

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK GEN
MATERYALİ YÜKLÜ NANOTAŞIYICI SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONLARI**

UZM. ECZ. GÖKBEN ŞAHİN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. AYCA YILDIZ PEKÖZ**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan, karşılaştığım zorlukların çözümü için bana rehberlik eden ve yorulduğum anlarda manevi desteğiyle beni teşvik eden danışmanım Doç. Dr. Ayca YILDIZ PEKÖZ'e çok teşekkür ederim.

Tezimin deneysel çalışmalarına Erasmus+ Öğrenci Hareketliliği kapsamında kendisinin rehberliğinde başladığım, Liverpool John Moores Üniversitesi Eczacılık ve Biyomoleküler Bilimler Okulu'ndan Prof. Dr. Imran Saleem'e, yine aynı okuldan PCR çalışmalarını ilk defa kendisiyle beraber deneyimlediğim ve bu alanla ilgili takıldığım her noktayı kendisine rahatça danıştığım Doç. Dr. Kehinde Ross'a, laboratuvar imkânları ve temin edilen deney malzemeleri için Liverpool John Moores Üniversitesi'ne çok teşekkür ederim. Bu iş birliği kapsamında yurt dışında bulunduğum süre boyunca tarafıma burs desteği sağlayan Avrupa Birliği Eğitim ve Gençlik Programları Merkezi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Deneylerimi gerçekleştirebilmem için her türlü olanaktan faydalanmama imkan sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na, tüm arkadaşlarıma ve çalışanlara teşekkür ederim.

Hücre kültürü çalışmalarımın ön denemelerini gerçekleştirebilmem için laboratuvarlarını açan TÜTAGEM (Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Merkezi)'e teşekkür ederim.

Tezimin stabilite çalışmaları için stabilite kabinleri ile boyut-zeta potansiyel ölçüm cihazından faydalandığım Farmatek İlaç Ar-Ge Departmanı'na teşekkür ederim.

Anlayışları ve yardımları için tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Deneylerim sebebiyle İstanbul'da bulunmam gerektiği zamanlarda bana evini açan Teyzem Neşe ÖNGÖREN'e teşekkür ederim.

En büyük teşekkürümü ise, iyi bir insan ve donanımlı bir birey olarak yetişebilmem için nefesleri yettiği müddetçe tüm imkânlarını önüme seren, kalbimde hep yaşayacak olan canım annem Ayşe ŞAHİN ve canım babam Hilmi ŞAHİN'e ediyorum. Beni koşulsuz sevip, bana her daim destek olan aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34379.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanserin Tanımı ve Önemi	4
2.2. Akciğer Kanserinin Önemi, Sınıflandırılması ve Tedavisi	6
2.3. Hücre Döngüsü - Gen - Kanser İlişkisi.....	8
2.4. Genetik Bilgi ve Transkripsiyon	12
2.5. Kodlamayan RNA (ncRNA)	12
2.5.1. Kodlamayan Uzun RNA (lncRNA) ve Kanser.....	14
2.5.2. lncRNA-UCA1 ve Akciğer Kanseri İlişkisi	17
2.6. Gen Tedavisi.....	20
2.6.1. Gen Tedavisinin Tarihçesi.....	21
2.6.2. Onaylı Gen Tedavi Ürünleri	23
2.6.3. Kanserde Gen Tedavi Yaklaşımları	27
2.6.4. Antisens Teknolojisi.....	27
2.6.4.1. Antisens Oligonükleotitler ve Modifikasyonları.....	30
2.6.4.2. Kilitli Nükleik Asit (LNA) Teknolojisi.....	35
2.6.4.3. Antisens LNA GapmeR Oligonükleotitleri	35
2.6.4.4. Onaylı Antisens Oligonükleotit İlaçları.....	37
2.6.5. Gen Tedavisinde Biyolojik Engeller	37
2.6.6. Gen Tedavisinde Kullanılan Taşıyıcı Sistemler	38
2.7. Kitozan Nanopartiküller	39
2.7.1. Kitozan	40

2.7.2. Nanopartiküller	42
2.7.3. Kitozan Mikro/Nanopartikül Üretim Yöntemleri	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Kullanılan Aletler	49
3.2. Kullanılan Maddeler ve Sarf Malzemeleri	51
3.3. Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması	54
3.4. Nanopartiküllerin Boyut ve Boyut Dağılımı Ölçümü	55
3.5. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Ölçümü.....	57
3.6. Boş Nanopartiküllerin Optimizasyon Çalışması	58
3.7. Liyofilizasyon Sonrası Disperse Edilen Boş Nanopartiküller.....	59
3.8. Boş Nanopartiküllerin Dispersiyon Stabilitesi	60
3.9. Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammaddesinin FT-IR Spektrumları	60
3.10. Boş Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopi Analizi.....	61
3.11. Boş Nanopartiküllerin Saflaştırılması.....	61
3.12. Antisens LNA™ GapmeR Oligonükleotitleri	63
3.13. GapmeR Oligonükleotitlerinin Yeniden Sulandırılması.....	64
3.14. GapmeR İçeren Nanopartiküllerin Hazırlanması	64
3.15. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Oranının Tayini	65
3.16. Agaroz Jel Elektroforeziyle Afinite Tayini.....	67
3.17. Hücre Kültürü Çalışmaları	68
3.17.1. Sitotoksite Çalışması	69
3.17.2. Konfokal Mikroskopi Çalışması	71
3.17.3. Ekspresyon Deneyleri	72
3.17.3.1. Hücre Hattı Seçim Çalışması	73
3.17.3.2. Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması	74
3.17.3.3. Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması.....	75
3.17.3.4. GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24, 48 ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması	76
3.17.3.5. Toplam RNA İzolasyonu	77
3.17.3.6. RNA Kantitasyonu	78
3.17.3.7. Ters Transkripsiyon İşlemiyle cDNA Eldesi	79
3.17.3.8. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	80
3.18. İstatistiksel Analiz	83

4. BULGULAR.....	84
4.1. Boş Nanopartiküllerin Optimizasyon Çalışmasına Ait Bulgular	84
4.2. Liyofilizasyon Sonrası Disperse Edilen Boş Nanopartiküllere Ait Bulgular.....	88
4.3. Boş Nanopartiküllerin Dispersiyon Stabilitesine Ait Bulgular	88
4.4. Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammadesinin FT-IR Spektrumlarına Ait Bulgular	98
4.5. Boş Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopi Analizine Ait Bulgular ...	99
4.6. Saflaştırma Öncesi ve Sonrasında Boş Nanopartiküllere Ait Bulgular	102
4.7. GapmeR İçeren Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeline Ait Bulgular	103
4.8. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Oranına Ait Bulgular	103
4.9. Agaroz Jel Elektforeziyle Afinite Tayinine Ait Bulgular	105
4.10. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	105
4.10.1. Sitotoksikite Çalışmasına Ait Bulgular	106
4.10.2. Konfokal Mikroskopi Çalışmasına Ait Bulgular	108
4.10.3. Ekspresyon Deneylerine Ait Bulgular.....	110
4.10.3.1. Hücre Hattı Seçim Çalışmasına Ait Bulgular	110
4.10.3.2. Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışmasına Ait Bulgular	113
4.10.3.3. Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışmasına Ait Bulgular.....	115
4.10.3.4. GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik, 48 Saatlik ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışmasına Ait Bulgular.....	117
5. TARTIŞMA	122
5.1. Boş Nanopartiküllere Ait Optimizasyon Çalışmasının Değerlendirilmesi	124
5.1.1. Boş Nanopartikül Eldesinde Kitozan/TPP kütle Oranının Değerlendirilmesi	124
5.1.2. Boş Nanopartikül Eldesinde Kitozan Çözelti pH'sının Değerlendirilmesi	127
5.1.3. Boş Nanopartikül Eldesinde Karıştırma Hızının Değerlendirilmesi	129
5.2. Liyofilizasyon Sonrası Disperse Edilen Boş Nanopartiküllerin Değerlendirilmesi	130
5.3. Boş Nanopartiküllerin Dispersiyon Stabilitelerinin Değerlendirilmesi	132
5.4. Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammadesinin FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi	136

5.5. Boş Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopi Analizinin Değerlendirilmesi	137
5.6. Safılaştırma Öncesi ve Sonrasında Boş Nanopartiküllerin Değerlendirilmesi	138
5.7. GapmeR İçeren Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi	138
5.8. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Oranının Değerlendirilmesi	139
5.9. Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmasının Değerlendirilmesi.....	140
5.10. Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	141
5.10.1. Sitotoksosite Çalışmasının Değerlendirilmesi.....	141
5.10.2. Konfokal Mikroskopi Çalışmasının Değerlendirilmesi	143
5.10.3. Ekspresyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	144
5.10.3.1. Hücre Hattı Seçim Çalışmasının Değerlendirilmesi	144
5.10.3.2. Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışmasının Değerlendirilmesi	145
5.10.3.3. Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışmasının Değerlendirilmesi	146
5.10.3.4. GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik, 48 Saatlik ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışmasının Değerlendirilmesi.....	147
6. KAYNAKLAR	150
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	170
ÖZGEÇMİŞ	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: lncRNA ve Kanser İlişkisi	16
Tablo 2-2: Bazı Gen Tedavi Ürünleri.....	25
Tablo 2-3: Onaylı Antisens Oligonükleotit İlaçları	37
Tablo 3-1: Optimizasyon Çalışmaları Kapsamında Farklı Parametreler ile Hazırlanan Boş Nanopartikül Formülasyonları	59
Tablo 3-2: Kullanılan Antisens LNA TM GapmeR Dizileri	63
Tablo 3-3: RNA Çalışma Standartlarının Hazırlığı	66
Tablo 3-4: Konfokal Mikroskopi Çalışmasındaki Uygulamalar	71
Tablo 3-5: Hücre Hattı Seçim Çalışmasındaki Deney Grupları	73
Tablo 3-6: Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - Deney Grupları	74
Tablo 3-7: Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - Deney Grupları.....	75
Tablo 3-8: GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik, 48 Saatlik ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - Deney Grupları.....	76
Tablo 3-9: Ters Transkripsiyon Karışımının Bileşenleri.....	79
Tablo 3-10: qPCR Karışımının Bileşenleri.....	81
Tablo 3-11: qPCR protokolü.....	82
Tablo 4-1: Kitozan/TPP Kütle Oranına Göre Boş Nanopartiküllerin Partikül Boyutu, PDI ve Zeta Potansiyel Değerleri.....	85
Tablo 4-2: Kitozan/TPP Kütle Oranı [5.0:1] Olan Formülde Optimizasyon Çalışması .86	
Tablo 4-3: Kitozan/TPP Kütle Oranı [5.5:1] Olan Formülde Optimizasyon Çalışması .86	
Tablo 4-4: Kitozan/TPP Kütle Oranı [6.0:1] Olan Formülde Optimizasyon Çalışması .86	
Tablo 4-5: Liyofilizasyon İşlemi Öncesi ve Sonrasında Boş Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Değerleri	88
Tablo 4-6: Boş Nanopartiküllerin Oda Koşullarında 5 Saatlik Dispersiyon Stabilitesi..89	
Tablo 4-7: Boş Nanopartiküllerin 5°C ± 3°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi	90
Tablo 4-8: Boş Nanopartiküllerin 25°C ± 2°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi	93
Tablo 4-9: Boş Nanopartiküllerin 40°C ± 2°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi	96
Tablo 4-10: Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammaddesinin FT-IR Spektrumlarındaki Bazı Bantlar ve Dalga Boyları	99

Tablo 4-11: Santrifüjle Saflaştırma Öncesi ve Sonrası Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Değerleri	102
Tablo 4-12: Santrifügal Filtrasyonla Saflaştırma Öncesi ve Sonrası Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Değerleri	103
Tablo 4-13: GapmeR İçeren ve Boş Nanopartiküllere Ait Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Değerleri	103
Tablo 4-14: RNA Standartlarının Floresans Değerleri.....	104
Tablo 4-15: Uygulanan Formülasyonlara Ait Hücre Canlılığı	106
Tablo 4-16: Hücre Hattı Seçim Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu	110
Tablo 4-17: Hücre Hattı Seçim Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi.....	111
Tablo 4-18: lncRNA-UCA1 Seviyelerinin Calu-3 ve A549 Hücre Hatlarında Kıyaslanması.....	112
Tablo 4-19: Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu	113
Tablo 4-20: Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi.....	114
Tablo 4-21: Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu	115
Tablo 4-22: Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi.....	116
Tablo 4-23: GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu.....	117
Tablo 4-24: GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 48 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu.....	118
Tablo 4-25: GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu.....	119
Tablo 4-26: GapmeR ST-2'in Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24, 48 ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi.....	120

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Türkiye’de Nedenlere Göre Ölüm Oranları (Yıl: 2019).....	5
Şekil 2-2: Dünyada Kanser Türüne Göre Yeni Vakalar (Yıl: 2020)	6
Şekil 2-3: Dünyada Kanser Türüne Göre Ölümler (Yıl: 2020)	7
Şekil 2-4: Hücre Döngüsü	9
Şekil 2-5: Hücre Mutasyonu, Çoğalması ve Malign Tümör Gelişimi	11
Şekil 2-6: ncRNA'nın Fonksiyonuna Göre Sınıflandırılması	13
Şekil 2-7: Farklı Antisens Stratejilerinin Karşılaştırılması.....	29
Şekil 2-8: Ribonükleotitlerin Kimyasal Modifikasyonu için Hedef Bölgeler	31
Şekil 2-9: Modifiye Antisens Oligonükleotitler	32
Şekil 2-10: RNaz H Etkili Kimerik Oligonükleotit (Gapmer) Tasarımı	33
Şekil 2-11: DNA, RNA ve LNA Oligonükleotitlerinin Yapısal Çizimleri	35
Şekil 2-12: Antisense LNA GapmeR Molekülü Tasarımı.....	36
Şekil 2-13: Fosforotiyoat (PS) Omurgasına Sahip LNA ve DNA Birimleri	36
Şekil 2-14: Çeşitli Farmasötik Nanotaşıyıcılar	38
Şekil 2-15: Polimerik, Lipit ve İnorganik Yapılı Nanotaşıyıcılara Nükleik Asit Yüklenmesi	39
Şekil 2-16: Selüloz, Kitin ve Kitozanın Yapısı.....	40
Şekil 2-17: Polimerik Nanopartiküllerin Başlıca İki Tipi	43
Şekil 3-1: Boş Kitozan Nanopartiküllerin İyonik Jelasyon Yöntemiyle Hazırlanması ..	55
Şekil 3-2: Vivaspin®2 konsantratörü a) Saflaştırma öncesi b) Saflaştırma sonrası	62
Şekil 4-1: Farklı Kitozan/TPP Kütle Oranı ile Hazırlanan Dispersiyonların Görünüşleri	84
Şekil 4-2: Kitozan/TPP Kütle Oranına Göre Partikül Boyutu.....	85
Şekil 4-3: Kitozan Çözelti pH'sının Farklı Kitozan/TPP Kütle Oranlarında Partikül Boyutuna Etkisi (300 rpm)	87
Şekil 4-4: Kitozan Çözelti pH'sının Farklı Kitozan/TPP Kütle Oranlarında Partikül Boyutuna Etkisi (600 rpm)	87
Şekil 4-5: Boş Nanopartiküllerin Oda Koşullarında 5 Saatlik Dispersiyon Stabilitesi ...	90
Şekil 4-6: Boş Nanopartiküllerin 5°C ± 3°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi	91
Şekil 4-7: Boş Nanopartiküllerin 5°C ± 3°C'de 1 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	91

Şekil 4-8: Boş Nanopartiküllerin $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 2 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	92
Şekil 4-9: Boş Nanopartiküllerin $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 3 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	92
Şekil 4-10: Boş Nanopartiküllerin $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi ...	93
Şekil 4-11: Boş Nanopartiküllerin $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 1 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	94
Şekil 4-12: Boş Nanopartiküllerin $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 2 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	94
Şekil 4-13: Boş Nanopartiküllerin $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 3 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	95
Şekil 4-14: Boş Nanopartiküllerin $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 4 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	95
Şekil 4-15: Boş Nanopartiküllerin $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi ...	96
Şekil 4-16: Boş Nanopartiküllerin $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 1 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	97
Şekil 4-17: Boş Nanopartiküllerin $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 2 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	97
Şekil 4-18: Boş Nanopartiküllerin $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki 3 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	98
Şekil 4-19: Boş Nanopartiküllerin $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 4 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri	98
Şekil 4-20: Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammaddesine ait FT-IR Spektrumları	99
Şekil 4-21: Boş Nanopartikül SEM Görüntüsü (kaplama yapılmadan)	100
Şekil 4-22: Boş Nanopartikül SEM Görüntüsü - 20.000 Büyütme (altın kaplama)	101
Şekil 4-23: Boş Nanopartikül SEM Görüntüsü - 38.000 Büyütme (altın kaplama)	101
Şekil 4-24: Boş Nanopartikül SEM Görüntüsü - 50.000 Büyütme (altın kaplama)	102
Şekil 4-25: RNA Miktarına Karşılık Floresans Değerlerine Ait Standart Eğri	104
Şekil 4-26: Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü	105
Şekil 4-27: Uygulanan Formülasyonlara Ait Hücre Canlılığı (%)	107
Şekil 4-28: Tam Kültür Ortamı Uygulanan Hücrelere Ait Görüntüler	108
Şekil 4-29: GapmeR-NK Oligonükleotidi Uygulanan Hücrelere Ait Görüntüler	109

Şekil 4-30: Boş Nanopartikül Uygulanan Hücrelere Ait Görüntüler A) 405 nm Eksitasyonu B) 488 nm Eksitasyonu C) 405 nm ve 488 nm Eksitasyonlarının Birleştirilmiş Hali.....	109
Şekil 4-31: GapmeR-NK Nanopartikül Uygulanan Hücrelere Ait Görüntüler A) 405 nm Eksitasyonu B) 488 nm Eksitasyonu C) 405 nm ve 488 nm Eksitasyonlarının Birleştirilmiş Hali.....	109
Şekil 4-32: Hücre Hattı Seçim Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi.....	111
Şekil 4-33: lncRNA-UCA1 Seviyelerinin Calu-3 ve A549 Hücre Hatlarında Kıyaslanması.....	112
Şekil 4-34: Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması – lncRNA-UCA1 Seviyesi.....	114
Şekil 4-35: Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması — lncRNA-UCA1 Seviyesi.....	116
Şekil 4-36: GapmeR ST-2'in Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik, 48 Saatlik ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi.....	120

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μl	Mikrolitre
2-ME	2-Merkaptoetanol
2-$\Delta\Delta C_T$	Karşılaştırmalı Döngü Eşiği
a/h	Ağırlık / Hacim
ACTB	Beta Aktin
AIDS	Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
AVV	Adeno-İlişkili Virüs
CAR-T	Kimerik Antijen Reseptörü Üreten T Hücreleri
cDNA	Tamamlayıcı (Komplementer) DNA
CMV	Sitomegalovirüs
CO₂	Karbondioksit
C_T	Döngü Eşiği
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EPR	Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü - Kızılötesi
g	Gram
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
HCl	Hidroklorür

HOTAIR	HOX Antisens İntergenik RNA
kDa	Kilo Dalton (Dalton: Atomik Kütle Birimi)
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
LNA	Kilitli Nükleik Asit
lncRNA	Uzun Kodlamayan RNA
LPLD	Lipoprotein Lipaz Yetersizliği
MALAT 1	Metastaz İlişkili Akciğer Adenokarsinom Transkript 1
MAPK 1	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz 1
mg	Miligram
miRNA	Mikro RNA
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı (Kodlayan) RNA
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
MWCO	Moleküler Ağırlık Engelleme Sınırı
NaOH	Sodyum Hidroksit
ncRNA	Kodlamayan (Proteine Çevrilmeyen) RNA
NMPA	Çin İlaç ve Gıda Dairesi
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	Polietilen Glikol
pmol	Pikomol
PS	Fosforotiyoat
qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	RNA ile İndüklenen Sessizleştirme Kompleksi

RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
SCID-X1	X'e Bağlı Ağır Kombine İmmün Yetmezliği
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
siRNA	Küçük Girişimci RNA
sncRNA	Küçük Kodlamayan RNA
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TPP	Sodyum Tripolifosfat
tRNA	Taşıyıcı RNA
UCA1	Ürotelyal Kanser İlişkili 1 (Urothelial Cancer Associated 1)

ÖZET

Şahin, G. (2022). Akciğer Kanseri Tedavisine Yönelik Gen Materyali Yüklü Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Karakterizasyonları. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kanser, bir genetik kusur hastalığıdır. Gen tedavisi, kanserde hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarından biri olup, hastalığın genetik nedenini ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir. Bir tür kodlamayan RNA olan, lncRNA-UCA1'in akciğer kanserinde yüksek oranda eksprese olduğu keşfedilmiştir. Bu tez çalışmasının amacı, içerdiği antisens oligonükleotitler (GapmeR'ler) sayesinde, lncRNA-UCA1 seviyesinin düşürülmesini sağlayan ve böylelikle akciğer kanserinde etkili olabilecek kitozan nanopartiküllerin geliştirilmesi ve karakterizasyonunun yapılmasıdır. Nanopartiküller, kitozan ve tripolifosfat biraraya getirilerek, iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Boş nanopartiküller, bazı formülasyon parametreleri değiştirilerek, partikül boyutu ve zeta potansiyel açısından optimize edilmiştir. Boş nanopartikül dispersiyonları için en uygun saklama sıcaklığının $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ olduğu görülmüştür. Optimizasyon ve dispersiyon stabilitesi çalışmaları sonucunda formülasyon parametrelerine ait seçilen değerler, kitozan/tripolifosfat kütle oranı [5.0:1], kitozan çözelti pH'sı 4.0 ve karıştırma hızı 600 rpm'dir. Partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri boş nanopartiküller için $164,90 \pm 2,51$ nm ve $39,60 \pm 0,81$ mV; seçilen GapmeR standardını içeren nanopartiküller için ise $149,00 \pm 0,36$ nm ve $+32,20 \pm 0,87$ mV'tur. Enkapsülasyon etkinliği 99.42 ± 1.10 olarak bulunmuştur. Agaroz jel elektroforezi çalışması, kitozan nanopartiküller ve GapmeR'ler arasındaki afinitenin, iyi derecede olduğunu göstermiştir. Nanopartiküllerin, uygulandığı konsantrasyonda, Calu-3 hücrelerine sitotoksik olmadığı gösterilmiştir. Konfokal mikroskopi çalışmasında GapmeR'lerin hücre içine alındığı görülmüştür. GapmeR içeren nanopartikül uygulaması, kontrol gruplarına göre lncRNA-UCA1 seviyesinde ancak 72 saat sonunda anlamlı bir düşüş sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: akciğer kanseri, antisens oligonükleotit, lncRNA, kitozan, nanopartikül.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 34379) ve Liverpool John Moores Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Sahin, G. (2022). Development and Characterization of Gene Material Loaded Nanocarrier Systems for Lung Cancer Treatment. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology. PhD Thesis. Istanbul.

