treat Metastatic Breast Cancer, *Biomacromolecules*, 19 (2018) 392-401.

[212] F. Abedini, H. Hosseinkhani, M. Ismail, A.J. Domb, A.R. Omar, P.P. Chong, P.-D. Hong, D.-S. Yu, I.-Y. Farber, Cationized dextran nanoparticle-encapsulated CXCR4-siRNA enhanced correlation between CXCR4 expression and serum alkaline phosphatase in a mouse model of colorectal cancer, *International journal of nanomedicine*, 7 (2012) 4159.

[213] F. Abedini, M. Ismail, H. Hosseinkhani, T.A.T. Ibrahim, A.R. Omar, P.P. Chong, M.H. Bejo, A.J. Domb, Effects of CXCR4 siRNA/dextran-spermine nanoparticles on CXCR4 expression and serum LDH levels in a mouse model of colorectal cancer metastasis to the liver, *Cancer management and research*, 3 (2011) 301.

[214] P. Vaupel, D.K. Kelleher, M. Höckel, Oxygenation status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy, *Seminars in oncology*, Elsevier, 2001, pp. 29-35.

[215] A.L. Harris, Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth, *Nature Reviews Cancer*, 2 (2002) 38.

- [216] B. Romain, M. Hachet-Haas, S. Rohr, C. Brigand, J.-L. Galzi, M.-P. Gaub, E. Pencreach, D. Guenot, Hypoxia differentially regulated CXCR4 and CXCR7 signaling in colon cancer, *Molecular cancer*, 13 (2014) 58.
- [217] T. Wang, Y. Mi, L. Pian, P. Gao, H. Xu, Y. Zheng, X. Xuan, RNAi targeting CXCR4 inhibits proliferation and invasion of esophageal carcinoma cells, *Diagnostic pathology*, 8 (2013) 104-104.
- [218] N. Nasr, S. Maddocks, S.G. Turville, A.N. Harman, N. Woolger, K.J. Helbig, J. Wilkinson, C.R. Bye, T.K. Wright, D. Rambukwelle, H. Donaghy, M.R. Beard, A.L. Cunningham, HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production, *Blood*, 120 (2012) 778-788.
- [219] X. Mu, H. Lu, L. Fan, S. Yan, K. Hu, Efficient Delivery of Therapeutic siRNA with Nanoparticles Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells, *Journal of Nanomaterials*, 2018 (2018) 10.
- [220] M. Deng, D.D. Jing, X.J. Meng, Effect of MUC1 siRNA on drug resistance of gastric cancer cells to trastuzumab, *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 14 (2013) 127-131.
- [221] S.K. Tripathi, S. Gupta, K.C. Gupta, P. Kumar, Efficient DNA and siRNA delivery with biodegradable cationic hyaluronic acid conjugates, *RSC Advances*, 3 (2013) 15687-15697.
- [222] G. Jiang, K. Park, J. Kim, K.S. Kim, E.J. Oh, H. Kang, S.E. Han, Y.K. Oh, T.G. Park, S. Kwang Hahn, Hyaluronic acid–polyethyleneimine conjugate for target specific intracellular delivery of siRNA, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 89 (2008) 635-642.
- [223] D.W. Dong, S.W. Tong, X.R. Qi, Comparative studies of polyethylenimine–doxorubicin conjugates with pH-sensitive and pH-insensitive linkers, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101 (2013) 1336-1344.
- [224] C. Chen, B. Zhou, X. Zhu, M. Shen, X. Shi, Branched polyethyleneimine modified with hyaluronic acid via a PEG spacer for targeted anticancer drug delivery, *RSC Advances*, 6 (2016) 9232-9239.
- [225] K. Park, S.W. Hong, W. Hur, M.-Y. Lee, J.-A. Yang, S.W. Kim, S.K. Yoon, S.K. Hahn, Target specific systemic delivery of TGF- β siRNA/(PEI-SS)-g-HA complex for the treatment of liver cirrhosis, *Biomaterials*, 32 (2011) 4951-4958.