Cancer is a genetic defect disease. Gene therapy is one of the targeted treatment approaches in cancer and has the potential to eliminate the genetic cause of the disease. It has been discovered that lncRNA-UCA1, a type of non-coding RNA, is highly expressed in lung cancer. The aim of this thesis is to develop and characterize chitosan nanoparticles, which, thanks to the antisense oligonucleotides (GapmeRs) they contain, reduce the level of lncRNA-UCA1 and thus may be effective in lung cancer. Nanoparticles were prepared by ionic gelation method by combining chitosan and tripolyphosphate. Unloaded nanoparticles were optimized in terms of particle size and zeta potential by changing some formulation parameters. The optimum storage temperature for unloaded nanoparticle dispersions was found to be $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. As a result of optimization and dispersion stability studies, the selected values of the formulation parameters were chitosan/tripolyphosphate mass ratio [5.0:1], chitosan solution pH 4.0 and stirring speed 600 rpm. Particle size and zeta potential values were 164.90 ± 2.51 nm and 39.60 ± 0.81 mV for unloaded nanoparticles; 149.00 ± 0.36 nm and $+32.20 \pm 0.87$ mV for GapmeR loaded nanoparticles. The encapsulation efficiency is $99.42 \pm 1.10\%$. Agarose gel electrophoresis showed that chitosan nanoparticles and GapmeRs have good affinity. It has been shown that the nanoparticles are not cytotoxic to Calu-3 cells at the applied concentration. In the confocal microscopy study, it was observed that GapmeRs were taken into the cells. GapmeR-loaded nanoparticle application resulted in a significant decrease in lncRNA-UCA1 level only after 72 hours compared to the control groups.

Key Words: lung cancer, antisense oligonucleotide, lncRNA, chitosan, nanoparticle.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: 34379) and Liverpool John Moores University.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, sık görülmesi ve ölümcül olması nedeniyle hem dünyada hem de ülkemizde görülen en önemli toplumsal sağlık problemlerinden biridir. Dünyada ölüm nedenleri arasında, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer almaktadır [1]. Tüm dünyada en sık görülen ve kansere bağlı ölüm nedenleri içinde ilk sırada yer alan kanser türü ise, akciğer kanseridir [2].

Kanser kısaca, vücut hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanır. Normalde, insan hücreleri büyür ve organizmanın ihtiyaç duyduğu yeni hücreleri oluşturmak üzere, bölünerek çoğalır. Yaşlandığı veya zarar gördüğü için ölen hücrelerin yerini, bu yeni hücreler alır. Fakat bu düzenli döngü bazen bozulur ve aslında ölmesi gereken hücreler büyüyüp çoğalmaya devam eder. Bu hücreler tümör oluşumuna ve bu tümörlerden bazıları da kansere sebep olur [3].

Kanser tedavisinde kullanılan temel yöntemler cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Birçok durumda bu yöntemler birlikte kullanılmaktadır. Cerrahi, çok eskiden beri uygulanmaktadır ve bugün halen kanserden iyileşen hastaların büyük kısmında (%75-80) ilk tedavi yöntemidir. Fakat birçok kanser türünde, kanserli dokular cerrahi yöntemle çıkarıldığı halde, mikroskopik yayılımlar da söz konusudur. Bu nedenle cerrahi yöntem tek başına yeterli olamamaktadır. Ayrıca organ kaybı söz konusudur ve kanserin tekrarlama riski de vardır. Radyoterapi, kanser tedavisinde X-ışınları, gamma ışınları, elektronlar gibi iyonize ışınların kullanılmasıdır. Bu ışınlar, kanserli hücrelere uygulanarak bunları tahrip eder. Ancak bazı kanser cinsleri radyoterapiye dirençli olabilmektedir. Ayrıca radyasyondan kanserli hücrelerle birlikte sağlıklı hücreler de zarar görebilir. Radyasyon dağılımı tüm kanser hücrelerine eşit yoğunlukta da değildir ve radyasyon sebebiyle fonksiyon kaybı oluşabilir. Özetle, cerrahi yöntem ve radyoterapi sadece erken tanı konan, vücuda yayılım göstermeyen kanserlerde tek başına etkili olabilir. Fakat çoğu zaman bu tedavilere ek olarak, kemoterapi de gerekir. Kemoterapi, kanserin ilaçla tedavisi demektir ve sistemik bir tedavidir. Yani, sadece hastalığın başladığı yere değil, uzak bölgelere yayılmış olan, saptanmış veya saptanamayan tüm kanserli hücrelere etki eder. Bu hücrelerin çoğalmalarını durdurur ve onları yok eder. Ancak bu ilaçlar vücuttaki normal hücrelere de etki etmekte ve ciddi yan etkilere yol açabilmektedir [4,5].

Kanserde standart olarak kabul edilen bu üç tedavi yönteminin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavinin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi gibi nedenlerle, kanser için tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek, henüz mümkün olamamıştır [6]. Bununla birlikte, geleneksel tedavide kullanılan anti-kanser ajanların kanserli hücre ve dokular için seçici olmaması, kanser tedavisinde başarıyı kısıtlayan en önemli faktör olarak değerlendirilmektedir [7]. Bu nedenle kanser tedavisinde hedefe yönelik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmakta ve araştırmalar da bu noktada yoğunlaşmaktadır.

Gen tedavisi, kanserde hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarından biri olup, hastalığın genetik nedenini ortadan kaldırma potansiyeline sahiptir. Bu tedavide, hastalığın gelişmesinden sorumlu olan kusurlu genleri düzeltmek için hastaya, “etkin madde” niteliğinde olan nükleik asit yapılı moleküller transfer edilir. Bu sayede, eksik proteinin vücutta üretilmesi, tedavi edici proteinlerin ekspresyonunun artırılması ya da zararlı proteinlerin üretiminin inhibisyonu (gen susturma yöntemi) gibi tedavisel etkiler hedeflenir [8].

Bu tez çalışmasında gen tedavisi yaklaşımlarından biri olan antisens teknolojiiden yararlanılmıştır. Antisens teknolojisi, genleri post-transkripsiyonel olarak susturmak için uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemde antisens ajan veya antisens oligonükleotit olarak adlandırılan oligonükleotit analogları (tipik olarak 15-20 nükleotit) etkin madde olarak kullanılır. Antisens oligonükleotitler, hedef RNA dizilerine bağlanarak hedef RNA’nın yok edilmesini veya devre dışı bırakılmasını sağlar [9]. Bu tez çalışmasında etkin madde niteliğinde olan, “GapmeR” olarak adlandırılan antisens oligonükleotitler kullanılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan GapmeR molekülleri, lncRNA-UCA1 adı verilen bir tür RNA molekülünü hedeflemek üzere tasarlanmıştır. lncRNA-UCA1’in akciğer kanserinde yüksek oranda eksprese olduğu ve malign tümörlerin gelişmesinde önemli bir rol oynadığı keşfedilmiştir [10,11]. lncRNA-UCA1 seviyesinin baskılanmasının ise, akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücre çoğalması ve göçünü engellediği bildirilmiştir [12–14]. Bu nedenle bu tez çalışmasında lncRNA-UCA1 seviyesinin düşürülmesi hedeflenerek, akciğer kanseri tedavisinde literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

GapmeR’lerin hedef RNA’ya ulaşabilmesi için, biyolojik engellere karşı korunarak hücrelere taşınması gereklidir. Bu amaçla, biyoparçalanabilir, biyouyumlu ve

düşük toksisiteye sahip kitozan polimerinden faydalanarak nanopartiküler taşıyıcı bir sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Kitozan, katyonik yapısı sayesinde GapmeR'ler gibi negatif yüke sahip oligonükleotitler ile kolayca etkileşime girebilmektedir [15].

Sonuç olarak bu tez çalışmasının amacı, içerdiği antisens oligonükleotitler sayesinde, akciğer kanseriyle ilişkisi olduğu belirlenen lncRNA-UCA1'in ekspresyon seviyesinin düşürülmesini sağlayan ve böylelikle akciğer kanseri tedavisinde etkili olabilecek, kitozan nanopartiküllerin geliştirilmesi ve karakterizasyonunun yapılmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tanımı ve Önemi

Kanser terimi ilk defa, Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları için kullanılmıştır. Hipokrat, vücut yüzeyinde yavaşça büyüyen, genellikle kırmızı, sıcak, ağrılı ve diğerlerinden farklı karakterdeki şişlikleri ve bunların etrafındaki şişmiş damarları bir yengeç ve bacaklarına benzetmiş, bu şişliklere Yunanca’da yengeç demek olan “carcinos” ya da “carcinoma” adını vermiştir. Başka bir yoruma göre ise bu adlandırmanın sebebi, kanser ağrısının yengeç ısırmasıyla oluşan ve ortadan çevreye doğru yayılan kemirici tarzdaki ağrıya benzerlik göstermesidir. Romalı hekim Celcus (M.Ö. 28-50), Hipokrat’ın bu terimini Latince’ye çevirerek “cancer” demiştir. Bir başka Romalı hekim Galen ise (M.S. 129-200), oluşan tümörleri tanımlamak için Yunanca’da şişlik anlamına gelen “oncos” sözcüğünü kullanmıştır. Türk tıp tarihinde ise kansere, yengeç anlamına gelen “seretan” adı verilmektedir. Tarsuslu Osman Hayri Efendi’nin “Kenzüshhatül Ebdaniye” (1298) adlı eserinde seretan, fındık ya da küçük yumru büyüklüğünde, ağrılı, etrafı damarlı bir oluşum olarak tanımlanmaktadır [6,16].

Organizmanın temel birimi olan hücreler, belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar. Öte yandan yaşlanan hücreler de belirli bir hızda yıkılırlar. Kanser, en kısa tanımıyla, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları demektir. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler bulundukları yerdeki ve hatta daha uzaktaki doku ve organları işgal eder, işgal ettiği bu bölümlerin işlev görmesini engeller [4].

Hücrelerin bölünmesi ve kontrolü genlerin kontrolü altında olduğundan kanser temelde, genlerle ilişkili olan bir hastalıktır. DNA tamir sistemleri, gende oluşan bir hasara bağlı olarak, genin işlevini yeniden kazandırmaya çalışsa da her zaman başarı sağlanamaz ve hücrenin kanserleşmesi problemi ortaya çıkar [6].

Kanser, çocuk-genç-yaşlı, zengin-fakir, kadın-erkek herkesi etkilemekte, ayrıca hastalar, aileler ve toplumlar üzerinde muazzam bir yük oluşturmaktadır [17]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)’nün verilerine göre 2018 yılında, yaklaşık 18.1 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmış ve yaklaşık 9.6 milyon insan kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. 2020 yılında ise yeni kanser vakası 19 milyonu aşmış ve kanser sebebiyle hayatını kaybedenlerin sayısı ise 10 milyona çıkmıştır. Dünyada ölüm nedenleri arasında, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan kanserin, 2030 yılına kadar hızla artarak birinci sıraya yerleşeceği öngörülmektedir. Benzer seyir devam ettiği

taktirde, 2030 yılına gelindiğinde yıllık 22 milyon yeni vakanın ortaya çıkması beklenmektedir [1].

Dünya çapında altı ölümden birinin nedeni kanserdir [17]. Bunun yanı sıra, kanserin ekonomik yükü de oldukça fazla olup, bu yük her geçen gün artmaktadır. 2010 yılında kanserin yıllık toplam ekonomik maliyetinin yaklaşık 1,16 trilyon dolar olduğu tahmin edilmektedir [18].

Kanser, sık görülmesi ve ölümcül olması nedeniyle tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en önemli toplumsal sağlık problemlerinden biridir [1]. 2019 yılı verilerine göre Türkiye’deki yaklaşık her beş ölümden biri (%18,4) kanser sebebiyledir (Şekil 2-1) [19].



Şekil 2-1: Türkiye’de Nedenlere Göre Ölüm Oranları (Yıl: 2019)

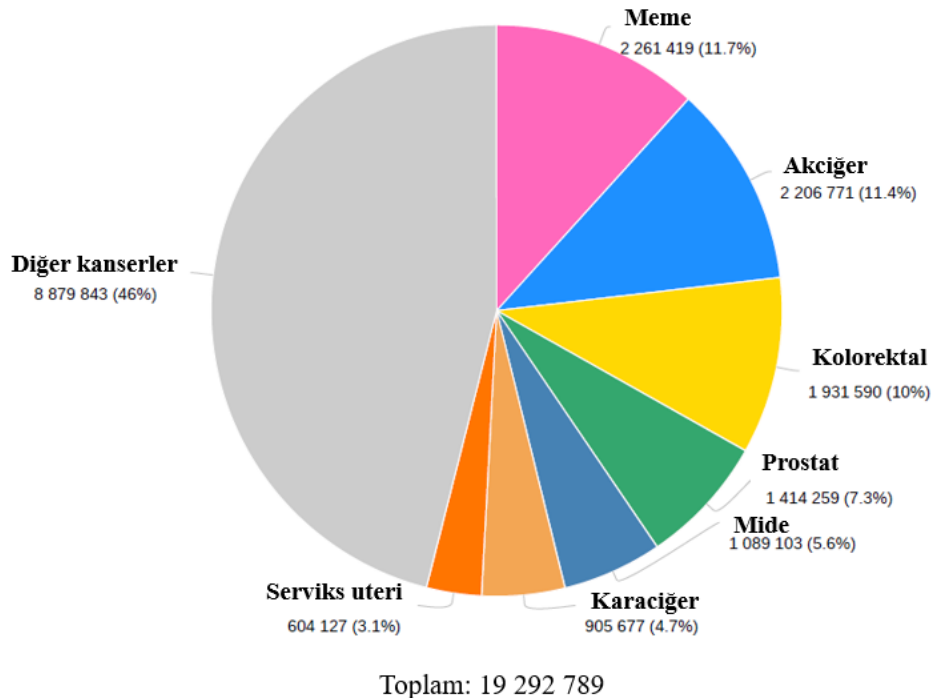
2020 yılında, Türkiye’de 233.834 kişiye kanser teşhisi konmuştur. Bu veriye göre, ülkemizde bir günde yaklaşık 640 kişinin kanser teşhisi aldığı söylenebilir. 2020 yılında, Türkiye’de kanser sebebiyle hayatını kaybedenlerin sayısı ise 126.335’tir [20]. Türkiye kanser insidansı, erkeklerde dünya insidansının üzerinde seyrederken, kadınlarda bir miktar daha düşüktür. Avrupa Birliği ülkeleri ve Amerika gibi gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelere göre, ülkemizde kanser açısından hem kadınlarda hem de erkeklerde daha düşük bir hızda olduğu görülmektedir [21].

Kanserden ölümlerin yaklaşık üçte biri; başlıca beş davranışsal ve beslenmeyle ilgili risk faktörlerinden kaynaklanmaktadır. Bunlar; **i.** tütün kullanımı, **ii.** yüksek beden kütle indeksi (fazla kilolu ya da şişman olma), **iii.** meyve ve sebzeyi az tüketme, **iv.** yetersiz fiziksel aktivite, **v.** alkol kullanımıdır. Tütün kullanımı kanser için en önemli risk faktörüdür ve kanser ölümlerinin yaklaşık %22'sinden sorumludur [18].

2.2. Akciğer Kanserinin Önemi, Sınıflandırılması ve Tedavisi

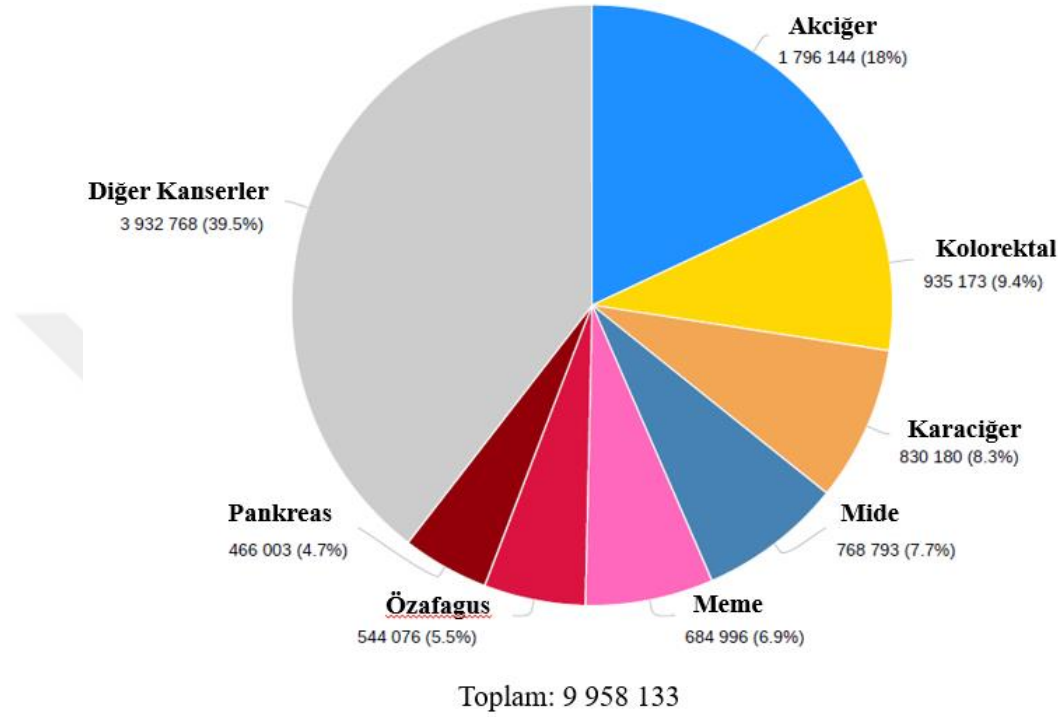
Akciğer kanseri, yapısal olarak normal akciğer dokusundan oluşan hücrelerin ihtiyaç ve kontrol dışı çoğalarak akciğer içinde bir kitle oluşturmasıdır [22].

DSÖ Küresel Kanser Gözlemevi'nin verilerine göre, son yıllarda en fazla yeni vaka görülen kanser türlerinden biri akciğer kanseridir. 2020 yılında dünyada akciğer kanseri kaynaklı 2,2 milyondan fazla yeni vaka görülmüştür (Şekil 2-2) [2].



Şekil 2-2: Dünyada Kanser Türüne Göre Yeni Vakalar (Yıl: 2020)

Aynı yıl yaklaşık 1,8 milyon insan, bu kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Akciğer kanseri dünyada, en yüksek mortaliteye sahip kanser türüdür ve kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Şekil 2-3) [2].



Şekil 2-3: Dünyada Kanser Türüne Göre Ölümler (Yıl: 2020)

Türkiye'ye bakıldığında ise, akciğer kanseri erkeklerde ilk, kadınlarda dördüncü sırada görülen kanser türüdür. Son yıllar içerisinde erkeklerde azalma eğilimi, kadınlarda ise bir miktar artış söz konusudur [23]. Ülkemizde 2020 yılında, 40 bini aşkın kişiye akciğer kanseri teşhisi konulmuş ve yaklaşık 37 bin kişi, bu hastalıktan dolayı hayatını kaybetmiştir. Türkiye'de tüm kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %30'unu akciğer kanseri oluşturmaktadır [20].

Her 10 akciğer kanserinden en az 8'inin tütün ve tütün ürünlerine bağlı kullanımdan kaynaklandığı bilinmekte olup, toplumsal ve bireysel farkındalıkla bu kanser türünün sıklığının azaltılmasının mümkün olduğu unutulmamalıdır [23].

Akciğer kanseri, başlıca "küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)" ve "küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)" olmak üzere iki grupta incelenir. Bu sınıflama,

tümörün mikroskopik görüntüsüne dayanılarak yapılır. Bu iki tip kanserin büyüme hızları, yayılımları ve tedavileri farklıdır. KHAK, akciğer kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. En hızlı büyüyen ve en hızlı yayılım (metastaz) gösteren tipidir. Sigara ile çok yakından ilişkilidir. Çok hızlı metastaz yaptığından genellikle tanı konulduğu sırada vücutta yayılmış olduğu görülür. Fakat kemoterapiye yanıtı iyidir. KHDAK ise, en sık görülen akciğer kanseridir, tüm hastaların %85-90 kadarını oluşturur. KHDAK'nin üç ana tipi vardır. Görülme sıklığı sırasına göre, adenokanser, skuamöz (yassı) hücreli kanser ve büyük hücreli kanser şeklindedir [24].

KHAK'nde hastalığın gidişatı oldukça kötüdür. Sınırlı ve yaygın evreler birlikte değerlendirildiğinde bu tür kanserlerde 5 yıllık yaşam oranı % 5'tir. KHDAK için I. evre hastalarda cerrahi tedavi sonrası 5 yıllık yaşam oranı %57-67 arasındadır. IV. evre hastalarda ise bu oran %1 bulunmuştur [24].

Akciğer kanserinde tedavinin doğru yapılabilmesi için doğru evreleme şarttır. Evreleme, kanserin bulunduğu bölgeyle sınırlı olup olmadığı, lenf nodlarına (havayolları kenarında lenfatik bezeler) veya diğer uzak organlara yayılıp yayılmadığı temeline dayanır [24].

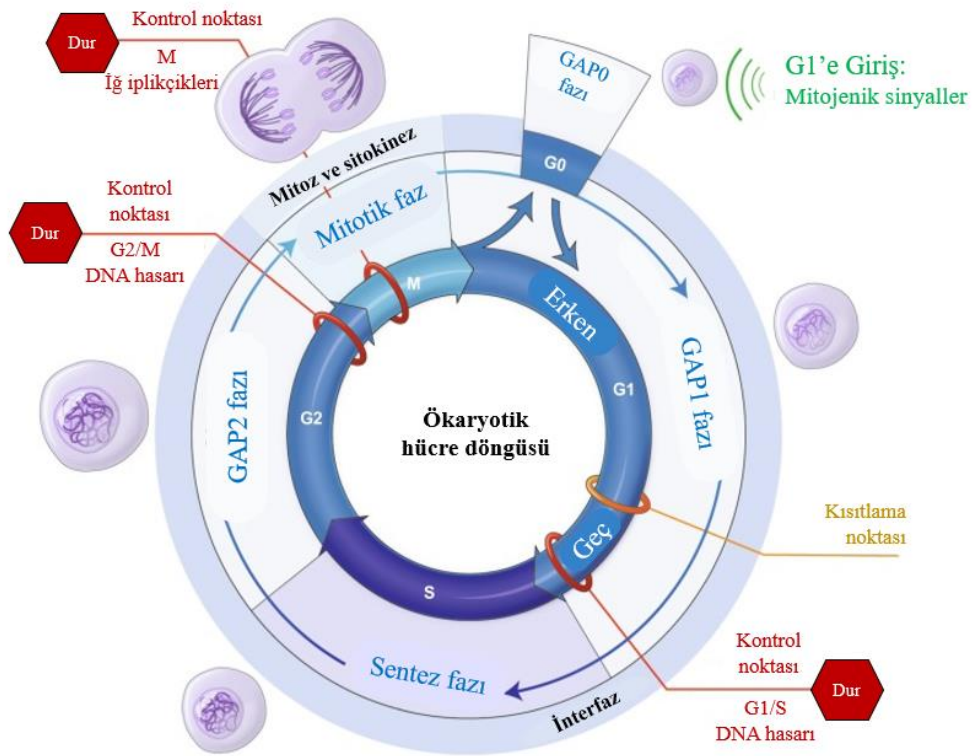
Akciğer kanserinin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler tek başlarına veya birlikte uygulanabilmektedir. Uygulanacak tedaviler KHDAK'de evrelere göre (hafiften ağıra evre I-IV) farklılık gösterir. KHAK olan hastalarda ise, eğer hastalık çok erken evrede yakalanabilirse cerrahi tedavi şansı olabilir. Ancak bu hastaların çoğunda tanı konulması sırasında hastalık zaten yaygın evrede olup, cerrahi tedavi mümkün olamamaktadır. İleri evre akciğer kanseri olan bazı hastalarda, hedefe yönelik akıllı ilaçlar da uygulanabilir. Tanı amacıyla alınan kanserli doku hücrelerindeki genetik değişiklikler hakkında bilgiler artmış ve direkt bu değişiklikleri hedef alan ilaçlar geliştirilmeye ve kullanılmaya başlanmıştır [24].

2.3. Hücre Döngüsü - Gen - Kanser İlişkisi

Hücre çoğalması, çok hücreli organizmalarda tüm gelişim ve doku onarımı için gerekli olan, hücre büyüme ve bölünme döngüsüdür (Şekil 2-4) [25].

Bu döngü, interfaz ve mitotik fazdan oluşur. İnterfaz, mitotik bölünmeler arasındaki süreç olup bölünmeye hazırlık evresidir. Bir hücre döngüsünün %90'ını

interfaz kapsar. Kendi içinde G1, S ve G2 evrelerine ayrılır. G1 sırasında hücre, gerekli enzim ve molekülleri biriktirerek DNA sentezi için hazırlık yapar. G1 evresini, hücrenin kromozomal DNA'sının kopyalandığı S evresi izler. Ardından G2 evresinde de hücre büyümeye ve bölünmek üzere hazırlanmaya devam eder. İnterfaz aşamasını tamamlayan hücre, mitotik faza geçer. Bu fazda, çoğalmış olan kromozomlar yoğunlaştırılır ve kardeş kromozomlar zıt kutuplara ayrılır. Yani hücre, mitoz (çekirdek bölünmesi) geçirir. Ardından sitokinez (sitoplazma bölünmesi) de gerçekleşir ve böylece bir hücreden iki yavru hücre oluşur. Çoğalma durdurulursa hücre, döngünün G0 fazına girer. G0 esnasında hücre, metabolik olarak aktiftir fakat büyüyemez ya da bölünemez. Mitojenik sinyaller alırsa hücre döngüsüne yeniden girer. Ancak nöronlar gibi bazı hücreler, hücre döngüsüne yeniden giriş yapamazlar [25,26].



Şekil 2-4: Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü, pozitif ve negatif düzenleyiciler tarafından sıkı biçimde koordine edilir. Hücrenin kendi iç dengesini izlediği ve döngüsünü kontrol ettiği en az üç farklı nokta vardır. Bunlar, G1/S, G2/M ve M kontrol noktalarıdır. G1/S kontrol noktasında

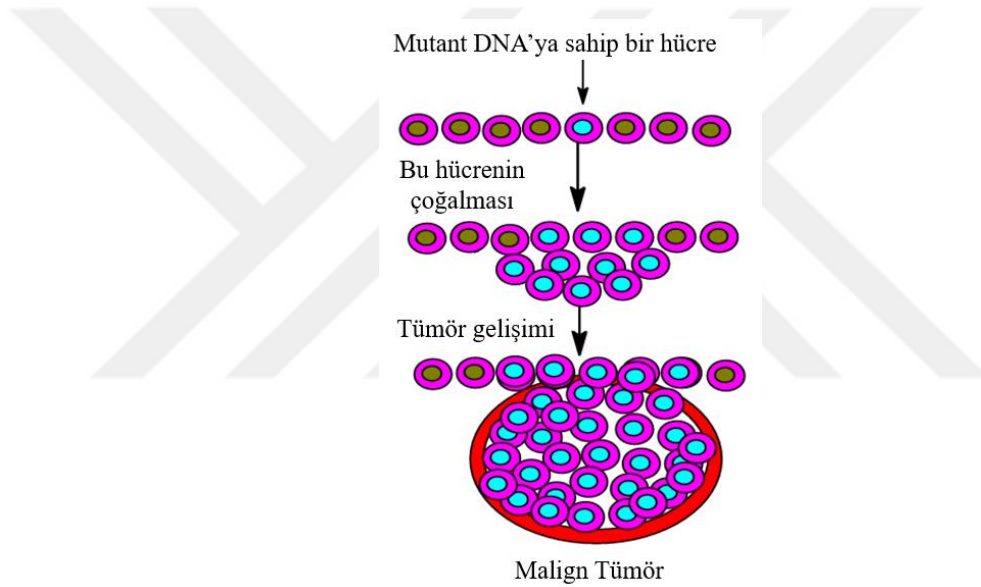
hücre, kendi boyutunu gözden geçirir ve DNA'sının hasar görüp görmediğine karar verir. Hücre uygun boyuta ulaşmayı başaramamış ya da hücre DNA'sı hasar görmüş ise döngü, bu koşullar düzeltilene kadar, durdurulur. Eğer hücre boyutu ve DNA bütünlüğü normal ise, G1/S kontrol noktası geçilmiş olur ve hücre S aşamasına ilerler. İkinci önemli kontrol noktası, mitoz giriş için hücredeki fizyolojik koşulların incelendiği G2/M kontrol noktasıdır. Üçüncü ve en büyük kontrol noktası ise mitoz sırasındadır ve M kontrol noktası olarak adlandırılır. Bu kontrol noktasında, oluşan iğ iplikçikleri sistemi kontrol edilir. Eğer iğ iplikçikleri uygun bir şekilde biçimlendirilmemiş ya da bağlanmaları uygun olmamış ise, mitoz durdurulur.

Eğer DNA replikasyonu, DNA onarımı ya da kromozom düzenlenmesinde hata ya da sapma olursa, koşullar düzenleninceye kadar, hücrenin döngüdeki ilerlemesi durdurulur. Bu sayede hücre, mutasyon sayısını ve biriken kromozomal anomalilerini azaltır. DNA hasarı ya da kromozomal hasar onarımı imkansız derecede ciddiye, hücre apoptoz (programlı hücre ölümü) sürecine uğrar. Apoptoz; hücrenin genetik olarak kontrol edildiği ve sonunda intihar ettiği bir süreçtir. Apoptozda gerçekleşen süreçler sırasıyla, nükleer DNA'nın parçalara ayrılması, hücre içi yapıların bozunması ve hücrenin, apoptotik cisimcikler olarak adlandırılan küçük küresel yapılara bölünmesi şeklindedir. Son aşamada apoptotik cisimcikler, bağışıklık sisteminin fagositik hücreleri tarafından yutulup yok edilirler [25,26].

Hücre döngüsü, döngüyü ilerleten ya da baskılayan genlerin karşılıklı etkileşimleri tarafından düzenlenmektedir. Hücre, bazı genlerden aldığı bilgi ve komutlara uygun olarak çoğalır. Kanser hücrelerinde iki genel gen kategorisi mutasyona uğrar ya da yanlış ifade edilir. Bunlar, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Onkogenlere ait ürünler, hücrenin büyümesini ve bölünmesini ilerletirken; tümör baskılayıcı genlerin ürünleri, hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenler ve apoptoz sürecini başlatır [26,27].

Hücrelerin çoğalması ve ölmesi vücutta sürekli olan bir işlemdir ve bunların zamanını genler belirler. Hücre döngüsünü kontrol eden herhangi bir gende oluşan mutasyon ya da yanlış ifade, birçok yoldan kanserin gelişimine katkıda bulunur. Örneğin, G1/S ya da G2/M kontrol noktalarını denetleyen genler kusurluysa, hücre DNA hasarını onarmadan döngüde ilerlemeye devam edebilir. Bu durum genlerde daha fazla mutasyon birikmesine ve böylece kontrolsüz çoğalma ve metastaza neden olabilir [26,27].

Kanser hücrelerinde genel olarak hücre döngüsündeki sinyal iletim yolağı kusurludur ve bu hücrelerin G0 fazına girebilme yetenekleri yoktur. Hücreler çok fazla çoğalır ya da ölmesi gereken hücrelerin ölümü engellenir. Bu fazla hücreler, çoğalmaya devam ederek tümör olarak adlandırılan bir kitle oluşturabilir. Bu kitlelerin bazıları kanser olmayan iyi huylu (benign) tümörler, bazıları ise kanser olan kötü huylu (malign) tümörlerdir. Tek bir mutasyon, normal bir hücreyi kanserli malignant hücreye ve tümöre dönüştürmeye yeterli değildir. Kanserli hücreler, çok sayıda özgül mutasyon biriktirmiş olan, ortak kalıtsal bir hücreden köken almışlardır [26,27]. Hücre mutasyonu, çoğalması ve malign tümör gelişimi Şekil 2-5'te [28] gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Hücre Mutasyonu, Çoğalması ve Malign Tümör Gelişimi

Kanserlerin %10-15'inin kalıtsal olduğu yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90'lık kısmının ise canlı hücrelerdeki DNA'nın, yaşam boyunca mutajenlere maruz kalması (aşırı güneş ışınları, radyasyon, sigara içme, gıda olarak tüketilen bazı maddeler, bazı bakteri ve virüsler vb.) sebebiyle oluştuğu düşünülmektedir [26,29].

Sonuç olarak kanser, esasında hücre döngüsünde bozulma sebebiyle ortaya çıkan bir genetik kusur hastalığıdır. [26,27].

2.4. Genetik Bilgi ve Transkripsiyon

Yüksek organizmalı canlılarda genetik bilgi, hücre çekirdeğinde bulunan DNA'da saklanır. DNA, kimyasal yapı olarak bir nükleik asit molekülüdür. Nükleik asitler, nükleotit (nitrojenli bir baz + 5 karbonlu şeker + fosfat grubu) denilen temel birimlerden meydana gelir. Nükleotitler, içerdikleri spesifik baz çeşidinin ismiyle anılır. DNA'yı oluşturan nükleotitler adenin (A), guanin (G), sitozin (S) ve timin (T) nükleotitleridir. DNA'daki genetik bilgi, işte bu nükleotit birimlerine ait çeşitli dizilimlerin meydana getirdiği kodlar şeklinde saklanır [26].

DNA'nın belirli görevler yapan kod bölgelerine, gen adı verilir. Herhangi bir gene ait kod, DNA'dan, bir diğer nükleik asit molekülü olan RNA'ya aktarılır. Bu işleme transkripsiyon adı verilir. DNA'nın transkripsiyonuyla sentezlenen RNA, DNA ile benzer kimyasal yapıya sahiptir. Bununla birlikte DNA, karşılıklı iki nükleotit dizisinin oluşturduğu çift sarmal şeklinde iken, RNA genellikle tek bir nükleotit dizisi şeklindedir. DNA ve RNA molekülleri arasındaki diğer farklar; RNA'da, DNA'daki timin (T) nükleotidi yerine, urasil (U) nükleotidinin bulunması ve nükleotit birimlerinde farklı 5 karbonlu şeker (pentoz) içermeleridir. DNA, her bir nükleotit biriminde pentoz olarak deoksiriboz içerir ve bu nedenle deoksiribonükleik asit (DNA) olarak adlandırılır. RNA ise riboz içerir ve ribonükleik asit (RNA) olarak adlandırılır [26].

DNA'dan transkripsiyon işlemiyle RNA moleküllerine aktarılan çeşitli genetik kodlar, RNA'lar tarafından da, translasyon denilen işlemle, genlerin son ürünleri olan protein moleküllerine çevrilir [26].

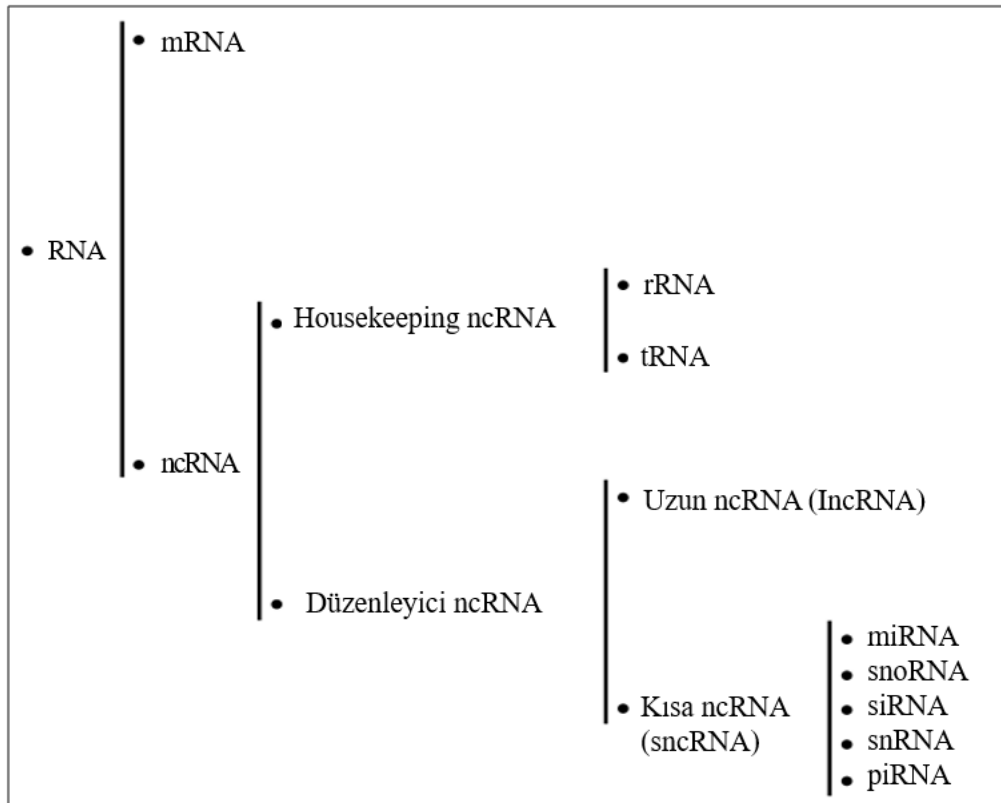
İnsan genomunun (tüm DNA'sının) %75'inden fazlasının transkribe olduğu bilinmektedir. Buna karşılık bu transkriptlerin yalnızca %2'si protein kodlama potansiyeline sahiptir. Protein kodlama özelliğine göre RNA, kodlayan/proteine çevrilen (messenger) RNA (mRNA) veya kodlamayan (non-coding)/ proteine çevrilmeyen RNA (ncRNA) olarak adlandırılır [30]. Bu tez çalışmasında hedef molekül bir tür ncRNA olduğundan, ncRNA'lar hakkında daha ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

2.5. Kodlamayan RNA (ncRNA)

Yeni nesil dizileme yöntemi aracılığıyla gerçekleştirilen çalışmalar, çok hücreli canlıların çoğunun, tek hücreli canlılardan daha az protein kodlayan gen içerdiğini

göstermektedir. Bir çelişki olarak görünen bu durum, “genomun farklılığı ve karmaşık yapısının, protein kodlamayan bölgelerden kaynaklandığı” bulgusuyla açıklanmıştır [31]. Son yıllarda, genomun protein kodlamayan kısmının, normal gelişim, fizyoloji ve hastalıklar için hayati bir işlevsel öneme sahip olduğu daha belirgin hale gelmiştir [32].

ncRNA, fonksiyonlarına göre “housekeeping” ve düzenleyici ncRNA olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Şekil 2-6) [33].



Şekil 2-6: ncRNA'nın Fonksiyonuna Göre Sınıflandırılması

“Housekeeping” ncRNA, taşıyıcı RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA)’yı içerir. Hücrelerde genellikle yapısal olarak ifade edilir ve hayatî hücresel işlevler için gereklidir.

Düzenleyici ncRNA ise, spesifik olarak belirli gelişim aşamalarında ve belirli dokularda veya hastalıklarda ifade edilir. Uzunluklarına göre, 200 nükleotitten kısa olanlar, kısa kodlamayan RNA (sncRNA) ve 200 nükleotitten uzun olanlar, uzun kodlamayan RNA (lncRNA) şeklinde sınıflandırılır. sncRNA’lara örnek olarak miRNA

(mikroRNA), siRNA (small interfering RNA) verilebilir. Bu iki molekülün en önemli işlevleri, RNA girişim (interferans) mekanizmasıyla gen susturulmasında rol oynamalarıdır [33–35]. lncRNA'lar ise çok çeşitli olup, son çalışmalar insan genomu tarafından kodlanan 15.000'den fazla lncRNA'nın olduğunu göstermektedir [36]. Bu tez kapsamında hedef molekül, bir lncRNA olduğundan, aşağıdaki alt başlıkta lncRNA'lar ve bunların kanserle ilişkilerine daha ayrıntılı değinilmiştir.

2.5.1. Kodlamayan Uzun RNA (lncRNA) ve Kanser

lncRNA'lar protein kodlama işlevinden yoksundur, ancak epigenetik, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde görev alırlar. Genel olarak, kromatin yapısını değiştirerek, bir geni veya bir gen ailesini susturarak veya aktive ederek ve bazı durumlarda da tüm kromozomun regülasyonu yoluyla gen ifadesini düzenlerler. lncRNA'ların sitoplazmada da birçok işlevi vardır; mRNA stabilitesini modüle edebilir veya hedef mRNA'ların translasyonunu düzenleyebilirler. Protein, RNA ve DNA gibi bileşenlerle etkileşerek işlevlerini yerine getirirler. RNA-protein, RNA-RNA ve RNA-DNA etkileşimleriyle kompleks oluşturarak farklı işlevleri yerine getirmek için birleşebilirler. lncRNA işlevlerinin birçoğu transkripsiyon ile ilişkilidir [37].

lncRNA'lar özellikle çekirdeğin kromatin bölümlerinde yoğun haldedirler. Ancak sitoplazmada da bulunabilir ve mitokondri gibi diğer hücre içi bölmelere de lokalize olabilirler [37]. Sitoplazmik pek çok lncRNA'nın ribozomda lokalize olduğu bildirilmiştir [38]. Protein kodlayan genlerle kıyaslandığında, doku veya hücre tipine daha özgün olarak ve genellikle düşük seviyelerde ifade edilirler. lncRNA'ların hücre proliferasyonu, morfogenez, pluripotens, gelişim, nöronal süreçler ve gametogenez gibi çok çeşitli biyolojik süreçlere katıldığı bildirilmiştir [36].

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, bu transkriptlerin karsinogenezdeki rolüne dikkat çekmiştir. İnsan genomunda kanserle ilişkili biyolojik süreçlere katılan çok sayıda lncRNA tespit edilmiştir. lncRNA mutasyonları, düzensizliği veya anormal ifadesinin kansere neden olabileceği düşünülmektedir.

Bir çalışmada, ameliyatla alınan erken evre meme kanseri dokusunda, kanserle ilişkili iyi incelenmiş bir lncRNA olan, HOTAIR (HOX Antisens İntergenik RNA)'in

aşırı ifadesi tespit edilmiş ve bunun metastatik progresyon ve genel sağkalım için oldukça önemli bir parametre olduğu görülmüştür [39]. Daha sonraki çalışmalarda, lncRNA HOTAIR düzensizliğinin, 26 tip insan tümöründe kanser progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [40,41]. Ayrıca, lncRNA HOTAIR'in akciğer kanseri hücrelerinde çoğalma, invazyon, metastaz ve ilaç direncini arttırdığı bildirilmiştir [42]. Başka bir lncRNA olan MALAT 1 (Metastaz İlişkili Akciğer Adenokarsinom Transkript 1)'in, birçok kanser tipiyle (akciğer, meme, kolon ve hepatokarsinoma) ilişkili olduğu gösterilmiştir [43].

İnsan prostat kanserindeki genlerin diferansiyel ekspresyon analizi, DD3 olarak da anılan PCA3'ü, prostat kanserinin spesifik bir biyobelirteci olarak tanımlamıştır. Kapsamlı bir açık okuma çerçevesinin (bir genin asıl kodlayan bölgesi) bulunamaması, PCA3'ün kodlamayan bir RNA olarak işlev görebileceğini göstermektedir [44]. PCA3, 2012'de Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) tarafından prostat kanserinin tanısı için onaylanmış ve böylece FDA tarafından onaylanan RNA temelli ilk test olmuştur [45]. Prostat kanserinin idrardaki biyobelirteci olarak, prostat spesifik antijen (PSA) testi ile karşılaştırıldığında gelişmiş spesifitesi, gelişmiş pozitif-negatif tahmin edici değeri ile prostat kanseri için faydalı ve invazif olmayan bir test haline gelmiştir [46]. Benzer şekilde, mide salgılarının analizlerinden elde edilen veriler doğrultusunda, lncRNA-AA174084'ün mide kanserinin erken ve ayırıcı tanısı için potansiyel bir biyobelirteç olabileceği ve aynı zamanda bu lncRNA'nın plazma düzeyinin, prognozu değerlendirmede kullanılabileceği bildirilmiştir [47]. Genom analizine yönelik son yaklaşımlar, normal dokularda ve aynı organın tümör dokularında, farklı olarak kopyalanan birçok lncRNA'nın tanımlanmasını sağlamıştır [48,49]. Bu durum spesifik kanser histolojisine ilişkin biyobelirteçlerin daha fazla gelişmesi için muazzam bir potansiyel sunmaktadır [41].