- [226] J. Shen, H.C. Kim, C. Mu, E. Gentile, J. Mai, J. Wolfram, L.n. Ji, M. Ferrari, Z.w. Mao, H. Shen, Multifunctional gold nanorods for siRNA gene silencing and photothermal therapy, *Advanced healthcare materials*, 3 (2014) 1629-1637.
- [227] E.S. Glazer, C. Zhu, K.L. Massey, C.S. Thompson, W.D. Kaluarachchi, A.N. Hamir, S.A. Curley, Noninvasive radiofrequency field destruction of pancreatic adenocarcinoma xenografts treated with targeted gold nanoparticles, *Clinical Cancer Research*, 16 (2010) 5712-5721.
- [228] G. Terzioğlu, A. Keskin, G. Demirel, Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması, *Türk J Immunol*, 1 (2013) 74-89.
- [229] E. Urcan, U. Haertel, M. Styllou, R. Hickel, H. Scherthan, F.X. Reichl, Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts, *Dental materials*, 26 (2010) 51-58.
- [230] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25 (2001) 402-408.
- [231] Y.-F. Wu, H.-C. Wu, C.-H. Kuan, C.-J. Lin, L.-W. Wang, C.-W. Chang, T.-W. Wang, Multi-functionalized carbon dots as theranostic nanoagent for gene delivery in lung cancer therapy, *Scientific reports*, 6 (2016) 21170.
- [232] N. Vrana, O. Erdemli, G. Francius, A. Fahs, M. Rabineau, C. Debry, A. Tezcaner, D. Keskin, P. Lavalle, Double entrapment of growth factors by nanoparticles loaded into polyelectrolyte multilayer films, *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (2014) 999-1008.
- [233] Ö. Erdemli, D. Keskin, A. Tezcaner, Influence of excipients on characteristics and release profiles of poly (ϵ -caprolactone) microspheres containing immunoglobulin G, *Materials Science and Engineering: C*, 48 (2015) 391-399.
- [234] R. Kotcherlakota, D.J. Srinivasan, S. Mukherjee, M.M. Haroon, G.H. Dar, U. Venkatraman, C.R. Patra, V. Gopal, Engineered fusion protein-loaded gold nanocarriers for targeted co-delivery of doxorubicin and erbB2-siRNA in human epidermal growth factor receptor-2+ ovarian cancer, *Journal of Materials Chemistry B*, 5 (2017) 7082-7098.

- [235] B. Manocha, A. Margaritis, Controlled release of doxorubicin from doxorubicin/ γ -polyglutamic acid ionic complex, *Journal of Nanomaterials*, 2010 (2010) 12.
- [236] J.A. Alkrad, Y. Mrestani, D. Stroehl, S. Wartewig, R. Neubert, Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 31 (2003) 545-550.
- [237] A.-M. Vasi, M.I. Popa, M. Butnaru, G. Dodi, L. Verestiuc, Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 38 (2014) 177-185.
- [238] G. Tang, H. Guo, F. Alexis, X. Wang, S. Zeng, T. Lim, J. Ding, Y. Yang, S. Wang, Low molecular weight polyethylenimines linked by β -cyclodextrin for gene transfer into the nervous system, *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 8 (2006) 736-744.
- [239] M. Miyazaki, E. Yuba, H. Hayashi, A. Harada, K. Kono, Hyaluronic acid-based pH-sensitive polymer-modified liposomes for cell-specific intracellular drug delivery systems, *Bioconjugate chemistry*, 29 (2017) 44-55.
- [240] G. Leone, M. Consumi, S. Lamponi, A. Magnani, New hyaluronan derivative with prolonged half-life for ophthalmological formulation, *Carbohydrate polymers*, 88 (2012) 799-808.
- [241] B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Ltd 2004.
- [242] S. Choosakoonkriang, B.A. Lobo, G.S. Koe, J.G. Koe, C.R. Middaugh, Biophysical characterization of PEI/DNA complexes, *Journal of pharmaceutical sciences*, 92 (2003) 1710-1722.
- [243] T. Yang, A. Hussain, S. Bai, I.A. Khalil, H. Harashima, F. Ahsan, Positively charged polyethylenimines enhance nasal absorption of the negatively charged drug, low molecular weight heparin, *Journal of controlled release*, 115 (2006) 289-297.
- [244] Shodhganga, *Preformulation Study*, 2004, pp. 98-112.
- [245] S. Yu, Y. Chen, X. Li, Z. Gao, G. Liu, Chitosan nanoparticle-delivered siRNA reduces CXCR4 expression and sensitizes breast cancer cells to cisplatin, *Biosci Rep*, 37 (2017).

- [246] X. Fang, H. Xie, H. Duan, P. Li, M. Yousaf, H. Xu, Y. Yang, C. Wang, Anti-tumor activity of nanomicelles encapsulating CXCR4 peptide antagonist E5, PLOS ONE, 12 (2017) e0182697.
- [247] M. Dragoj, Z. Milosevic, J. Bankovic, N. Tanic, M. Pesic, T. Stankovic, Targeting CXCR4 and FAK reverses doxorubicin resistance and suppresses invasion in non-small cell lung carcinoma, Cellular oncology (Dordrecht), 40 (2017) 47-62.