Tablo 2-1'de [41], kansere bağlı genomik değişikliklerle ilişkili olan, tanıda, prognozda veya kişiselleştirilmiş tedavide kullanılan ve kanserli dokularda varlığı gösterilen lncRNA'lara ait bir liste sunulmuştur. Sonuç olarak "Kanserde lncRNA", son zamanlarda en çok çalışılan konulardan biri olmuştur ve kanser tedavisinde güçlü bir potansiyel vadetmektedir.

Tablo 2-1: lncRNA ve Kanseri İlişkisi

Kansere bağı genomik değişiklikle ilişkili olan lncRNA		
lncRNA	Kanser tipi	Genomik değişiklik
PT-1	Kolon	8q24 amlifikasyonu
PCAT-1	Prostat	8q24 tek nükleotit polimorfizmi
CCAT-2	Kolon	8q24 tek nükleotit polimorfizmi
PTCSC3	Tiroit	Rs944289
HULC	Karaciğer	Rs7763881
ANRIL	Çeşitli kanser türleri	9p21.3 tek nükleotit polimorfizmi
TERC	Oral kavite	3q26 amlifikasyonu
GAS5	Karaciğer	Rs145204276
SAMMSON	Melanom	3p13-3p14
Kanser dokularında görülen diğer lncRNA'lar		
lncRNA	Kanser tipi	
PCNA-AS1	Karaciğer	
Sox2OT	Akciğer	
lncARN-ERIC	Uterus	
CAI2	Beyin	
GHET1	Mide	
HIF1A-AS2	Meme, böbrek	
XIST	Yumurtalık, meme, böbrek, kolon	
NCRNA	Kolon, mesane, beyin	
SAR-1/SR1	Meme	
PTEP1	Akciğer, melanom, uterus, lösemi	
TUC338	Karaciğer	
asNOS2A	Beyin	
UCA1	Mesane, dil, meme, kolon	
PCGEM1	Prostat	
LOC285194	Kemik, kolon, özofagus	
PRNCR1	Prostat, kolon	
MALAT1	Çeşitli kanser türleri	

Tablo 2-1: lncRNA ve Kanseri İlişkisi (devam)

Tanımda kullanılan lncRNA		
lncRNA	Kanser tipi	Örnek alınan doku
H19	Mide	Kan
HULC	Karaciğer	Kan
AA174084	Mide	Mide salgısı
PCA3	Prostat	İdrar
SeCATs	Lösemi	Tümör
SPRY-IT1	Melanom	Tümör
Prognozda kullanılan lncRNA		
lncRNA	Kanser tipi	Sağladığı bilgi
FAL1	Yumurtalık	Kötü prognoz
HOTAIR	Meme	Artmış metastaz riski
HOTTIP	Karaciğer	Artmış progresyon
MEG3	Menenjiyom	Derecesi ile ilişkili
NBAT-1	Nöroblastom	İyi prognoz
NKILA	Meme	Azalmış metastaz riski
SCHLAP1	Prostat	Artmış metastaz riski
Kişiselleştirilmiş tedavi için lncRNA		
lncRNA	Kanser tipi	Terapötik ajan
CCAT1	Kolon	BET inhibitörleri
HOTAIR	Yumurtalık	Platinyum temelli-kemoterapi

2.5.2. lncRNA-UCA1 ve Akciğer Kanseri İlişkisi

İnsanlarda görülen tüm kanser türleri içinde, kadın-erkek her iki cinsiyet beraber değerlendirildiğinde, görülme sıklığı ve ölüm riski açısından ilk sırada yer alan kanser türü, akciğer kanseridir [50]. Bu nedenle tüm kanser türlerinde olduğu gibi akciğer kanserinde de erken tanı için özgül belirteçlerin tanımlanması çok önemlidir.

İlk olarak insan mesane karsinomunda tespit edilmiş olan lncRNA-UCA1'in bazı kanser türlerinde yüksek oranda eksprese olduğu ve malign tümörlerin ortaya çıkması ve gelişmesinde önemli bir rol oynadığı keşfedilmiştir [10,11].

Wang vd. [10], küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarından alınan tümör dokuları ve plazmalarda, lncRNA-UCA1 ekspresyon seviyelerini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda KHDAK dokularında lncRNA-UCA1 ekspresyonunun, komşu tümörsüz dokulardakine göre belirgin olarak arttığı ve plazma ile tümör dokularındaki lncRNA-UCA1 seviyeleri arasında güçlü bir korelasyon gözlemlendiği belirtilmiştir. Aynı zamanda, KHDAK hastalarında lncRNA-UCA1'in prognostik rolü için genel sağkalım analizi yapılmış ve görülmüştür ki, yüksek lncRNA-UCA1 ekspresyonuna sahip KHDAK hastalarında genel sağkalım eğilimi, düşük lncRNA-UCA1 ekspresyonuna sahip hastalardakine göre daha kötüdür. Bu durum, KHDAK hastalarında lncRNA-UCA1 ekspresyonunun prognostik bir belirteç olabileceği anlamına gelmektedir. lncRNA-UCA1 seviyesine ilişkin, plazma ve tümör dokuları arasında gösterilen korelasyon sayesinde de prognozun plazma verilerinden tahmin edilebileceği bildirilmiştir [10].

lncRNA-UCA1 ve KHDAK ile ilgili bir başka çalışma, Nie vd. [11] tarafından gerçekleştirilmiştir. Wang vd.'nin [10] yaptıkları çalışmanın sonuçlarına paralel olarak, KHDAK dokularında lncRNA-UCA1 seviyesinin, normal komşu dokulardakine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca beş adet insan KHDAK hücre hattı (A549, H1299, H446, H460, and NCI-H1650) ve insan sağlıklı akciğer epitelyal hücrelerinde (BEAS-2B), lncRNA-UCA1 ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. KHDAK hücre hatlarındaki lncRNA-UCA1 ekspresyon seviyelerinin, insan sağlıklı akciğer epitelyal hücre hattındakine kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir [11]. Çalışmada yer alan hastalar, tümör dokularındaki lncRNA-UCA1 ekspresyon seviyeleri yüksek ve düşük olanlar şeklinde iki gruba ayrılmıştır. Yüksek lncRNA-UCA1 seviyesinin tümör boyutu ile korelasyon gösterdiği ve kötü prognozla da ilişkili olduğu görülmüştür. lncRNA-UCA1'in KHDAK hücre hatlarında, bu hücrelerin proliferasyonunu teşvik ettiği, bunu spesifik miRNA'lara karşı, rekabetçi endojen RNA'lar olarak fonksiyon göstermek suretiyle gerçekleştirdiği belirtilmiştir [11]. Kanserli dokularda, tümör baskılayıcı fonksiyona sahip bir miRNA olan, miR-193a-3p'nin ekspresyonunun düşmesinde lncRNA-UCA1'in rol oynayabileceği bildirilmiştir. Ayrıca dışardan eklenen miR-193a-3p'nin, kanser hücrelerinin büyümesini engellediği görülmüştür. Yani artmış lncRNA-UCA1, miR-193a-3p'ye kompetitif bağlanmayı arttırarak bu miRNA'nın tümör baskılayıcı fonksiyonunu engellemekte ve bu şekilde tümör hücrelerinin büyümesini teşvik etmektedir [11].

Wu vd. [12]'nin yaptıkları çalışmada da, ilk olarak lncRNA-UCA1'in akciğer kanserindeki rolü doğrulanmış ve lncRNA-UCA1'in baskılanmasının akciğer kanseri hücrelerinde (SK-MES-1 ve H520), hücre çoğalması ve göçünü engellediği bildirilmiştir. Daha sonra, miR-193a'nın akciğer kanserinde antitümör rolü olduğu ortaya koyulmuş ve lncRNA-UCA1'in miR-193a'ya bağlanarak, miR-193a'nın antitümör etkisini önlediği gösterilmiştir [12].

Jun vd. [14] tarafından yapılan çalışmada, altı adet kanserli akciğer hücre hattında (HCC827, HCC2935, SK-LU-1, NCI-H23, NCI-H1563, NCI-H1651) ve bir adet insan sağlıklı akciğer hücre hattında (RL-65), lncRNA-UCA1 ekspresyon seviyelerine bakılmış, kanserli hücre hatlarında bu seviyenin, sağlıklı hücre hattındakinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu veriden yola çıkılarak, lncRNA-UCA1'in, akciğer kanserinin tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olabileceği bildirilmiştir. Kanserli hücre hattında, lncRNA-UCA1 seviyesi, siRNA kullanılarak baskılandığında, kanser hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve göçünün de inhibe edildiği görülmüştür. Bunun arkasındaki mekanizma olarak ise, kanserli akciğer hücrelerinde lncRNA-UCA1'in baskılanmasına bağlı, apoptozun tetiklendiği bildirilmiştir. Apoptoz, çeşitli boyama yöntemleri kullanılarak mikroskopik olarak gösterilmiştir. Ayrıca, lncRNA-UCA1 seviyesinin baskılanmasının, MAPK 1 (Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz 1)'in ekspresyonunu düşürdüğü, bunun da akciğer kanser hücrelerinin proliferasyon, göç ve invazyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir [14].

Aynı araştırmacı grubu tarafından, farklı akciğer kanser hücre hatları (SK-MES-1, DMS-79, DMS-53, SHP-77, A549, A427, LA-4) ve sağlıklı akciğer hücre hattı (MRC5) kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise [13], önceki çalışma ile paralel olarak, lncRNA-UCA1 ekspresyon seviyelerinin, kanserli hücrelerde sağlıklı hücre hattındakine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Kanserli hücre hattında, lncRNA-UCA1 seviyesi, siRNA kullanılarak baskılandığında, kanser hücrelerinin proliferasyon hızının azaldığı görülmüştür. Bunun altındaki mekanizma olarak, apoptotik hücre ölümünün aktive olduğu gösterilmiştir. Hücre döngüsü analizleri de gerçekleştirilmiş ve apoptoza, lncRNA-UCA1'in baskılanmasına bağlı hücre döngüsünün G2/M kontrol noktasında durdurulmasının sebep olduğu bildirilmiştir. lncRNA-UCA1'in baskılanmasının, kanser hücrelerinde hücre invazyonu ve göçünü de inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca daha önce yapılan bir çalışmadan yola çıkılarak, kullanılan kanser hücre hatları ile sağlıklı hücre

hattında miR-143 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Kanseri hücrelerinde, sağlıklı hücrelerdekine göre miR-143 seviyesinin azaldığı ve lncRNA-UCA1 baskılandığında ise, miR-143 seviyesinde önemli bir artış olduğu bildirilmiştir. Dahası, kanserli hücrelerde miR-143 taklit molekülleri kullanıldığında apoptozun arttığı, hücre göç ve invazyonunun ise baskılandığı görülmüştür. Yani miR-143'ün aşırı ifadesinin hücre büyümesine yönelik inhibisyon etkisi, lncRNA-UCA1 baskılandığındakine benzerdir. Ayrıca miR-143'ün aşırı ekspresyonu veya lncRNA-UCA1'in baskılanmasının, MAPK 1 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum lncRNA-UCA1'in akciğer kanser hücrelerinin proliferasyon, göç ve invazyonunu, miR-143 ve MAPK 1'in ekspresyonu üzerinden düzenlediğini ifade etmektedir. Bu sonuçlar, lncRNA-UCA1'in, akciğer kanserini yönetmede potansiyel bir aday olduğunu göstermektedir. [13].

lncRNA-UCA1'in KHDAK'nde kullanılan ilaçlara karşı, kanser hücrelerinin direncini arttırdığına dair çalışmalar da mevcuttur. Sisplatine karşı hassas ve dirençli akciğer kanser hücre hatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, lncRNA-UCA1'in dirençli hücrelerde daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu ekspresyon baskılandığında ise, ilaca dirençli kanser hücrelerinin ilaca karşı hassasiyet kazandığı, göç ve invazyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir [51]. KHDAK tedavisinde kullanılan, epidermal büyüme faktörü reseptör inhibitörlerinden biri olan gefitinib ilacına olan direnç ile ilgili gerçekleştirilen farklı çalışmalarda ise, lncRNA-UCA1'nin gefitinib kemoterapisine dirençli hastalarda ve gefitinibe dirençli hücre hatlarında daha fazla eksprese olduğu ve lncRNA-UCA1 baskılandığında, kanser hücrelerinin ilaca karşı direncinin düştüğü gösterilmiştir [52–54].

Yukardaki literatür çalışmalarının ışığında bu tez çalışmasında, akciğer kanser hücrelerinde, lncRNA-UCA1 ifadesinin baskılanması hedeflenmiştir.

2.6. Gen Tedavisi

FDA'ya göre gen tedavisi; bir kişinin genlerini, hastalığı tedavi etmek veya iyileştirmek için değiştiren bir tekniktir. Gen tedavisinde, hastalığa neden olan bir genin sağlıklı bir kopyasıyla değiştirilmesi, düzgün çalışmayan hastalığa neden olan bir genin etkisiz hale getirilmesi veya bir hastalığın tedavisine yardımcı olmak için vücuda yeni veya değiştirilmiş bir genin sokulması gibi değişik yaklaşımlardan yararlanılabilir [55].

Gen tedavileri hücre tipine göre, germ (eşey) hücrelerine veya somatik hücrelere (vücut hücrelerine) yapılan tedaviler olarak farklılık gösterir. Çoğu ülkede etik olarak gelecek kuşakları etkileme yetisi nedeniyle eşey hücre serisinde gen tedavisi yasaktır. Somatik gen tedavisinde ise, kişinin genomu değişikliğe uğramakta ancak bu değişim gelecek kuşaklara aktarılmamaktadır. Günümüzdeki tüm gen tedavisi denemeleri ve protokolleri somatik hücre serisi tedavileri içindir [56].

Genlerin hücreye aktarılması, laboratuvar ortamında (*ex-vivo*) veya hasta vücudunda (*in- vivo*) gerçekleştirilebilir. *Ex-vivo* aktarımda hücreler, hastadan alınarak hücre kültürü ortamında çoğaltılır ve istenen gen aktarılır. Gen aktarımının gerçekleştiği hücreler seçilir, hücre kültüründe *in vitro* olarak çoğaltılır ve hastaya verilir. Alıcı hücrelerin *in vitro* kültürü yetersiz olduğunda veya kültürü yapılan hücrelerin hastaya geri verilmesi etkili bir şekilde gerçekleştirilemediğinde ise *in-vivo* aktarıma başvurulur. Aktarılabacak gen doğrudan hedef dokuya veya genel dolaşıma verilebilir ancak aktarım için kullanılan vektör sadece hedeflenen hücreler tarafından alınacak şekilde veya etkisini sadece hedeflenen hücrelerde gösterecek şekilde tasarlanmış olmalıdır [56].

Gen tedavisinde, hastalığın gelişmesinden sorumlu, kusurlu (defektif) genleri düzeltmek için, “etkin madde” niteliğinde olan nükleik asit yapılı moleküller kullanılmaktadır. Bunlar, plazmidler, antisens oligonükleotitler, aptamerler, DNAzimler (ribozim analogları) gibi DNA-bazlı moleküller ile, RNA aptamerler, antisens RNA, ribozimler, siRNA, miRNA gibi RNA-bazlı moleküllerdir. Gen tedavisinin başarısı, nükleik asit yapılı molekülün hedef hücreye ulaştırılması ve etkili ekspresyonuna bağlıdır. Bu sayede eksik proteinin vücutta üretilmesi, tedavi edici proteinlerin ekspresyonunun artırılması ya da zararlı proteinlerin üretiminin inhibisyonu (gen susturma yöntemi) hedeflenir [8].

2.6.1. Gen Tedavisinin Tarihçesi

İlk klinik gen transfer denemesi 1970 yılında Stanfield vd. [57] tarafından virüs aracılı olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma, hücresel arjinaz enzim aktivitesi yetmezliğine ve yüksek serum arjinin seviyesine (hiperarjininemi) sahip iki çocuk üzerinde gerçekleştirilmiştir. Araştırmacıların önceki çalışmalarından aldıkları *in vitro* sonuçlar [58], *Shope Papilloma* virüsünün serum arjinin seviyesini düşürdüğü yönünde olduğundan araştırmacılar (yanlışlıkla), bu virüsün arjinaz genini taşıdığı kanısına

varmışlardır. Bu nedenle bahsedilen hastalara yüksek miktarlardaki *Shope Papilloma* virüsü, sistemik enjeksiyonla verilmiştir. Böylelikle virüsün, taşıdığı sanılan arjinaz genini aktarması ve hastalarda bu genin ekspresyonu sonucu üre döngüsünün normale döndürülmesi hedeflenmiştir. Ancak ne hastaların arjinin seviyelerinde ne de hiperarjineminin klinik seyrinde bir değişiklik gözlenmiştir. Gelişen teknoloji sayesinde, daha sonraları *Shope Papilloma* virüs genomunun sekanslanmasıyla virüs genomunda arjinaz kodlayan genin bulunmadığı ortaya çıkmıştır. Buradan çıkarılacak en ilginç sonuç, hatalı bir deneysel tasarım ve başarısız bir klinik çalışmadan ziyade, Stanfield vd.'nin insan hücrelerine tedavi amaçlı virüs aracılı gen naklini öngörebilmesi olmuştur [57,59].

Stanfield ve ekibinin insan gen tedavisinde attıkları ilk adım, diğer bilim insanlarının bu konuya daha çok ilgi göstermesini sağlamıştır. 14 Eylül 1990'da FDA tarafından ilk kez, insanlar üzerinde terapötik amaçla uygulanacak bir gen tedavi denemesi onaylanmıştır. Çalışmada, ağır immün hasara yol açan monogenik bir hastalık olan adenzin deaminaz yetmezliğine sahip iki çocuktan, beyaz kan hücreleri izole edilmiştir. İzole edilen T lenfosit hücrelerine retrovirüs aracılı olarak adenzin deaminaz geni aktarılmıştır. Hastalarda T hücrelerinin sayısı gelişen immün yanıtı rağmen normal seviyelere ulaşmıştır. Bununla birlikte hastalardan birinde, polietilen glikol adenin deaminaz takviyesi yapılarak enzim tedavisine devam ediliyor olması, gen tedavisinin etkinliği üzerine tartışmalara yol açmıştır. Yine de yapılan gen tedavi işlemi birçok bilim adamı tarafından, hem güvenlik kriterlerine uygun hem de adenzin deaminaz yetmezliği hastalarında uygulanabilecek etkin bir tedavi yöntemi olarak kayıtlara geçmiştir. Böylece farklı hastalıklar için gen tedavisi çalışmaları dünya genelinde, (aşağıda sözü edilen trajik olay yaşanana kadar) artış göstermiştir [60].

1999 yılında, gen tedavisiyle ilgili en kötü senaryo gerçekleşmiştir. Metabolik bir hastalık olan ornitin transkarbamilaz yetmezliğine sahip, 18 yaşındaki Jesse Gelsinger'a, adenoviral vektörler aracılığıyla gen aktarımı yapılmıştır. Fakat hastanın immün sistemi, yüksek doz adenovirüs uygulamasının hemen ardından, şiddetli bir inflamasyona neden olmuş ve hasta çoklu organ hasarı sonucu dört gün içerisinde hayatını kaybetmiştir. Bu vakanın önemi, tedavi amaçlı kullanılan viral vektörün, ölüm sebebi olarak nitelendirilebileceği ilk vaka olmasından ileri gelmektedir. İnsandaki bu gen tedavi denemesinin ardından, uygulanan yöntemin güvenilirliği konusunda tartışmalar başlamış ve FDA onaylı gen tedavi faz denemeleri kısa bir süreyle duraksamıştır. Günümüzde, gen

tedavi çalışmalarının pek çoğu da, tez çalışmasında olduğu gibi, gen naklinde kullanılacak uygun vektörlerin geliştirilmesi üzerinedir [60,61].

2000 yılında X'e bağlı ağır kombine immün yetmezliğin nadir bir türünden (SCID-X1) muzdarip çocukların başarılı tedavisine ilişkin Fransa'dan gelen ilk raporla, gen tedavisine ilişkin umut ve heyecan yeniden artmıştır. Ancak 2002 yılının sonunda, on çocuktan ikisi (her ikisi de yüksek düzeyde hücre ile tedavi edilmişti) lösemi-benzeri bir klonal lenfosit proliferasyonu geliştirdiğinde, bu heyecan yerini alarma bırakmıştır. Bir yandan hastalar tedavi edilirken, diğer yandan bu durumların nedeni araştırılmış ve bu sırada çalışma durdurulmuştur. Aynı zamanda Fransa ve Amerika'da yürütülen benzer diğer çalışmalar da durdurulmuştur. Daha sonra, bu proliferasyon durumunun retrovirüs vektör entegrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. SCID-X1'in tedavisi için Birleşik Krallık'ta benzer bir yaklaşımla, fakat farklı bir protokolle gerçekleştirilen çalışmanın ise devam etmesine izin verilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Aynı şekilde, Avustralya'daki benzer bir denemede de SCID-X1'e sahip bir çocuğun tedavisi gerçekleştirilmiştir. Fransa'daki deneme ise daha düşük dozlarda, modifiye edilmiş hücre kullanımının olduğu revize bir protokolle yeniden başlatılmıştır. Ocak 2005'te üçüncü bir çocuk, proliferatif bir durum geliştirmiştir. Bu hasta ve önceki iki hastadan biri kemoterapi tedavisine iyi yanıt vermiştir. Fakat, diğer hasta lösemi-benzeri durum için kemoterapi tedavisine yanıt vermemiş ve Ekim 2004'te hayatını kaybetmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada tedavi edilen diğer tüm hastalar, bağışıklık yetersizliklerinin düzeltilmesiyle, gen terapisinden fayda görmüştür. Fakat görülen ciddi yan etkiler, gen tedavisinin geleceği hakkında küresel bir tartışmayı ateşlemiştir. Avrupa ve ABD'deki araştırmacıları ve ilgili cemiyetleri, gen tedavisinin ve özellikle retroviral vektör kullanımının, risk/fayda oranını çok ciddi derecede incelemeye yöneltmiştir [62].

2.6.2. Onaylı Gen Tedavi Ürünleri

İlk gen tedavi ürünü, 2003 yılında Çin İlaç ve Gıda Dairesi tarafından baş-boyun kanserlerinin tedavisi için onaylanan Gendicine™ (rekombinant insan p53 adenovirüs)'dir. Shenzhen SiBiono GeneTech Co. Ltd. tarafından geliştirilen ürün, 2004 yılında pazara girmiştir [63]. Gendicine™, terapötik p53 geni ve onu taşıyan araç olan rekombinant adenoviral vektörden oluşmaktadır. Bu adenoviral vektörün E1 bölgesi silinmiştir. Bu silinme, virüsün enfekte etme özelliğini sadece bir döngü ile

sınırlandırmaktadır. Yani virüs, replike olma özelliğinden yoksundur. Konakçı DNA'sına da entegre olmaz. p53 geni ise, normal hücrelerde yaygın olarak bulunur ve insan vücudunda en çok incelenen tümör baskılayıcı genlerden biridir. Genom stabilitesini korumadaki önemi nedeniyle “genom gardiyanı” olarak adlandırılmıştır. Gendicine™ uygulamasından sonra adenoviral partikül, hedef tümör hücrelerini enfekte eder ve terapötik p53 genini taşıyan adenovirüs, p53 geninin transkripsiyonu ve translasyonu için, genomunu sitoplazma ve hücre çekirdeğine iletir [64]. İkinci gen tedavi ürünü ise, Shanghai Sunway Biotech Co. Ltd. tarafından geliştirilen ve yine Çin İlaç ve Gıda Dairesi tarafından nazofarinks kanserinin tedavisinde kemoterapi ile birlikte kullanılmak üzere 2005 yılında onaylanan Onkorine™'dir. Bu ürünlerdeki adenovirüs Gendicine™'in aksine, koşullu replike olabilmektedir. Bu koşullu replikasyon, E1B 55K geninin silinmesiyle sağlanmıştır. Bu genin silinmesiyle virüs, konağın enfeksiyona karşı temel bir savunma mekanizması olan p53 proteinine bağlanamaz ve bu proteini inaktive edemez. Yani E1B 55K aktivitesi yokluğunda, normal hücrelerdeki replikasyon bloke edilir, yalnızca p53-kusurlu hücrelerde replikasyona izin verilir. Bu viral proliferasyon, bir kanser tedavisi olarak, p53-kusurlu kanser hücrelerinde onkolitik etkiyi sağlar [65]. Avrupa İlaç Ajansı tarafından, onaylanan ilk gen tedavi ürünü ise, Glybera™'dır. Amsterdam Molecular Therapeutics tarafından geliştirilen ürün, ailesel lipoprotein lipaz yetersizliği (LPLD) tanısı konan yetişkin hastaların tedavisi için 2012 yılında onay almıştır. Hasta sayısı düşük olduğu için, LPLD “nadir hastalık”, Glybera™ da “yetim ilaç” olarak kabul edilmiştir. Etkin maddesi olan alipogen tiparvovek, lipoprotein lipaz enzim genini taşıyan bir adeno-ilişkili virüs (AAV)'tür. Bu virüs, kendi kopyalarını yapamayacak ve böylece insanlarda enfeksiyonlara neden olmayacak şekilde tasarlanmıştır. Hastanın kaslarına enjekte edilmesini takiben, kas hücrelerine lipoprotein lipaz enziminin ürettirilmesi ve böylece bu enzim eksikliğinin giderilmesi amaçlanmıştır [66]. Şu anda ruhsat sahibi olan uniQure firması, ilaca olan talep eksikliği sebebiyle 2017'de geçerlilik süresi dolan ürün ruhsatı için yenileme başvurusu yapmadığından, ruhsat geçerli değildir [67]. Yukarıda bahsedilen ve diğer bazı gen tedavi ürünlerine ait özet bilgiler Tablo 2-2'de [68] sunulmuştur.

Tablo 2-2: Bazı Gen Tedavi Ürünleri

Etkin Madde	Ticari İsim	Etki Mekanizması	Onaylı Endikasyon	Uygulama Yolu	Ülke/Firma Adı	Onay Tarihi	Onaylayan Kurum
p53 genini taşıyan adenoviral vektör	Gendicine	Adenoviral vektör aracılı tümör baskılayıcı p53 geninin ekspresyonu	Baş-boyun hücre karsinoması	Intratümöral enjeksiyon; intrakaviter veya intravasküler enjeksiyon	Çin / Shenzhen SiBiono GeneTech Co. Ltd.	2003	NMPA
Genetik olarak modifiye edilmiş adenovirüs	Onkorine	p53 geninin kusurlu olduğu hücrelerde onkolitik etki	Kemoterapi ile birlikte nazofarenks karsinomu	Intratümöral enjeksiyon	Çin / Shanghai Sunway Biotech Co. Ltd.	2005	NMPA
Alipogen tiparvovek (lipoprotein lipaz enzim genini taşıyan bir AAV)	Glybera	AAV vektör ile lipoprotein lipaz gen ekspresyonu	Ailesel lipoprotein lipaz yetersizliği (LPLD)'ne bağlı gelişen pankreatit	Intramuskuler enjeksiyon	Hollanda / uniQure	2012	EMA
Talimogen laherparepvek (zayıflatılmış ve genetik olarak modifiye edilmiş herpes simplex virüs 1)	Imlygic	Melanoma hücrelerinde onkolitik etki	Melanoma	Intralezyonel enjeksiyon	Amerika / Amgen	2015	EMA FDA
Retroviral vektör ile transdükte edilmiş, adenoazin deaminaz cDNA dizisini taşıyan otolog CD34+ hücreleri	Strimvelis	Transdükte CD4+ hücrelerinden, adenoazin deaminaz enzimi sentezleyen lenfosit üretimi	Adenoazin deaminaz eksikliğine bağlı ağır kombine immün yetmezlik	Intravenöz infüzyon	İngiltere / Orchard Therapeutics	2016	EMA

Tablo 2-2: Bazı Gen Tedavi Ürünleri (devam)

Etkin Madde Adı	Ticari İsim	Etki Mekanizması	Onaylı Endikasyon	Uygulama Yolu	Ülke/Firma Adı	Onay Tarihi	Onaylayan Kurum
Tisagenlecleucel (Lentiviral vektör ile transdükte edilmiş otolog T- hücreleri)	Kymriah	Kimerik antijen reseptörü üreten T hücrelerinin (CAR-T), bu reseptör vasıtasıyla kanser hücrelerindeki CD19 antijenine bağlanarak bu hücreleri öldürmesi	B hücreli akut lenfoblastik lösemi (çocuk ve 25 yaşına kadar genç yetişkinlerde) / Diffüz büyük B hücreli lenfoma (yetişkinlerde)	Intravenöz infüzyon	İsviçre / Novartis	2017 2018	FDA EMA
Axicabtagen ciloleucel (Retroviral vektör ile transdükte edilmiş otolog T- hücreleri)	Yescarta	Kimerik antijen reseptörü üreten T hücrelerinin (CAR-T), bu reseptör vasıtasıyla kanser hücrelerindeki CD19 antijenine bağlanarak bu hücreleri öldürmesi	Diffüz büyük B hücreli lenfoma ve Primer mediastinal B hücreli lenfoma	Intravenöz infüzyon	Amerika / Kite Pharma	2017 2018	FDA EMA
Voretigen neparvovek (RPE65genini taşıyan AAV)	Luxturna	RPE65 genini taşıyan AAV'nin retina hücrelerine all-trans retinil izomeraz enzimini sentezletmesi	Kalıtsal retinal distrofi	Subretinal enjeksiyon	Amerika / Spark Therapeutics	2017 2018	FDA EMA

NMPA: Çin İlaç ve Gıda Dairesi; FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi; EMA: Avrupa İlaç Ajansı

2.6.3. Kanserde Gen Tedavi Yaklaşımları

Kanserde gen tedavisinin amacı, sağlıklı hücrelere müdahale etmeden kanser hücrelerini yok etmektir. Burada hedeflenen, kanser hücrelerine apoptozis kararını verdirecek mekanizmanın harekete geçirilmesidir. Bunun için, onkogen aktivitesinin baskılanması, tümör baskılayıcı gen aktivasyonu, apoptozun indüklenmesi, immünoterapi, onkolitik viroterapi, CAR-T hücre terapisi, anti-anjiogenik tedavi, intihar gen terapisi ve antisens teknolojisi gibi farklı gen tedavi yaklaşımlarından yararlanılır [69]. Bu tez çalışmasında, akciğer kanserinde ekspresyonu arttığı bilinen lncRNA-UCA1'in, antisens teknolojisi aracılığıyla parçalanması hedeflendiğinden, bu teknoloji hakkında ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

2.6.4. Antisens Teknolojisi

Gen tedavisi yaklaşımlarından biri olan antisens teknolojisi, genleri post-transkripsiyonel olarak susturmak için uygulanan bir yöntemdir [70]. RNA mesajının kısmen veya tamamen ortadan kaldırılmasına bağlı olarak bu kesinti, sırasıyla “knock down” veya “knock-out” olarak adlandırılır. Bu durum, araştırmacıların o genin işlevini belirlemesine olanak tanır [71].

Gen transkripsiyonu sırasında, DNA'nın ikili zinciri kısmen çözülür ve 2 tamamlayıcı iplik olan “sense” ve “antisens” iplikleri birbirinden ayrılır. DNA'nın “antisens” zinciri, protein ürününe çevrilen mesajcı RNA (mRNA)'yı oluşturmak için, kalıp zincir olarak kullanılır. Bu mRNA, “sense” oryantasyonundadır. Bu nedenle “antisens” ajanlar, tamamlayıcı baz çiftleriyle (Watsons-Crick baz eşleşmesi sistemiyle) mRNA'ya bağlanarak translasyonu, yani protein oluşumunu önleyebilirler. Translasyonun engellenmesi, antisens ajan ile hedef RNA arasındaki etkileşim sonucu ribozomun sterik blokajıyla veya bağlı mRNA'nın RNaz H enzimi aracılığıyla yok edilmesiyle gerçekleşir. Bu nedenle uygun “antisens” nükleotit dizilerinin seçilmesiyle, bir hücrede, diğer hücresel bileşenleri doğrudan etkilemeden, hemen hemen her gen ürününün ekspresyonunu inhibe etmek mümkündür [72].

Antisens teknolojisi, gen işlevselleştirilmesi ve hedef validasyonu alanlarında alternatif teknolojilerle kıyaslandığında; geniş uygulanabilirlik, dizi bilgisinin doğrudan kullanımı, düşük maliyetle hızlı gelişebilme, yüksek başarı olasılığı ve yüksek seçicilik

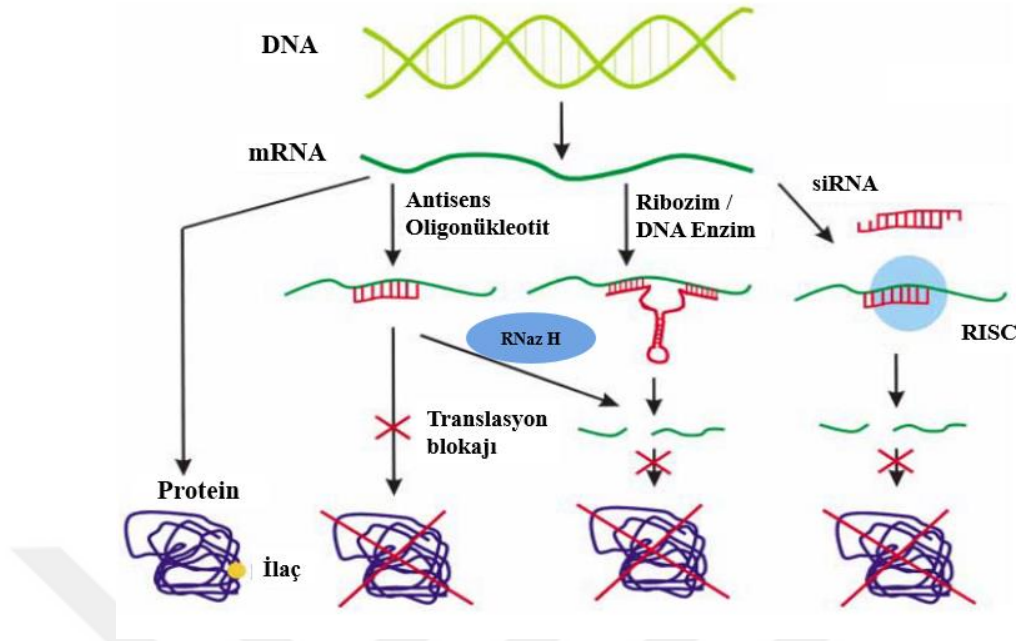
gibi istenen pek çok özelliği bir arada sunar [73]. Örneğin *in vivo* genlerin işlevi hakkında bilgi edinmek için “knock-out” hayvan oluşturmak, zaman alıcı ve pahalıdır. Ayrıca yoğun iş gücü gerektirir ve birçok durumda, embriyogenez sırasındaki letalite (öldürücülük) nedeniyle bilgilendirici değildir. Bu durumda antisens teknolojisi, hedef genin spesifik olarak susturulmasında dikkat çekici bir alternatif sunar [74].

Antisens ajanlar ile tedavi, hedef mRNA’lar üzerinde, bu hedef mRNA’lar tarafından kodlanan protein seviyelerini azaltan spesifik, amaçlanan etkilerle sonuçlanır. Kanserli birçok hasta için, sitotoksik ilaçların kullanım amacı, spesifik hücre içi hedef proteinlerle etkileşerek veya bu proteinleri inaktive ederek tümör hücrelerinin ölümünü tetiklemektir. Bunun karşılığında tümör hücreleri bu ilaçlara karşı koymak için sıklıkla, hedef proteini veya sitotoksik ilacı inaktive eden / parçalayan / hücre dışına atan proteinlerin aşırı ekspresyonunu içeren mekanizmalar geliştirir. Antisens ajanlar bu proteinlerin miktarını azaltmak üzere tasarlanır ve hücrel seviyelerini peşinen azaltarak istenen toksisiteyi artırabilirler [75].

Antisens ajanlarla tedavinin konvansiyonel ilaçlarla tedaviye göre avantajları olarak şunlar sayılabilir: 1- Geleneksel ilaçların çoğu proteinlere bağlanır ve proteinle etkileşimde proteinin üç boyutlu yapısının da incelenmesi gerekir. Antisens tedavide ise, antisens ajanların hedefi olan tamamlayıcı RNA’lar tek boyutludur. 2- Uygun oligonükleotitlerin sentezlenmesi kısa sürer, ilgili gene ait DNA veya mRNA diziliminin bilinmesi yeterlidir. 3- Oligonükleotit bağlanması için hidrojen bağları yeterlidir, proteinlerle etkileşim için ise farklı bağ kuvvetlerine de ihtiyaç duyulur. 4- Uygun şekilde hazırlanan antisens ajanlar istenilen dokuya veya etkene hedeflendirilebilirler [76].

Bu avantajlara karşılık, başarılı bir uygulama için çeşitli sorunların üstesinden gelinmesi de gerekir: 1- Oligonükleotit bağlanması için hedef RNA’nın erişilebilir bölgeleri tanımlanmalıdır. 2- Antisens ajanlar stabil değildirler, endonükleaz ve ekzonükleazlara karşı korunmalıdırlar. 3- Antisens ajanların hücrel alımları sağlanabilmeli ve hücre içi lokalizasyonları doğru olarak gerçekleştirilmelidir [74].

Üç çeşit antisens stratejisi mevcuttur ve bu stratejiler Şekil 2-7’de [74] özetlenmiştir.



Şekil 2-7: Farklı Antisens Stratejilerinin Karşılaştırılması

İlk stratejide tek zincirli antisens oligonükleotitler yer alır. Antisens oligonükleotitler, tamamlayıcı hedef mRNA ile eşleşerek mRNA'nın translasyonunu bloke eder veya RNaz H enzimiyle parçalanmasını tetikler. Genellikle 15-20 nükleotit içerirler.

İkinci stratejide yer alan ribozimler ve DNA enzimleri katalitik aktiviteye sahiptirler ve sadece hedef mRNA'ya bağlanmakla kalmaz aynı zamanda hedef mRNA'yı parçalarlar.

Belirlenen üçüncü strateji ise, 21-23 nükleotitli siRNA moleküllerinin kullanıldığı RNA girişimidir (RNA interference). Bu yaklaşımda siRNA molekülleri RISC (RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksi) adı verilen bir protein kompleksine bağlanır ve hedef mRNA'nın parçalanması tetiklenir. RNA girişimi, aynı zamanda miRNA molekülleri ile de gerçekleştirilebilir [74].

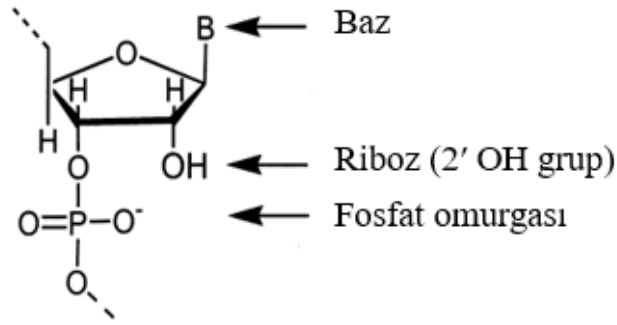
Bu tez çalışmasında ilk stratejide bahsedilen antisens oligonükleotitlerden biri olan "Gapmer" molekülleri kullanıldığından, antisens oligonükleotitleri ile ilgili daha detaylı bilgi aşağıdaki alt başlıkta ayrıca verilmiştir.

2.6.4.1. Antisens Oligonükleotitler ve Modifikasyonları

Oligonükleotitler, hidrofilik karakterde ve genellikle 4 kDa'dan daha büyük molekül ağırlığına sahip, negatif yüklü makromoleküllerdir [77].

Oligonükleotitlerin antisens ajanlar olarak görev yapma potansiyeli, 1978'de Zamecnik ve Stephenson tarafından gösterilmiştir [78]. Bu araştırmacılar, hücre kültüründe *Rous Sarcoma Virus*'ün neden olduğu viral replikasyon ve onkojenik transformasyonun, hücrelere verilen sentetik bir DNA oligonükleotidi ile inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Viral replikasyon için önemli olduğu varsayılan viral mRNA'nın bir segmentine komplementer olan, 13-nükleotit uzunluğundaki bu oligonükleotit, Watson-Crick baz eşleşmesi (adeninin timin ile, guaninin sitozin ile) yoluyla hedef mRNA ile diziye özgü bir şekilde hibritleşmek üzere tasarlanmıştır. Oligonükleotidin mRNA ile hibridizasyonunu takiben, translasyonun durması ya fiziksel blokajla ve/veya oluşan RNA·DNA dupleksindeki RNA'nın RNaz H aracılı parçalanmasıyla gerçekleşir. Tasarlanan bu oligonükleotidin aynı zamanda kimyasal olarak modifiye edilmiş formu da çalışılmış ve muhtemelen kültür ortamında nükleazlara direnç sağladığı için modifiye formun daha iyi performans gösterdiği bildirilmiştir [78].

Antisens oligonükleotitlerin en büyük dezavantajlarından biri moleküllerin stabilizasyonudur. Modifiye edilmemiş oligonükleotitler, biyolojik sıvılarda nükleazlar tarafından hızlıca parçalanırlar. Ayrıca negatif yüklü olma özellikleri, hücre zarından nüfuz etmelerini de engeller. Nükleaz direncini artırmak, doku yarı ömrünü uzatmak, afinite ve potensi artırmak, diziye özgü olmayan toksisiteyi azaltmak için çeşitli kimyasal modifikasyonlar geliştirilmiştir. Modifikasyonlar, genel olarak üç hedef bölge üzerinden gerçekleştirilir. Bu hedef bölgeler, oligonükleotidin baz bileşeni, şeker halkası (özellikle 2' OH grubu) ve fosfat omurgasıdır (Şekil 2-8) [74].

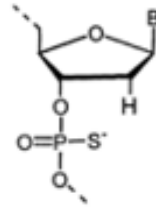
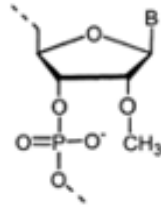
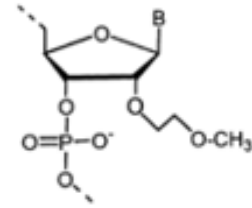
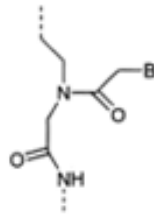
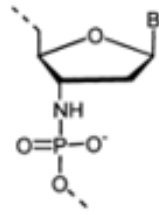
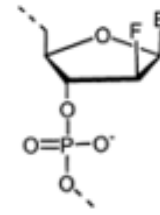
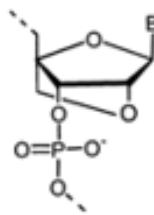
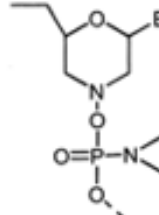
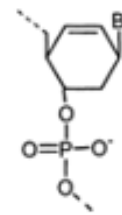
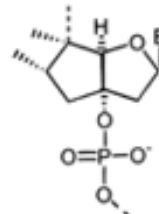


Şekil 2-8: Ribonükleotitlerin Kimyasal Modifikasyonu için Hedef Bölgeler

Gerçekleştirilen modifikasyonlar sonucu oluşan antisens oligonükleotitler birinci, ikinci ve üçüncü kuşak olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2-9) [74].

Birinci kuşak DNA analoglarının başlıca temsilcileri, fosforotiyoat (PS) oligodeoksinükleotitleridir. En bilinen ve en yaygın olarak kullanılan antisens oligonükleotitlerdir. Bu sınıf, doğal DNA oligonükleotitlerinin fosfodiester bağında yer alan ve köprü oluşturmayan oksijen atomlarından birinin, sülfür atomu ile değiştirilmesiyle elde edilmiştir. PS bağlarının girmesiyle moleküle nükleaz direnci kazandırılmıştır. PS DNA'ları insan serumunda yaklaşık 9-10 saat yarı ömre sahipken, modifiye edilmemiş oligodeoksinükleotitler için bu süre yaklaşık 1 saattir [79–81].