EKLER

EK 1- Tezden Türetilmiş Yayınlar

DELIVERY OF siRNA USING PEI AND HA BASED NANOPARTICLES FOR DOWNREGULATION OF CXCR4

Beste ÇAĞDAŞ TUNALI^{1, 3,*}, Eda ÇELİK^{1,2} and Mustafa TÜRK³

¹Department of Bioengineering, Institute of Science, Hacettepe University, 06800 ANKARA

²Department of Chemical Engineering, Engineering Faculty, Hacettepe University, 06800 ANKARA

³Department of Bioengineering, Engineering Faculty, Kırıkkale University, 71450 KIRIKKALE

ABSTRACT:

Target-specific delivery of small interfering siRNAs in cancer treatment is one of today's leading research topics. The effective transport of siRNAs via hyaluronic acid (HA) receptor was carried out with biodegradable HA and low molecular weight polyethyleneimine (PEI) based transport systems. Gold nanoparticles which are inorganic based nanoparticles capable of giving photothermal response and their conjugates with PEI and HA were added to the structure, which is first in the literature. As a consequence, a combination of gene silencing, photothermal therapy and chemotherapy has been provided. The dimensions of the PEI-HA, PEI-SS-HA, AuNP, AuPEI NP, AuPEI-HA and AuPEI-HA-DOX particles were measured by DLS method as, 330 nm, 203 nm, 91 nm, 25 nm, 366 nm and 692 nm, respectively. Cell viability was above 50% when the synthesized particles (100 µg/mL) were applied (except AuPEI NPs), according to the WST-1 test and the observed apoptotic effect was very low according to the double staining method. Using radiation following the conjugate/siRNA complex (especially those containing Au) application, the cytotoxic effect on the MDA-MB-231 cell line was increased. CXCR4 gene silencing of the synthesized complexes, especially AuPEI-HA-DOX/siRNA was more efficient in MDA-MB-231 cells than in CAPAN-1 cells. Overall, these results demonstrated that the synthesized PEI-HA and AuPEI-HA-DOX conjugates can be used as siRNA carriers that are effective especially in the treatment of breast cancer.

Keywords: Poliethylenimine, Hyaluronic acid, siRNA, Breast cancer, Pancreatic cancer, Gene Therapy, CXCR4

Not: Yayın yazım aşamasındadır.

EK 2- Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. ÇAĞDAŞ TUNALI, B., ÇELİK, E., Türk M., (2017). Hyaluronic Acid-Polyethylenimine Delivery System for Gene Silencing (22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 12-14 May /Ankara-Türkiye).





**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
~~YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU~~**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Tarih: 25/06/2019

Tez Başlığı / Konusu: **Kanser Tedavisinde Gen Susturulması İçin Hyalüronik Asit-Polietilenimin Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 106 sayfalık kısmına ilişkin, 30/05/2019 tarihinde ~~şahsım/tez danışmanım~~ tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar ~~hariç~~/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

25.06.2019
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Beste ÇAĞDAŞ TUNALI
Öğrenci No: N13248675
Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK
Programı: DOKTORA
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

DOÇ. DR. EDA ÇELİK AKDUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Beste ÇAĞDAŞ TUNALI
Doğum yeri : İZMİR
Doğum tarihi : 10.06.1986
Medeni hali : Evli
Yazışma adresi : 251/1 Sok. Eymen Park Evleri A Blok D:10
Yahşihan/KIRIKKALE
Telefon : 0537 678 38 03
Elektronik posta adresi : beste7540@yahoo.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Ege Üniversitesi/ Biyomühendislik Bölümü
Yüksek Lisans : Ege Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Farmasötik
Toksikoloji ABD
Doktora : Hacettepe Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/
Biyomühendislik ABD

BİLİMSEL FAALİYETLER

Uluslararası Yayınlar

1. Binici A., Okumuş A., Elmas G., Kılıç Z., Ramazanoğlu N., Açık L., Şimşek H., **Çağdaş Tunalı B.**, Türk M., Güzelf R., Hökelek T., Phosphorus–nitrogen compounds. Part 42. The comparative syntheses of 2-cis-4-ansa(N/O) and spiro(N/O) cyclotetraphosphazene derivatives: spectroscopic and crystallographic characterization, antituberculosis and cytotoxic activity studies, New J. Chem., 43, 6856-6873, 2019.