PS oligonükleotitler, RNaz H enzimini aktive ederek bağlandığı dizinin parçalanmasını sağlar. Birincil dezavantajları ise bazı proteinlere bağlanmalarıdır ki, bu spesifik olmayan bağlanmanın hücrel toksisiteden sorumlu olabileceği bildirilmektedir [82,83]. Bir diğer dezavantajları da, karşılık gelen fosfodiester oligodeoksinükleotitlerine kıyasla komplementer RNA moleküllerine karşı afinitelerinin az oranda düşmesidir. Bir heterodupleksin erime sıcaklığı, nükleotit başına yaklaşık 0.5°C azalmaktadır. Bu zayıflık, modifiye olmamış oligodeoksinükleotitlere kıyasla, PS oligodeoksinükleotitler için hibridizasyonun gelişmiş spesifitesi ile telafi edilir [74]. İlk antisens teknoloji ilacı Fomivirsen (Vitravene™, ISIS Pharmaceuticals), sitomegalovirüs (CMV) proteinlerini kodlayan mRNA'ya komplementer olacak şekilde tasarlanmış 21 bazlı sentetik bir PS oligonükleotittir. FDA tarafından 1998'de onaylanmıştır. AIDS (Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu) hastalarında CMV kaynaklı retinitin intravitreal enjeksiyon ile lokal tedavisinde endikedir [84]. EMA, tarafından ise 1999'da onaylanmış, fakat ticari sebeplerden ötürü 2002 yılında geri çekilmiştir [85].

Birinci kuşakFosforotiyoat DNA
(PS)**İkinci kuşak**2'-O-metil RNA
(OMe)2'-O-metoksi-etil- RNA
(MOE)**Üçüncü kuşak**Peptit nükleik asit
(PNA)N3'-P5' Fosforoamidat
(NP)2'-Fluoro-arabino nükleik asit
(FANA)Kilitli nükleik asit
(LNA)Morfolino fosforoamidat
(MF)Siklohekzen nükleik asit
(CeNA)Trisiklo-DNA
(tcDNA)**Şekil 2-9: Modifiye Antisens Oligonükleotitler**

PS oligodeoksinükleotitlerle ilgili problemler, ikinci kuşak oligodeoksinükleotitlerle bir dereceye kadar çözülmüştür. Bu kuşak, ribozun 2' konumunda alkil modifikasyonları içermektedir. 2'-O-metil (OMe) ve 2'-O-metoksi-etil

(MOE) RNA, bu sınıfın en önemli üyeleridir. Birinci kuşağa göre daha az toksiktirler ve tamamlayıcı RNA'larına karşı biraz daha yüksek afiniteye sahiptirler. Ancak bu istenen özelliklere karşın bu 2'-O-alkil RNA'lar, hedef RNA'sının RNaz H bölünmesini indükleyemez, antisens etkilerini translasyonu yalnızca sterik olarak engelleyerek gösterirler [74]. Fakat, çoğu antisens yaklaşımı için, antisens potensini arttırmak adına hedef RNA'nın, RNaz H tarafından parçalanması istenir. Bu nedenle "Gapmer Teknolojisi" geliştirilmiştir. Gapmerler, DNA veya PS DNA monomerlerinin merkezi bir dizisi ve bu merkezi dizinin her bir ucunda 2'-O-metil RNA gibi modifiye edilmiş nükleotitlerden oluşur. Uç blokların, antisens oligonükleotidin nükleolitik bozunmasını önlediği ve iki uçtaki 2'-O-metil nükleotitleri arasında, bunlara bitişik en az dört ve beş deoksi bakiyesinin sırasıyla *Escherichia coli* ve insan RNaz H enzim aktivasyonu için yeterli olduğu bildirilmiştir [86]. Yani bir Gapmer tasarımı dendiğinde, RNaz H bölünmesini indüklemek için yeterli uzunlukta bir merkezi deoksinükleotit monomerler bloğu içeren, kimerik bir antisens oligonükleotit anlaşılmaktadır (Şekil 2-10) [87–89]. Kimerik oligonükleotitler, 2'-O-metil-ribonükleotitleri gibi modifiye RNA bazları ve PS bağları gibi modifiye bağlar dahil olmak üzere, dizisinde hem DNA hem de RNA bazlarına sahip oligolardır [90]. Bu tez çalışmasında etkin madde olarak kullanılacak oligonükleotitler de bu şekilde Gapmer tasarımındadır.

5' KANAT (WING)	BOŞLUK (GAP)	3' KANAT (WING)
Stabilite, afinite, tolerabilite • 2'-O modifiye ribonükleotitler • Diğer modifiye ribonükleotitler	RNaz H substratı • Modifiye edilmemiş DNA • Modifiye DNA analogları	Stabilite, afinite, tolerabilite • 2'-O modifiye ribonükleotitler • Diğer modifiye ribonükleotitler

Şekil 2-10: RNaz H Etkili Kimerik Oligonükleotit (Gapmer) Tasarımı

2013 yılında FDA tarafından, ailevi hiperkolesterolemi tedavisi için onaylanan Kynamro™ (mipomersen sodyum), merkezde 10-birimlik PS DNA analogu ile bunun her iki ucunda 5'er birimlik PS 2'-O-metoksi-etil RNA analogu içeren ikinci kuşak kimerik antisens oligonükleotittir [91].

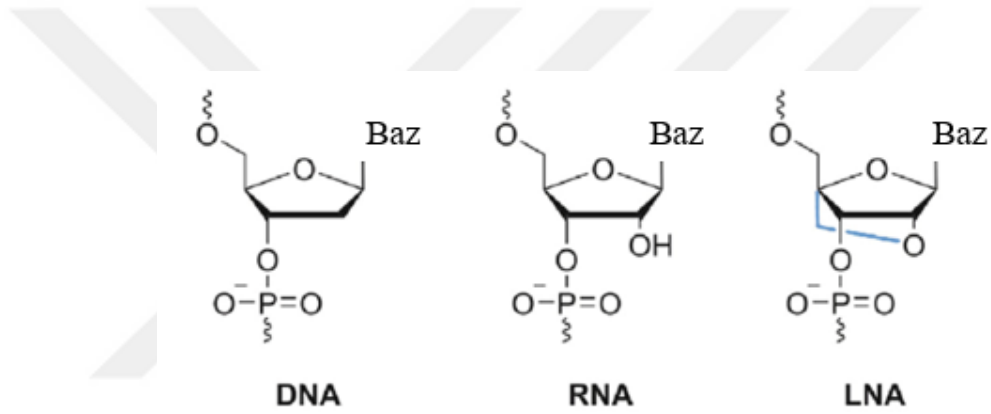
Birinci ve ikinci kuşak antisense oligonükleotitlerin ardından, hedef afinitesi, nükleaz direnci ve farmakokinetik gibi özellikleri iyileştirmek için çeşitli modifiye nükleotitler geliştirilmiştir. PS DNA için “birinci kuşak” ve 2'-O-alkil-RNA için “ikinci kuşak” şeklinde olan önceki terimlendirmeye benzer olarak bu yeni nükleotitler, daha sonra “üçüncü kuşak” antisens ajanlar terimi altında toplanmıştır. Büyük çoğunluğu, hedef mRNA'nın RNaz H aracılı parçalanmasını aktive etmezler. Modifiye edilmiş fosfat bağları veya ribozları olan DNA ve RNA analoglarının yanı sıra furanoz halkasının yerini alan tamamen farklı bir kimyasal kısma sahip nükleotitler geliştirilmiştir. Sayılanlarla sınırlı kalmamak üzere başlıcaları [74];

- Deoksiriboz fosfat omurgasının yerini poliamit bağlarının aldığı **peptit nükleik asitler (PNA)**,
- Modifiye fosfat omurgasının bir başka örneği olan, 2'-deoksiriboz halkasının 3'-hidroksil grubunun 3'-amino grubu ile değiştirildiği **N3'-P5' fosforoamidatlar (NP)**,
- RNA'nın 2' epimeri olan arabino nükleik asitten yapılmış oligonükleotitler veya karşılık gelen **2'-deoksi-2'-floro- β -D-arabino nükleik asit analogları (FANA)**,
- Son yılların en umut verici modifiye nükleotitlerinden biri olan, ribozun 2'-oksijeninin 4'-karbona, metilen köprüsüyle bağlandığı bir ribonükleotit olan **kilitli nükleik asitler (LNA)**,
- Ribozun bir morfolino yapısıyla ile değiştirildiği ve fosfodiester bağları yerine fosforoamidat alt birimleri arası bağların kullanıldığı non-iyonik DNA analogları olan **morfolino oligonükleotitleri (MF)**,
- Beş üyeli furanoz halkasının altı üyeli bir halka ile değiştirildiği **Sikloheksen nükleik asitleri (CeNA)**,
- Komplementer dizilerine daha iyi bağlanabilen **Trisiklo-DNA nükleotitleri (tcDNA)'dir.**

Bu tez çalışmasında etkin madde olarak yer alan molekül LNA içerdiğinden, LNA teknolojisinden ayrı bir başlık altında bahsedilmiştir.

2.6.4.2. Kilitli Nükleik Asit (LNA) Teknolojisi

LNA köprülü, bisiklik şeker yapısı içeren yüksek afinite RNA analoglarının bir sınıfıdır. LNA’larda geleneksel RNA oligonükleotitlerinin 2'-O- ve 4'-pozisyonları arasına eklenen ekstra metilen grubu, riboz halkasını Watson-Crick bağlanması için ideal konformasyonda kilitler. Bu nedenle bu grup RNA analogları “kilitli nükleik asit” olarak anılır. LNA oligonükleotitleri, tamamlayıcı DNA veya RNA zincirine hibridize olduğunda benzeri görülmemiş bir termal kararlılık sergiler [92,93]. Geleneksel DNA veya RNA oligonükleotitleri ile LNA oligonükleotitleri, yapısal çizimleriyle Şekil 2-11’de [92] karşılaştırılmıştır. LNA yapısındaki mavi renkli yapı metilen köprüsünü ifade etmektedir.

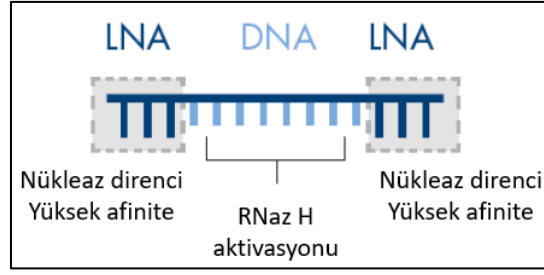


Şekil 2-11: DNA, RNA ve LNA Oligonükleotitlerinin Yapısal Çizimleri

2.6.4.3. Antisens LNA GapmeR Oligonükleotitleri

Bu tez çalışmasında etkin madde olarak kullanılan moleküller, ticari olarak pazarlandığı şekliyle “Antisens LNA GapmeR” veya kısaca “GapmeR” olarak anılmıştır. GapmeR’ler 16 nükleotit uzunluğunda tek zincir şeklindedir. Bu tek zincirli antisens oligonükleotitleri, tamamlayıcı RNA hedeflerinin RNaz H aracılı parçalanmasını katalizler ve bu hedeflerin ekspresyonlarını inhibe ederler.

Bu moleküller, isminden de anlaşıldığı üzere, başlık 2.6.4.1’de açıklanan Gapmer tasarımına sahiptir. Uç kısımları üçüncü kuşak oligonükleotitlerden olan kilitli nükleik asitler (LNA) ile kuşatılmıştır. LNA içermeyen orta boşluk ise DNA ile zenginleştirilmiştir (Şekil 2-12) [93].

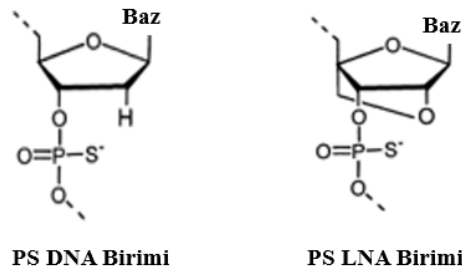


Şekil 2-12: Antisense LNA GapmeR Molekülü Tasarımı

LNA içeren uç kısımlar, hedefe bağlanma afinitesini artırır ve aynı zamanda antisens oligonükleotide nükleaz direnci sağlar. Merkezdeki DNA boşluğu da, hedef RNA'yla hibridize olduğunda, karşıt RNA zincirinin RNaz H aracılı bölünmesini aktive eder [93].

GapmeR oligonükleotidinin LNA içeriği değiştirilerek, hassasiyet ve özgünlüğün optimize edilmesi mümkündür. Oligonükleotitlere LNA katılmasının, hassasiyet ve özgünlüğü arttırdığı, polimeraz zincir reaksiyonu, microarray ve in situ hibridizasyon gibi pek çok hibridizasyon tabanlı teknoloji ile gösterilmiştir. Bir LNA oligonükleotidi, geleneksel DNA veya RNA oligonükleotitleri ile kıyaslandığında, tamamlayıcı zincirine büyük ölçüde artmış afinite gösterir. Bu durum, eşsiz bir hassasiyet ve özgünlük sağlar ve LNA oligonükleotitlerini, küçük veya çok benzer DNA / RNA hedefleri için ideal araçlar haline getirir [93].

Ayrıca GapmeR'lerin her bir nükleotit birimi, enzimatik parçalanmaya güçlü direnç sağlayan fosforotiyoat omurgasına sahiptir (Şekil 2-13) [93]. Yani LNA ve DNA yapısındaki fosfor grubuna bağlı oksijen atomlarından biri yerine kükürt atomu yer almaktadır.



Şekil 2-13: Fosforotiyoat (PS) Omurgasına Sahip LNA ve DNA Birimleri

2.6.4.4. Onaylı Antisens Oligonükleotit İlaçları

FDA ve/veya EMA tarafından onaylı antisens oligonükleotit ilaçları Tablo 2-3'te [94,95] sunulmuştur.

Tablo 2-3: Onaylı Antisens Oligonükleotit İlaçları

Etkin Madde Adı (Ticari Ad)	Endikasyon	Mekanizma	FDA onayı	EMA onayı
Fomivirsen (Vitravene™)	Sitomegalovirüs ilişkili retinit	Sterik blokaj	1998	1999
Mipomersen (Kynamro™)	Ailesel Hiperkolesterolemi	RNaz H aracılı	2013	Yok
Eteplirsene (Exondys 51™)	Duchenne Musküler Distrofi	Sterik blokaj	2016	Yok
Nusinersen (Spinraza™)	Spinal musküler atrofi	Sterik blokaj	2016	2017
Inotersen (Tegsedi™)	Transtiretin ilişkili Ailevi Amiloidozis	RNaz H aracılı	2018	2018
Valonesorsene (Waylivra®)	Ailesel Şilomikronemi Sendromu	RNaz H aracılı	Yok	2019
Golodirsene (Vyondys 53™)	Duchenne Musküler Distrofi	Sterik blokaj	2019	Yok

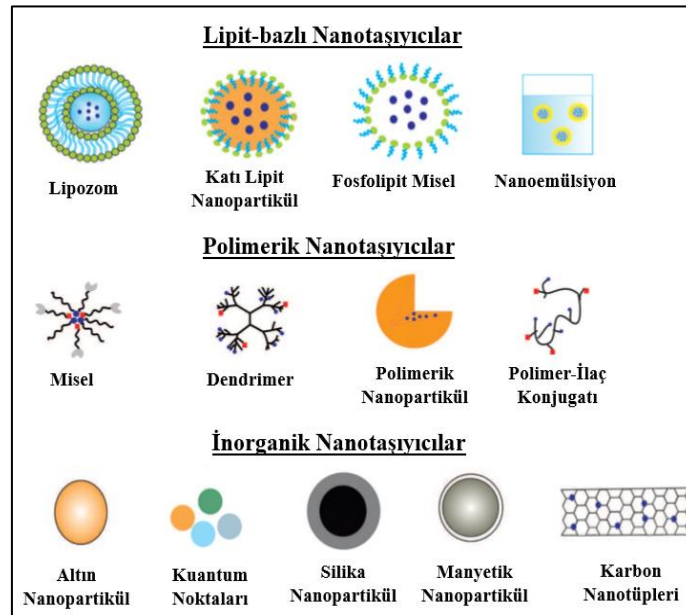
2.6.5. Gen Tedavisinde Biyolojik Engeller

Gen tedavisinin başarılı olabilmesi için, nükleik asit yapılı molekülün biyolojik bariyerleri geçerek hedef hücreye bozunmadan ulaştırılması ve nükleik asit tipine göre sitoplazma veya çekirdeğe transfeksiyonunun gerçekleştirilmesi gereklidir. Gen tedavi ürünleri genelde intravenöz veya subkutan olarak uygulandığından ilk karşılaşılan bariyerler doku ve kan dolaşımındadır. Bunların başlıcaları, nükleazlar, immün sistem aktivasyonu ve bağ doku, epitel doku gibi bariyerlerdir. Bu bariyerlerden kaçabilen nükleik asit, hücre zarını geçerek hücre içine alınmalıdır. Bu noktada negatif yüklü olarak değerlendirilen hücre zarı, yine negatif yüklü olan nükleik asitler için bir diğer önemli

biyolojik engel olmaktadır. Bu engeli de çeşitli yaklaşımlarla aşabilen ve hücre içine alınan molekül, hücre içinde endozomal yıkımdan ve endonükleazlardan kaçabilmelidir. Bundan sonra, etkisini gösterebilmesi için çekirdeğe girmesi gerekiyorsa, çekirdek zarı son biyolojik engel olarak nitelendirilmektedir [8,96]. Nükleik asitleri, bahsedilen bu biyolojik engellere karşı koruyup, hücrelere taşınmasını sağlamak için çeşitli taşıyıcı sistemlerden yararlanılmaktadır.

2.6.6. Gen Tedavisinde Kullanılan Taşıyıcı Sistemler

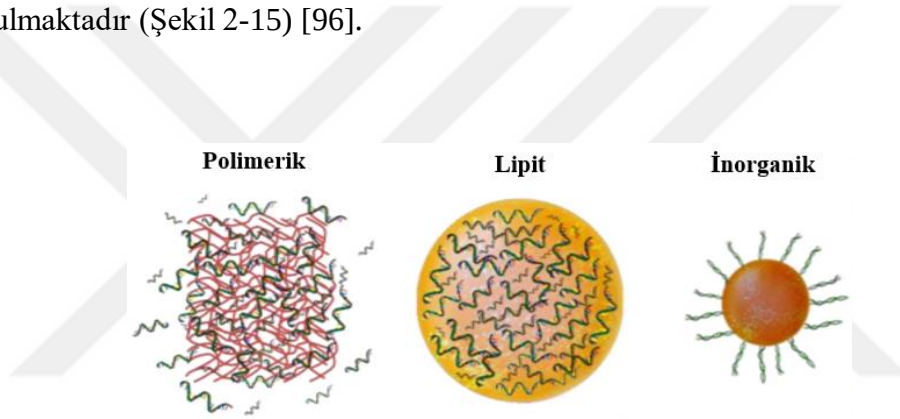
Gen tedavisinde kullanılan taşıyıcı sistemler (vektörler), en genel olarak viral ve viral olmayan vektörler olarak ikiye ayrılır. Adenovirüsler, retrovirüsler, lentivirüsler yaygın olarak kullanılan viral vektörlerdendir. Viral vektörler sayesinde, virüslerin doğal genetik materyal aktarım mekanizmasından faydalanılır. Yüksek transfeksiyon verimi elde edilir. Buna karşılık yüksek toksisite, istenmeyen immün yanıt, yüksek dozda kullanım riskleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu sebeplerle, günümüzde viral olmayan vektör kullanımı önem kazanmıştır. Polimerik, lipid ve inorganik biyomalzemelere nükleik asitler gibi çeşitli terapötik etkili maddelerin yüklenmesiyle sentezlenen nano boyutlu taşıyıcılar, viral olmayan vektörlerdendir (Şekil 2-14) [97].



Şekil 2-14: Çeşitli Farmasötik Nanotaşıyıcılar

Viral olmayan vektörler, kolay sentezlenebilme, hücreye özel fonksiyon kazandırılabilme, yüksek kapasite, salım hızını kontrol edebilme gibi avantajlarına karşılık, dezavantaj olarak düşük transfeksiyon verimine sahiptirler [96]. Transfeksiyon verimleri PEGilasyon, ligant konjugasyonu gibi yüzeyel modifikasyonlarıyla arttırılmaya çalışılmaktadır [98]. Viral vektörlere temkinli yaklaşılmasına sebep olan toksisite ve immün yanıt oluşturma özellikleri ise, viral olmayan vektörlerde düşüktür [96].

Nükleik asitler, polimerik nano vektörlerde uzun polimer zincirleri arasına hapsedilirken, lipozom gibi lipid bazlı taşıyıcılarda hidrofilik özellik gösteren iç boşluğa yüklenmektedir. İnorganik viral olmayan vektörlerde ise genellikle yüzeye tutturulmaktadır (Şekil 2-15) [96].



Şekil 2-15: Polimerik, Lipit ve İnorganik Yapılı Nanotaşıyıcılara Nükleik Asit Yüklenmesi

Negatif yüklü nükleik asitler ve yine negatif yüklü olarak değerlendirilen hücre membranı ile kolayca etkileşime girebilme özelliği sebebiyle genellikle katyonik malzemeler (kitozan, poli-L-lizin, poli-laktik-ko-glikolik asit, polietilen imin, poliamido amin, siklodekstrin gibi polimerler veya katyonik lipozomlar vs.) tercih edilmektedir [96].

Bu tez çalışmasında kitozan nanopartiküller kullanıldığından bununla ilgili daha ayrıntılı bilgi, aşağıda verilmiştir.