2. Tümer Y., Asmafiliz N., Zeyrek C.T., Kılıç Z., Açık L. Pınar Çelik S., Türk M., **Çağdaş Tunalı B.**, Ünver H., Hökelek T., Syntheses, spectroscopic and crystallographic characterizations of cis- and trans-dispirocyclic ferrocenylphosphazenes: molecular dockings, cytotoxic and antimicrobial activities, New J. Chem., 42, 1740-1756, 2018.
3. Elmas G., Okumuş A., Cemaloğlu R., Kılıç Z., Pınar Çelik S., Açık L., **Çağdaş Tunalı B.**, Türk M., Çerçi N.A., Güzel R., Hökelek T., Phosphorus-nitrogen compounds. part 38. Syntheses, characterizations, cytotoxic, antituberculosis and antimicrobial activities and DNA interactions of spirocyclotetraphosphazenes with bis-ferrocenyl pendant arms, Journal of Organometallic Chemistry, 853, 93-106, 2017.
4. **Çağdaş B.**, Kocagöz R., Onat İ., Perçin F., Özaydın O., Orhan H., Periodic monitoring of persistent organic pollutants and molecular damage in *Cyprinus Carpio* from Büyük Menderes River., Environ Sci Pollut Res Int., 24(5):4241-4251, 2017.
5. Kocagöz R., Onmuş O., Onat İ., **Çağdaş B.**, Sıkı M., Orhan H., Environmental and biological monitoring of persistent organic pollutants in waterbirds by non-invasive versus invasive sampling, Toxicology Letters. 230:208-217, 2014.

Ulusal Yayınlar

1. İnal M., **Çağdaş Tunalı B.**, Yiğitoğlu M., Akrilamid-Krotonik Asit İç İçe Geçmiş Ağ Yapılı Hidrojellerinin Metilen Mavisinin Adsorpsiyonunda Kullanımı, Uluslararası Mühendislik Araştırma ve Geliştirme Dergisi, 9(2), 2017.
2. Gün Gök Z., **Çağdaş Tunalı B.**, CRISPR-Cas İmmün Sisteminin Biyolojisi, Mekanizması ve Kullanım Alanları, IJERAD, 8(2):11-22, 2016.
3. Orhan H., **Çağdaş B.**, Besinlerde Kimyasal Kontaminasyon, Lipit Peroksidasyon Ürünleri ve Toksikite Riski, Hasad Gıda Dergisi, 294:18-24, 2009.

Bildiriler

1. İnal M., Topuz H., Keskin, H., Gün Gök Z., **Çağdaş Tunalı B.**, Yiğitoğlu M., Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the carp's intestine and investigation of their cellulolytic activity. VII. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 25-27 April 2018, Konya, Turkey.

2. İnal M., Topuz H., Keskin, H., Gün Gök Z., **Çağdaş Tunalı B.**, Yiğitoğlu M. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the cattle's scat, 8. International Advanced Technologies Symposium, 2017.
3. Aktürk Ö., Erdemli Ö., Karayel M., Demiral A., Kanatlı A., **Çağdaş Tunalı B.**, Şahingöz D., Deniz D.A., Keskin D., Yiğitoğlu M., Synthesis and Characterization of Microbial Levan-Capped Gold Nanoparticles for Potential Nanobiotechnological Applications, 13. Nanoscience and Nanotechnology Conference, 2017.
4. **Cagdas Tunalı B.**, Çelik E., Türk M., Hyaluronic Acid-Polyethylenimine Delivery System for Gene Silencing, 22nd Biomedical Science and Technology Symposium, 12-14 May 2017, Ankara/Türkiye
5. Albuz O., **Cagdas Tunalı B.**, Türk M., The Effects of Crystalline form boron trioxide (α -B₂O₃) Over Colon Cancer Cells: In vitro studies, 22nd Biomedical Science and Technology Symposium, 12-14 Mayıs 2017, Ankara/Türkiye
6. **Çağdaş Tunalı B.**, Türk M., The use of different nanoparticles as carriers in gene silencing, New Biotechnology 33S (2016) S1–S213 P4-1, 17th European Congress on Biotechnology, 3-6 Temmuz 2016
7. Şenduran N., Kocagöz R., **Çağdaş B.**, Orhan H., Sazan (*Cyprinus Carpio*) Karaciğerinde Halojenli Organik Kirleticilerin Vitelogenin ile korelasyonu, 17-20 Haziran 2012, Stockholm/İsveç.
8. Orhan H., **Cagdas B.**, Şenduran N., Perçin F., Özaydın O., Büyük Menderes Nehri *Cyprinus Carpio* örneklerinde PCB kirliliği ve makromoleküler hasar: ekotoksikolojiden risk değerlendirmesine, 28-31 Ağustos 2011-Eurotox, Paris
9. Orhan H., **Çağdaş B.**, Kocagöz R., Büyük Menderes Nehri Su Örneklerinde Organoklorlu pestisit, Poliklorlu Bifenil ve Polibromlu Difenil Eter Kirliliği, 20 Kasım 2010, Mersin/Türkiye

İŞ DENEYİMİ

Kırıkkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü/ Araştırma Görevlisi (2013-Halen devam ediyor)