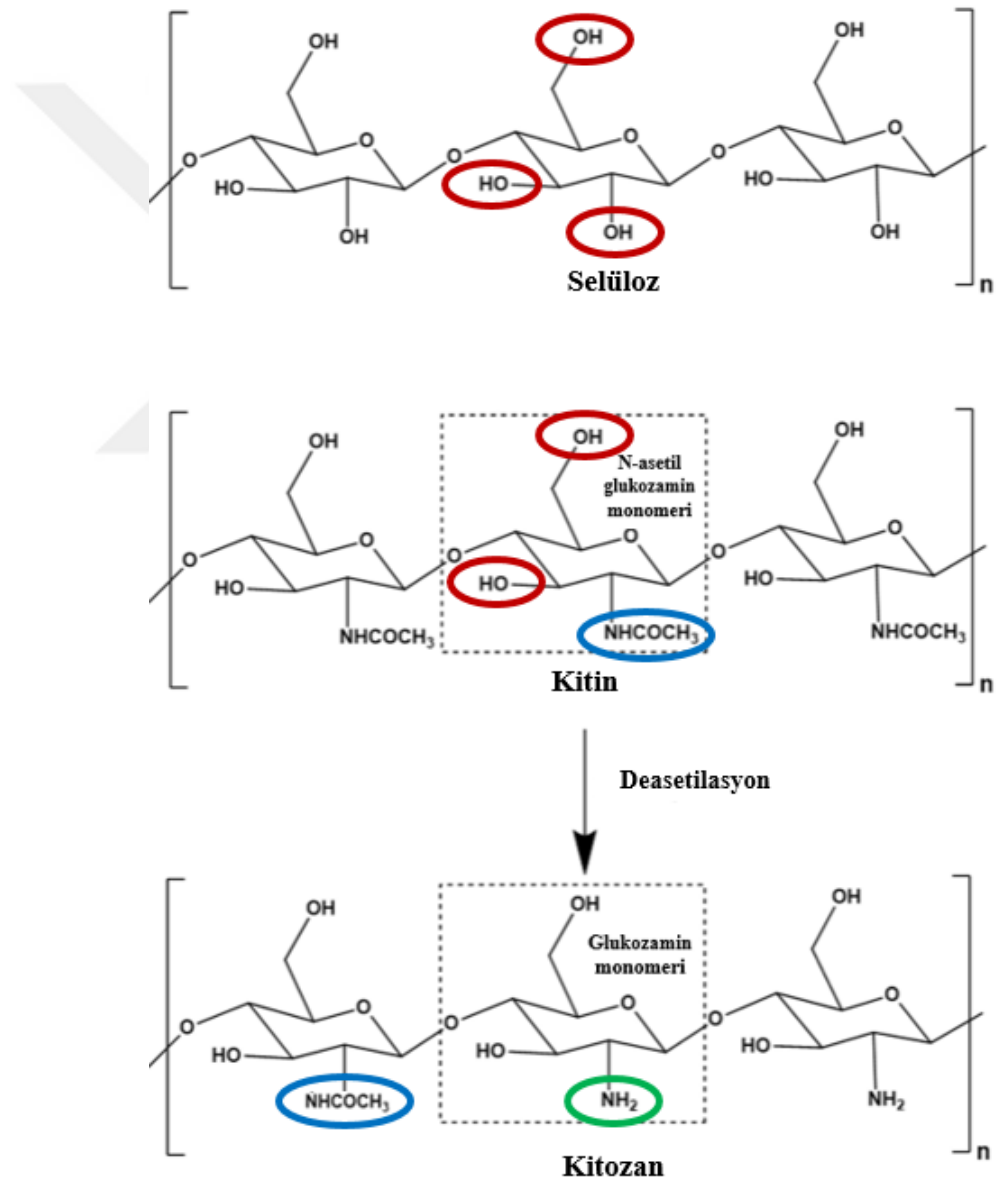
2.7. Kitozan Nanopartiküller

Bu tez çalışması kapsamında kitozan nanopartiküller hazırlanmıştır. Kitozan ve nanopartiküller hakkında genel bilgi aşağıdaki alt başlıklarda verilmiştir.

2.7.1. Kitozan

Kitozan, farmasötik alanda geniş kullanıma sahip (bağlayıcı, dağıtıcı, kaplama malzemesi, mukoadhezif, peptit ve gen taşınmasında, kolon hedeflenmesinde vb.) doğal kaynaklı bir polisakkarittir. Biyoparçalanabilir ve biyoyumludur. Düşük toksisiteye sahiptir. Kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilmektedir [99,100].

Kitin, doğada selülozdan sonra en bol bulunan polimerdir [101]. Selüloz, kitin ve kitozanın yapısı Şekil 2-16'da [101] verilmiştir.



Şekil 2-16: Selüloz, Kitin ve Kitozanın Yapısı

Kitin ve selüloz polimerleri, her ikisinde de monomerlerinin β (1,4) bağı olması açısından, benzerlik göstermektedir. Selüloz, glukoz monomerlerinden oluşurken, kitin ağırlıklı olarak N-asetil glukozamin monomerlerinden meydana gelmektedir. Monomerler arasındaki fark, glukozdaki C-2 pozisyonundaki hidroksil grubu yerine N-asetil glukozamin birimlerinde, asetamido (NHCOCH_3) grubunun bulunmasıdır. Kitinin kısmi deasetilasyonu sonucu, glukozamin (deasetile birim) ve N-asetil glukozamin (asetile birim) kopolimerlerini içeren kitozan elde edilir. Kitozanda ağırlıklı olarak glukozamin monomerleri (deasetile birim) yer almaktadır [101].

Kitozanın kimyasal formülü $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N})_n$ şeklinde olup, kitozan terimi farklı moleküler ağırlıklara (50 kDa ila 2000 kDa), farklı viskozite ve deasetilasyon derecesine (%40–98) sahip bir dizi kitozan polimerini tanımlamak için kullanılır [99].

Kitin, mantarların hücre duvarlarında, böceklerin dış iskeletlerinde ve ağırlıklı olarak yengeç, karides gibi Crustacea'lerin kabuklarında bulunan doğal bir polisakkarittir. Bu kabuklar, sırasıyla alkali ve asit ile muamele edilir. Bu şekilde proteinler, lipitler ve kalsiyum karbonat, kalsiyum fosfat gibi minerallerin kabuklardan uzaklaştırılması sağlanır. Elde edilen kitin kurutulur ve kitozan elde edilmek üzere, deasetilasyon için stabil bir ara madde olarak saklanır. Deasetilasyon işlemi, kitinin yüksek sıcaklıkta güçlü bir sodyum hidroksit çözeltisi muamelesiyle gerçekleştirilir [99,100].

Kitin oldukça hidrofobiktir, suda ve çoğu organik çözücünde çözünmez. Buna karşılık kitozan, hidrofilik özelliktedir ve seyreltik hidroklorik asit (HCl), formik asit ve asetik asit gibi asidik çözeltilerde çözünür. Ancak pH 6.5 üstünde ve çoğu organik çözücünde çözünmez. Çözünmeyi takiben, kitozandaki amino grupları protonlanır ve sonuçta pozitif yük oluşur [100,102]. Amino grupları, asitlerle kolaylıkla kimyasal reaksiyon ve tuz oluşumunu sağlar. Kitozan tuzları (glutamat, klorür vb.) çözünürlüğü deasetilasyon derecesine bağlı olarak, suda çözünürdür [99].

Kitozanın katyonik yapısı, kitindeki asetil gruplarının kısmen uzaklaştırılmasıyla serbest kalan amino gruplarından kaynaklanır [103]. Özelliklerinin çoğu, katyonik doğasına bağlıdır. Kitozan, asidik pH'larda yüksek yük yoğunluğuna ve her glukozamin birimi başına bir pozitif yüke sahip, lineer bir polielektrolittir. Bu nedenle, proteinler, anyonik polisakkaritler ve nükleik asitler dahil olmak üzere negatif yüklü moleküllerle etkileşime girer [15].

Kitozan, asidik sulu çözeltilerde çözünmesi sayesinde çözeltideki diğer moleküllerle etkileşime girebilir. Antibakteriyel, antifungal, anti-inflamatuvar, anti-kanser aktivite gibi geniş kapsamlı biyolojik etkiler göstermesinin yanı sıra, yağ bağlama, film oluşturma, antioksidan ve şelatlama gibi kabiliyetlere sahip olduğundan çeşitli endüstri sektörlerinde (gıda, kozmetik, tarım, atık su vb.) de uygulama alanı bulmaktadır [101].

2.7.2. Nanopartiküller

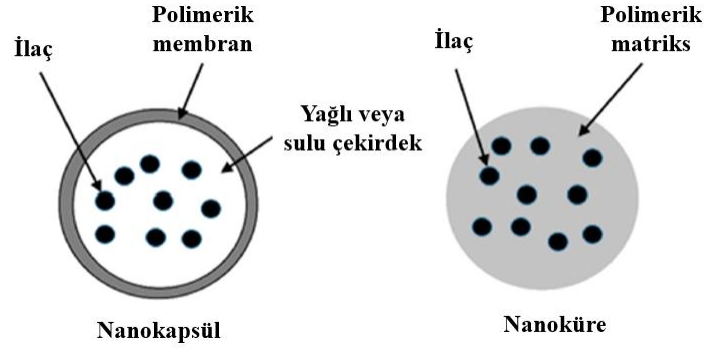
Nanopartiküller, boyut açısından farklı kaynaklarda farklı tanımlanmasına rağmen, ilaç taşıyıcı sistem olarak, mikron altı ($< 1 \mu\text{m}$) kolloidal sistemler olarak nitelendirilirler [104].

İdeal nanopartikül taşıyıcıları, biyolojik olarak parçalanabilir, stabil, immünojenik olmayan özellikte, kolay üretilebilir ve uygun maliyetli olmalıdır. Aynı zamanda taşıdıkları terapötik maddeleri yalnızca hedef bölgede serbest bırakabilmelidir [105].

Farmasötik alanda nanopartiküler taşıyıcı sistem kullanmanın avantajlarından bazıları; partiküllerin boyutları dolayısıyla damardan kolayca geçerek dolaşıma karışması, yüzey alanının artmasına bağlı çözünürlük artışı, hasta bölgeye veya belirli bir hücre, doku veya organa yönlendirilebilmeleri, polietilen glikol / polioksietilen molekülleri bağlanarak dolaşımda kalma sürelerinin arttırılmasıdır [106].

Farmasötik nanopartiküller genellikle “aşağıdan yukarıya” (bottom-up) bir yöntemle üretilir. Bu yöntemde tasarlanmış makromoleküler bileşenler, birbirleriyle etkileşime girmek için dış uyaranlar tarafından yönlendirilir ve başka türlü mümkün olmayan kompleks yapılar halinde kendiliğinden oluşurlar (self-assembly). İlaçlar, nanopartikül içinde enkapsüllenebilir ya da nanopartikül yüzeyine tutunabilir [105].

Polimerik nanopartiküller, hazırlanmalarında kullanılan yöntemle göre, Şekil 2-17’de [107] gösterildiği gibi nanokapsül veya nanoküre halinde elde edilebilir. Nanokapsüller, ilacın polimerik zarla çevrili bir boşluk (yağlı veya sulu bir çekirdek) içinde yer aldığı veziküler sistemlerdir. Nanoküreler ise, ilacın polimer partikülleri arasında dağıldığı matriks sistemlerdir [107].



Şekil 2-17: Polimerik Nanopartiküllerin Başlıca İki Tipi

İlaç yüklü nanopartikülleri hastalıklı bölgelere taşımanın üç ana yöntemi bulunmaktadır: pasif hedefleme, aktif hedefleme ve fiziksel hedefleme.

Pasif hedefleme, artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR: Enhanced Permeability and Retention) etkisiyle çalışır [105]. Artmış geçirgenlik etkisi, tümör dokusundaki kan damarlarının normal bir doku damarlanmasına göre devamlı olmayan, daha açıklıklı bir epitele sahip olmasıyla birlikte, bazal membrandan yoksun olmasından kaynaklanmaktadır. Kılcal damarlarda ortaya çıkan açıklıklar, tümör tipine, ortamına ve lokalizasyonuna bağlı olarak 200-2000 nm arasında değişen boyutlara ulaşabilmektedir. Artmış alıkonma etkisi ise, tümörlerdeki lenfatik sistem bozukluğu sebebiyle hücreler arasındaki sıvı drenajının azalmasına bağlı olarak damar etrafında meydana gelen birikimden kaynaklanmaktadır. Bu durum, nano boyutlu maddelerin tümör dokularına pasif olarak hedeflenmesini ve bu hücreler tarafından alınmasını sağlar [108].

Ligant aracılı hedefleme olarak da adlandırılan aktif hedeflemede, hedef hücreler tarafından spesifik tutulum ve alımın sağlanması için nanopartiküllerin yüzeyindeki afinite ligantları kullanılır. Bu amaçla, hastalıklı organlarda, dokularda, hücrelerde veya hücre altı yapılarda aşırı eksprese edilen yüzey moleküllerine veya reseptörlere bağlanacak ligantlar seçilir. Ana mekanizma, ligandın hedef substratı tarafından tanınmasıdır. Ligant olarak antikorlar, proteinler, peptitler, nükleik asitler, şekerler ve vitaminler kullanılabilir. Hedef moleküller de, hastalıklı organlarda veya hücre yüzeyinde bulunan proteinler, şekerler veya lipitler olabilir [108].

Fiziksel hedeflemede ise, nanopartikülleri hedef bölgeye yönlendirmek ve salım sürecini kontrol etmek için, örneğin fototermal ve manyetik hipertermi tedavisinde olduğu gibi, harici kaynaklar veya alanlar kullanılır.

Tüm hedefleme türleri için, ilaç salınımı pH, sıcaklık veya her ikisinin bir kombinasyonu ile tetiklenebilir [105].

2.7.3. Kitozan Mikro/Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Kitozanın partiküler sistemlerini hazırlamak için farklı yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemlerden sık kullanılanları; **1)** Emülsiyon çapraz-bağlama yöntemi, **2)** Koaservasyon (faz ayrımı)/çöktürme yöntemi, **3)** Püskürterek kurutma yöntemi **4)** Emülsiyon-damlacık koalesans (birleşme) yöntemi, **5)** Ters misel yöntemi ve **6)** İyonik jelasyon yöntemidir. Yöntemlerden herhangi birinin seçimi, istenen partikül boyutu, etkin maddenin termal ve kimyasal stabilitesi, salım kinetik profillerinin tekrarlanabilirliği, nihai ürünün stabilitesi ve nihai ürünle ilişkili bakiye toksisite gibi faktörlere bağlıdır [109]. Yöntemlerin her biri aşağıda kısaca açıklanacak olup, bu tez çalışmasında iyonik jelasyon yöntemi kullanıldığından, sadece iyonik jelasyon yöntemine ait literatür çalışmaları hakkında örnekler verilecektir.

Emülsiyon çapraz-bağlama yöntemi: Bu yöntemde, kitozanın reaktif fonksiyonel amin grupları, çapraz bağlayıcı ajanın aldehit gruplarıyla çapraz bağlanır. Kitozanın sulu çözeltisi, yağ fazında emülsifiye edilerek su/yağ emülsiyonu hazırlanır. Sulu damlacıklar uygun bir yüzey aktif madde kullanılarak stabilize edilir. Stabil emülsiyona, damlacıkları sertleştirmek için glutaraldehit gibi uygun bir çapraz bağlayıcı eklenerek, çapraz bağlama gerçekleştirilir. Elde edilen partiküller süzülür ve tekrarlı olarak yıkanarak kurutulur. Bu yöntem, meşakkatli olmasının yanı sıra etkin maddeyle kimyasal reaksiyona girebilecek güçlü çapraz bağlama ajanlarının kullanımı gibi dezavantajlara sahiptir. Ayrıca, reaksiyona girmeyen çapraz bağlama ajanının tamamen uzaklaştırılması zor olabilmektedir [109,110].

Koaservasyon (faz ayrımı)/çöktürme yöntemi: Bu yöntemde kitozanın fizikokimyasal özelliğinden faydalanılır. Kitozan alkali pH'da çözünmediği için, alkali çözelti ile temas ettiğinde çöker/faz ayrımına uğrar. Kitozan çözeltisi, faz ayrımına uğramış damlacıkları elde etmek üzere, sodyum hidroksit, sodyum hidroksit-metanol veya etandiamin gibi bir alkali çözeltiye püskürtülür. Bu işlem basınçlı bir hava püskürtücüsü ile gerçekleştirilir.

Elde edilen partiküllerin ayrılması ve saflaştırılması, süzme/santrifüjleme ve ardından sıcak ve soğuk suyla art arda yıkamayla sağlanır [109,111].

Püskürterek kurutma yöntemi: Püskürterek kurutma, ilaç-eksipiyan çözeltileri ve süspansiyonlarından toz, granül veya aglomerat elde etmek için iyi bilinen bir tekniktir. Yöntem, sıcak hava akımında atomize damlacıkların kurutulmasına dayanır. Bu yöntemde kitozan, önce sulu asetik asit çözeltisinde çözülür. Daha sonra da ilaç, bu kitozan çözeltisinde çözülür veya dağıtılır. Ardından uygun bir çapraz bağlama ajanı eklenir. Bu çözelti veya dispersiyon daha sonra bir sıcak hava akımı içinde atomize edilir. Atomizasyon, küçük damlacıkların oluşumuna yol açar. Ardından çözücü hızlıca buharlaşır ve serbest akışlı partiküller oluşur [109,112].

Emülsiyon-damlacık koalesans (birleşme) yöntemi: Bu yöntem, hem emülsiyon çapraz-bağlama hem de çöktürme yöntemlerinin ilkelerini kullanır. Ancak bu yöntemde, stabil damlacıkları çapraz bağlamak yerine, kitozan damlacıklarının NaOH damlacıkları ile koalesansına izin verilerek çökeltme sağlanır. İlk olarak, ilaç içeren sulu kitozan çözeltisinin ve sulu NaOH çözeltisinin, sıvı parafinde ayrı ayrı stabil emülsiyonları hazırlanır. Daha sonra iki emülsiyon yüksek hızda karıştırılarak, emülsiyon damlacıklarının birbirleriyle rastgele olarak çarpışması ve birleşmesi sağlanır. Böylece kitozan damlacıkları, küçük boyutlu partiküller vermek üzere çöker [109,113].

Ters misel yöntemi: Ters miseller, su, yağ ve yüzey aktif maddenin termodinamik olarak kararlı sıvı karışımlarıdır. Makroskopik olarak homojendirler, mikroskopik ölçekte ise yüzey aktif maddece zengin filmlerle ayrılmış sulu ve yağlı mikro alanlara sahiptirler. Ters misel barındıran sistemlerin en önemli özelliklerinden biri dinamik davranışlarıdır. Geleneksel emülsiyon polimerizasyon yöntemleriyle hazırlanan nanopartiküller büyük boyutludur (>200 nm) ve aynı zamanda geniş boyut aralığına sahiptir. Ters misel ortamı kullanılarak, dar boyut dağılımına sahip oldukça küçük (1-10 nm) polimerik nanopartiküllerin hazırlanması mümkündür. Bu yöntemde ters miseller hazırlamak üzere, yüzey aktif madde, organik bir çözücüde çözülür. Bu çözeltiye, kitozan ve ilacın sulu çözeltisi, karıştırma işlemi sürekli devam ederken eklenir. Ardından çapraz bağlayıcı da

ilave edilir. Çözücü buharlaştırılarak şeffaf kuru kütle elde edilir. Bu kütle suda disperse edilerek saflaştırma işlemleri uygulanır ve nanopartiküller elde edilir [109].

İyonik jelasyon yöntemi: Kimyasal çapraz bağlama yerine, elektrostatik etkileşim yoluyla tersine çevrilebilir fiziksel çapraz bağlama, reaktiflerin olası toksisitesinden ve diğer istenmeyen etkilerinden kaçınmayı sağlamaktadır. Kitozanın partiküler sistemlerini hazırlamak üzere, zıt yüklü makromoleküller arasındaki kompleksleşmenin kullanımı, bu işlem oldukça basit ve uygulanabilir olduğundan son zamanlarda büyük ilgi görmüştür [109]. Örneğin, negatif yüklü aljinat ile pozitif yüklü kitozan kullanılarak farklı pek çok partiküler sistem hazırlanmıştır [114–117]. Tripolifosfat (TPP), katyonik kitozanla elektrostatik kuvvetler yoluyla etkileşime girebilen bir polianyondur. Bodmeier vd. [118]’nin, kitozan damlacıklarını bir TPP çözeltisine damlatarak kitozan-TPP kompleksinin hazırlandığını bildirmesinin ardından, bu kompleksin potansiyel farmasötik kullanımı üzerine pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir [119–124]. İyonik jelasyon yönteminde kitozan, katyonu elde edilmek üzere sulu asidik çözelti içinde çözülür. Daha sonra bu çözelti, sürekli karışan polianyonik TPP çözeltisine, damla damla eklenir. Zıt yüklü türler olan, kitozanın pozitif yüklü amino grupları ile TPP’nin negatif yüklü fosfat grupları arasındaki kompleksleşme nedeniyle kitozan, iyonik jelleşmeye uğrar ve partiküller oluşturarak çöker [109].

Janes vd. [125], belirli bir nanometrik boyuta sahip yüksek verimli kitozan-TPP nanopartiküllerin oluşumu için gerekli koşulların, kullanılan kitozanın saflığına, asit tuzuna ve molekül ağırlığına bağlı olarak önemli ölçüde değişebildiğini, formülasyon parametrelerinin her bir kitozan türü için optimize edilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

Zhang vd. [126] tarafından iyonik jelasyon ile hazırlanan kitozan-TPP nanopartiküllerde, kitozanın deasetilasyon derecesi arttığında ve dar moleküler ağırlık dağılımına sahip kitozan kullanıldığında, partikül boyutunun azaldığı ve boyut dağılımının ise monodispers hale geldiği gözlenmiştir.

İyonik jelasyon ile hazırlanan kitozan-TPP nanopartiküllerle, insülinin nazal ve oral absorpsiyonunu arttırmak üzere farklı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda, insülin yüklü kitozan nanopartiküllerin, kitozan çözeltisine göre insülinin nazal ve oral absorpsiyonunu çok daha fazla arttırdığı bildirilmiştir. Mekanizması tam olarak bilinmese de bu durumun, kitozan nanopartiküllerin, epitel hücreleri arasındaki

sıkı bağlantıları ayırmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür [127,128]. İnsülin yüklü kitozan-TPP nanopartiküllerle ilgili yapılan bir başka çalışmada, nanopartiküller, mannitol ve laktoz gibi tipik aerosol ekspiyanları kullanılarak, püskürterek kurutma yöntemiyle mikroenkapsüle edilmiştir. Bu şekilde kuru toz halde, akciğerlere uygulanabilir mikroküreler elde edilmiştir [129].

Katas ve Alpar [130] siRNA taşıyıcı sistem olarak kitozan nanopartiküllerini, hem siRNA-kitozan arasındaki basit kompleksleştirmeye hem de kitozan-TPP arasındaki iyonik jelasyonla hazırlamışlardır. İyonik jelasyon ile hazırladıkları siRNA içeren nanopartikülleri de iki farklı şekilde oluşturmuşlardır: **i.** siRNA'nın enkapsüle edildiği nanopartiküller, **ii.** siRNA'nın, önceden hazırlanmış boş nanopartiküllere adsorbe edildiği nanopartiküller. Çalışmada kitozanın ikişer farklı molekül ağırlığına sahip, hidroklorür ve glutamat tuzları kullanılmıştır. Kitozan-siRNA komplekslerinin veya nanopartiküllerin boyutunun kullanılan kitozanın moleküler ağırlığına, tipine ve konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, iyonik jelasyon söz konusu olduğunda, kitozan/TPP kütle oranı ve kitozan çözelti pH'sı gibi diğer faktörlerin de partikül boyutunu etkilediği gösterilmiştir. Ayrıca siRNA kenetlenmesinin, iyonik jelasyonla oluşturulan nanopartiküllerde, basit kompleksleşmeye kıyasla daha verimli olduğu bulunmuştur. Bu *in vitro* çalışmayla, siRNA'nın transfeksiyon etkinliğinin, kitozan ile siRNA'nın birleşme yöntemine bağlı olduğu ve iyonik jelasyon sırasında enkapsüle edilen siRNA'nın, basit kompleks halindeki veya hazırlanan kitozan nanopartikülleri üzerine adsorbe ettirilen siRNA'dan daha iyi bir biyolojik etki sağladığı ortaya koyulmuştur.

Csaba vd. [131], hazırladıkları plazmid DNA (pDNA) yüklü kitozan-TPP nanopartiküller ile TPP kullanmaksızın hazırladıkları pDNA-kitozan poliplekslerinin morfolojisini TEM ile incelemişlerdir. Nanopartiküllerin bariz bir küresel şekle sahip olduğu, poliplekslerin ise bazılarının küresel bazılarının belirsiz şekillerde heterojen bir morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. Nanopartiküller ve polipleksler arasındaki şekil farklılıklarından, kitozan-TPP nanopartiküllerinin oluşumunun sadece pDNA ve kitozan arasındaki elektrostatik etkileşimler tarafından değil, aynı zamanda TPP ve kitozan arasındaki elektrostatik etkileşimler tarafından da yönetildiği anlaşılabılır. Kitozanın nanopartiküler yapıdaki kontrollü jelleşmesinden sorumlu olan kitozan-TPP etkileşimi,

elde edilen nanopartiküllerin basit komplekslere göre neden daha küresel ve kompakt yapıda olduğunu açıklayabilmektedir [131].

Raja vd. [132], siRNA yüklü kitozan kompleksleri ve nanopartikülleri, sırasıyla basit kompleksleştirme ve iyonik jelasyon yöntemleriyle başarıyla sentezlemiş ve iyonik jelasyon yönteminin daha iyi bir yöntem olduğu bildirmişlerdir. Çünkü bu yöntemle elde edilen kitozan nanopartiküller, kitozan komplekslerle kıyaslandığında daha küçük partikül oluşumunu sağlamış, böylece siRNA'nın hedef hücrelere etkili bir şekilde iletilmesinde daha uygun olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca farklı sıcaklıklarda daha iyi saklama stabilitesi sergilemiş ve sağlıklı hücrelerde daha az toksisiteye sebep olmuştur. Komplekslerin sitotoksitesinin daha yüksek olmasının, yüksek pozitif zeta potansiyelinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir.

Raja vd. [133], yaptıkları bir başka çalışmada ise, siRNA yüklü kitozan nanopartikülleri, üç farklı çapraz bağlayıcı olan, TPP, dekstran sülfat ve poli-D-glutamik asit kullanılarak iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlamışlardır. TPP ile, yüksek tutma ve bağlama verimliliğine sahip, en küçük partikül boyutuna sahip nanopartiküller üretilmiştir. İncelenen çapraz bağlayıcılardan yine TPP ile elde edilen nanopartiküllerin, siRNA'nın yavaş "*burst release*" davranışını sağlayan en kararlı sistem olduğu bildirilmiştir. Hücresel alım çalışmalarıyla siRNA'nın, kitozan-TPP nanoparçacıklarından sitoplazmaya başarılı bir şekilde iletildiği doğrulanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deneysel kısmı, Erasmus+ Öğrenci Hareketliliği kapsamında Liverpool John Moores Üniversitesi Eczacılık ve Biyomoleküler Bilimler Okulu'nda Prof. Dr. Imran Saleem'in laboratuvarında başlamıştır. Liverpool John Moores Üniversitesi'ndeki ön deneysel çalışmalar, özellikle hücre kültürü sisteminde yürütülen gen ekspresyon çalışmalarını, tez öğrencisinin hem ilk kez olarak hem de bir yurt dışı laboratuvar ortamında öğrenmesi ve deneyimlemesi açısından önemli bir katkı sunmuştur.

3.1. Kullanılan Aletler

Altın Kaplama Cihazı (SEM numune hazırlık)	³ Agar Sputter Coater (AGB7340) / İngiltere
Biyogüvenlik Kabini (Sınıf II)	¹ Thermo Scientific MSC Advantage / Almanya ² Kojair® BlueSeries Technology / Finlandiya
Buzdolabı (4°C ve -20°C)	¹ Arçelik 270480 MB/ Türkiye ⁴ Arçelik 5231 NFY / Türkiye
Distile Su Cihazı	^{1,2} Millipore Milli-Q / Amerika
Dondurucu (-80°C)	¹ Thermo Scientific T Series / Çek Cumhuriyeti
Etüv	¹ Wisd WiseVen WON-32 / Güney Kore
FT-IR Spektrometresi	³ PerkinElmer UATR Two / İngiltere
Güç Ünitesi	¹ Bio-Rad / Amerika ² Cleaver Scientific / İngiltere
Hassas Terazı	¹ A & D (GR-200) / Japonya ² Ohaus / Amerika
Hemasitometre	¹ Katalog No: 1103/Çin ² Hausser Scientific / Amerika
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	¹ Wisd WiseStir SMHS-6 / Güney Kore ² Stuart US152 / İngiltere ³ Weightlab Instruments (WN-10H-120) / Türkiye
Jel Elektrophorez Tankı	¹ Cleaver Scientific / İngiltere ² Scie-Plas / Amerika

Jel Görüntüleme Cihazı	¹ Fusion Fx Vilber Lourmat / Fransa ² Bio-Rad Gel Doc™ EZ Imager / Amerika
Karbondioksit İnkübatörü	¹ Thermo Scientific Forma Direct Heat / Amerika ² Binder C150 / Almanyaya
Konfokal Mikroskop	¹ Leica DFC365 FX / Almanyaya
Kuru Blok Isıtıcı	² Grant QBD2 / İngiltere
Liyofilizatör	¹ SP VirTis Advantage Plus EL-85 / Amerika ² HyperCOOL HC3110 / Kore
Mikroplaka Floresans Okuyucu	¹ Bio-Tek FLx800 / Amerika ² BMG Labtec (CLARIOstar) / Almanyaya
Mikroplaka Spektrofotometre	¹ Bio-Tek Epoch / Amerika ² BMG Labtec (CLARIOstar) / Almanyaya
Mikrosantrifüj Cihazı	^{1,3} Weightlab Instruments (WN-CMV6000) / Türkiye ² MSE / Fransa
Orbital Çalkalayıcı	² Stuart SSM1 / İngiltere
Otoklav	¹ Tuttnauer 2840EL-D / Hollanda
Otomatik Mikropipet	¹ Eppendorf (Research Plus) / Almanyaya ^{1,2} Thermo Scientific (Finnpipette Systems) / Amerika ² Gilson (PIPETMAN Classic™) / Fransa
Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçüm Cihazı	^{1,2,4} Malvern (ZetaSizer Nanoseries Nano-ZS) / İngiltere
PCR Cihazı	¹ Bio-Rad CFX96 / Almanyaya ² Qiagen Rotor-Gene Q / Almanyaya
pH Metre	¹ Hanna HI 2002-02 edge / Amerika
Pipet Tabancası	¹ Thermo Scientific (S1 Pipet Filler) / Amerika ² SLS Lab Basics / İngiltere
Santrifüj Cihazı	^{1,2} Eppendorf (Centrifuge 5810 R) / Almanyaya ² Eppendorf (Centrifuge 5418) / Almanyaya ¹ Beckman Coulter Allegra X22 R / Amerika
Spektrofotometre (UV-Vis)	¹ BioTek (Epoch) / Amerika ² Thermo Scientific (Nanodrop 2000) / Amerika

Stabilite Kabini (25 °C)	⁴ Stabilite Odası-1 A1041b
Stabilite Kabini (40 °C)	⁴ Osworld OSC G-34 / Hindistan
Su Banyosu	¹ Bandelin Sonorex (RK 514 H) / Almanya ² Julabo TW20 / Almanya
Svı Azot Tankı	¹ Arpege / Fransa
Taramalı Elekton Mikroskobu	³ Zeiss (Evo LS 10) / Almanya
Ters (Inverted) Mikroskop	¹ Olympus CKX71 / Japonya ² Leica DM IL LED / Almanya
Ultrasonik Su Banyosu	¹ Bandelin Sonorex / Almanya
Vorteks	¹ IKA / Almanya

¹ İstanbul Üniversitesi'nde kullanılan aletlerdir.

² Liverpool John Moores Üniversitesi'nde kullanılan aletlerdir.

³ Trakya Üniversitesi'nde kullanılan aletlerdir.

⁴ Farmatek Ar-Ge Merkezi'nde kullanılan aletlerdir.

3.2. Kullanılan Maddeler ve Sarf Malzemeleri

12-Kuyucuklu Plaka (Steril)	² Thermo Scientific / Amerika
24-Kuyucuklu Plaka (Steril)	¹ Costar® / Amerika
96-Kuyucuklu Plaka (Steril, Siyah)	^{1,2} Corning® / Amerika
96-Kuyucuklu Plaka (Steril)	¹ Sarstedt / Almanya ² Falcon® / Amerika
A549 Hücreleri	² ATCC / Amerika
Absolut Etanol	² Merck / Amerika ² Fisher BioReagents™ / İngiltere
Agaroz	^{1,2} Bioline (BIO-41026) / İngiltere

Antisense LNA™ GapmeR Kontrol (3' 6-FAM etiketli)	^{1,2} Qiagen (339515) / Almanya
Antisense LNA™ GapmeR Standartları	^{1,2} Qiagen (339511) / Almanya
Besiyeri (A549 Hücreleri)	² Sigma (D5671-500 ML) / İngiltere
Besiyeri (Calu-3 Hücreleri)	¹ Multicell EMEM (320-026-CL) / Kanada ² Sigma (M8042-500 ML) / İngiltere
Calu-3 Hücreleri	^{1,2} ATCC / Amerika
DNA İşaretleyicisi (Ladder)	¹ Biobasic (GM303) / Amerika ² Bioline (HyperLadder™ 25bp) (BIO-33031) / İngiltere
Elektroforez yükleme tamponu	¹ GoldBio (L002-5) / Amerika ² Bioline (BIO-37045) / İngiltere
Etidyum Bromür Çözeltisi (10 mg/mL)	¹ Biobasic (D0197) / Amerika ² Sigma (E1510-10ML) / Amerika
Fetal Bovin Serum	¹ Diagnostovum (D151-500ML) / Almanya ² Sigma / Brezilya
Fosfat Tampon Çözeltisi	¹ Diagnostovum / Almanya
Fosfat Tampon Tuzu Tableti	² Fisher BioReagents™ / İngiltere
Gen Primer Karışımı (UCA-1 geni için)	^{1,2} Primerdesign (SY-hu-600) / İngiltere
Gen Primer Karışımı (GAPDH kontrol geni için)	^{1,2} Qiagen QuantiTect Primer Assays (QT00079247) / Almanya
Gömme Ortamı (DAPI boyası içeren)	¹ Invitrogen (P36935) / Amerika
Hidroklorik Asit (HCl)	¹ Merk (106498) / Amerika
Hücre Kültürü Kabı (Flask) (75 cm ² , 25 cm ²)	¹ Nest / Çin ¹ Corning / Amerika ² Sarstedt / Almanya
Kitozan HCl (Deasetilasyon Derecesi: %80-95) (Molekül Ağırlığı: 30-200 kDa)	^{1,2} Heppe Medical Chitosan (HMC) (43001) / Almanya
Kriyovial	¹ Corning / Amerika ² Sarstedt / Almanya

L-Glutamin Çözeltisi (200 mM)	² Sigma (59202C) / İngiltere
Mikropipet Uçları	¹ Isolab / Türkiye ² VWR / İngiltere ² Gilson (Diamond) / Fransa
Mikropipet Uçları (Filtreli)	¹ Biobasic / Amerika ² SLS Lab Basics / İngiltere
Mikrosantrifüj Tüpleri	¹ Nest / Çin ² Axygen / Amerika
MTT	¹ GoldBio (T-030-1) / Amerika ² Alfa Aesar (L11939) / Amerika
Nükleaz İçermeyen Su	¹ Biobasic / Amerika ² Ambion / Amerika
Otoklav Bandı	¹ Isotherm / Türkiye
Paraformaldehit	¹ Sigma-Aldrich / Amerika
Partikül Boyutu Ölçüm Küveti	¹ Malvern (DTS0012) / İngiltere ² Malvern (ZEN0040) / İngiltere
PCR Karışımı (SYBR® yeşil ilaveli)	^{1,2} Primerdesign (PPLUS-SY-10ML) / İngiltere
PCR Plakası (100 µl, 96 kuyucuk)	¹ Nest (402812) / Çin
PCR Strip Tüpler (0.1 mL)	² Qiagen (981103) / Almanya
PCR Tüpleri	² Axygen / Amerika
Penisilin / Streptomisin	¹ Diagnostivum (D910-100ML) / Almanya ² Sigma-Aldrich / Amerika
RNA Miktar Tayini Kiti (QuantiFluor® RNA System)	^{1,2} Promega (E3310) / Amerika
RNA Saflaştırma Kiti	¹ Biobasic (BS584) / Amerika ² Jena Biosence (PP-210S) / Almanya
RNaz içermeyen DNaz Set	^{1,2} Qiagen (79254) / Almanya
RNaz Temizleme Ajanı	¹ Biobasic (DB0339) / Amerika ² Invitrogen / Amerika

Santifügal Konsantratör (Vivaspin®2)	¹ Sartorius (VS0201) / Fransa
Sodyum Hidroksit (NaOH)	¹ Merk (106498) / Amerika
Sodyum Tripolifosfat (Na ₅ P ₃ O ₁₀)	^{1,2} Sigma-Aldrich (238503) / Amerika
Steril Falcon Tüpleri (15 mL, 50 mL)	¹ Nest / Çin ² SLS Lab Basics / İngiltere
Steril Pipet (5 mL, 10 mL, 25 mL)	¹ Sarstedt / Almanya ² Falcon / Amerika
Şırınga Ucu Filtre (0.45 µm)	^{1,2} Sartorius Stedim Biotech (Minisart NY 25) / İngiltere
TBE (Tris-Borat-EDTA) Tamponu	¹ Biobasic (A00269) / Amerika
TE tamponu (nükleaz içermeyen) (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.5)	² Sigma / Amerika
Ters Transkriptaz Kiti (miScript II RT Kit)	^{1,2} Qiagen (218161) / Almanya
Tripan Mavisi (%0,4)	^{1,2} Merck (T8154) / Almanya
Trypsin - EDTA	¹ Multicell (325-043-EL) / Kanada ² Sigma / Amerika
Zeta Potansiyel Ölçüm Küveti	^{1,2} Malvern (DTS1070) / İngiltere

¹ İstanbul Üniversitesi'nde kullanılan malzemedir.

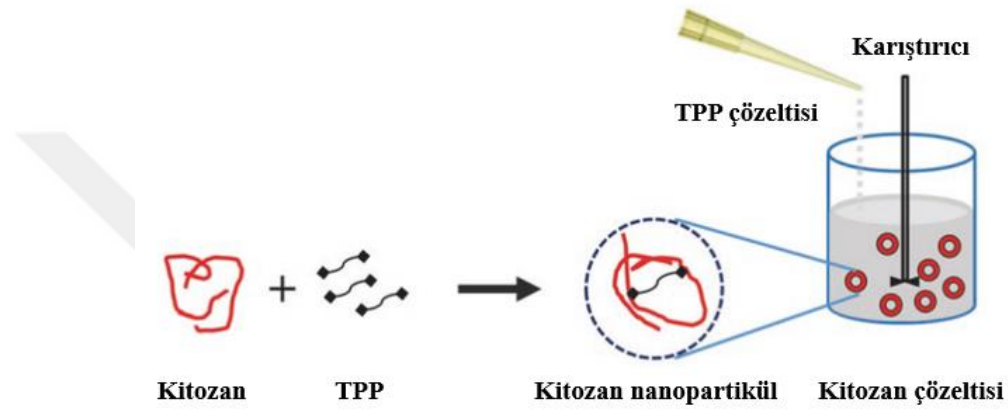
² Liverpool John Moores Üniversitesi'nde kullanılan malzemedir.

3.3. Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında kitozan nanopartiküller, literatürde de sıklıkla kullanılan bir yöntem olan iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanmıştır [122,123,125,130–133]. Bunun için öncelikle, distile su kullanılarak kitozan ve sodyum tripolifosfat (TPP) çözeltileri hazırlanmıştır. Ön formülasyon çalışmaları sonucunda, her iki çözeltinin de 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmasına karar verilmiştir. Bu iki maddenin istenen konsantrasyondaki çözeltileri, tartılan her bir madde, uygun hacimde distile suda, manyetik karıştırıcı (Wisd WiseStir SMHS-6, Güney Kore) yardımıyla ayrı ayrı

çözündürülerek hazırlanmıştır. Daha sonra çözeltiler, olabilecek bir kirlilikten arındırılmak üzere 0.45 µm'lik filtreden (Sartorius Minisart NY 25, İngiltere) geçirilerek süzümüştür.

TPP çözeltisi, mikropipet yardımıyla manyetik karıştırıcı üzerinde karışmakta olan kitozan çözeltisinin üzerine damla damla ilave edilmiş ve bu şekilde iki çözelti birleştirilmiştir (Şekil 3-1) [134].



Şekil 3-1: Boş Kitozan Nanopartiküllerin İyonik Jelasyon Yöntemiyle Hazırlanması

Damlatma hızı 1.2 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır. TPP ilavesi sona erdikten sonra, karıştırma işlemi 30 dakika daha devam ettirilmiştir. Karıştırmanın ardından 30 dakika dinlenme süresinden sonra, elde edilen nanopartikül dispersiyonunun gerekli analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.4. Nanopartiküllerin Boyut ve Boyut Dağılımı Ölçümü

Nanopartiküllerde boyut ve boyut dağılımının göstergesi olan polidispersite indeksi (PDI), ZetaSizer Nanoseries Nano-ZS cihazı (Malvern, İngiltere) kullanılarak ölçümüştür. Bu cihaz, boyut ölçümünü Dinamik Işık Saçılımı (DLS) denen bir yöntem yardımıyla gerçekleştirmektedir. Foton Korelasyon Spektroskopisi olarak da bilinen DLS, Brown hareketini ölçer ve bunu partiküllerin boyutu ile ilişkilendirir.

Pratikte, bir sıvı içinde asılı kalan parçacıklar asla sabit değildir. Tanecikler Brown hareketi nedeniyle sürekli hareket ederler. Brown hareketi, bir sıvı içerisindeki

partiküllerin, kendilerini çevreleyen sıvı molekülleri tarafından bombardımanı nedeniyle oluşan, rastgele hareketidir. DLS için Brown hareketinin önemli bir özelliği, küçük partiküllerin hızlı, büyüklerin ise daha yavaş hareket etmesidir. Bir partikülün boyutu ile Brown hareketi nedeniyle hızı arasındaki ilişki Denklem-1'de verilen Stokes-Einstein eşitliğinde tanımlanır [135].

$$D_H = \frac{k T}{3 \pi \eta D} \quad (3-1)$$

Stokes-Einstein Eşitliği'ndeki sembollerin ifade ettikleri kavramlar aşağıdaki gibidir:

D_H	: Hidrodinamik çap
k	: Boltzmann katsayısı
T	: Mutlak sıcaklık
η	: Solvent vizkozitesi
D	: Difüzyon katsayısı

Eğer sabit küçük bir partikül, lazer gibi bir ışık kaynağı tarafından aydınlatılırsa, ışığı her yöne saçacaktır. Partiküle yakın mesafede bir ekran tutulduğunda ekran, saçılan ışık tarafından aydınlatılacaktır. Bu şekilde binlerce partikülün meydana getirdiği ışık saçılımı, aydınlık ve karanlık alanlardan oluşan bir leke deseni (speckle pattern) meydana getirir.

Sıvı ortamdaki partiküller ise sürekli hareket halinde olduğu için leke deseni de hareket ediyor gibi görünecektir. Partiküllerin hareket ediyor oluşu, aydınlık ve karanlık alan yoğunluklarının artıp azalmasına veya başka bir deyişle, herhangi bir noktadaki yoğunluğun dalgalı olarak görünmesine sebep olur. İşte, DLS tekniğiyle ölçülen parametre, ışık saçılımındaki bu yoğunluk dalgalanmasıdır. Bunun için, parçacıklar bir lazer ile aydınlatılıp saçılan ışıktaki yoğunluk dalgalanmaları analiz edilir. Büyük partiküller yavaş hareket ettikleri için leke deseninin yoğunluğu da yavaşça dalgalanır. Benzer şekilde, küçük partiküller hızlı hareket ettikleri için leke deseninin yoğunluğu da hızla dalgalanır. Yoğunluk dalgalanmalarının ölçümü ardından, bu veri partiküllerin

boyutunun hesaplanmasında kullanılır. Bu cihazın partikül çapı ölçüm aralığı, 0,3 nm ile 10 µm arasındadır [135].

Üretilen nanopartikül dispersiyonları herhangi bir seyreltme işlemi yapılmadan, polistiren örnek küvetine doldurulmuş ve ölçümler 25°C’de, 173°’lik geri saçılım ile gerçekleştirilmiştir. Cihaz, her bir numune için ölçüm sayısı üç olacak şekilde ayarlanmıştır. Her ölçüm de on adet alt ölçümden oluşturulmuştur. Z-ortalama çapı, ZetaSizer Versiyon 8.01.4906 yazılımı aracılığıyla elde edilmiştir.

Partikül boyut dağılımı ise polidispersite indeksi (PDI) ile ifade edilir. 0,05’ten daha küçük PDI değerleri nadiren görülür. 0,7’den büyük PDI değerleri, numunenin çok geniş bir boyut dağılımına sahip olduğunu ve muhtemelen DLS tekniği için uygun olmadığını gösterir [136].

3.5. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Ölçümü

Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri ZetaSizer Nanoseries Nano-ZS cihazı (Malvern, İngiltere) kullanılarak elde edilmiştir. Bu cihaz ile esasında, elektroforetik hareketlilik belirlenmektedir. Elektroforetik hareketlilik değerinin belirlenmesi için örnek üzerinde bir elektroforez deneyi gerçekleştirilir ve Lazer Doppler Velosimetri kullanılarak partiküllerin hızı ölçülür. Bunun için, bir potansiyelin uygulandığı, her iki ucu elektrotlu kapiler ölçüm hücresi kullanılır. Partiküller, karşıt yükün elektroduna doğru hareket eder ve hızları ölçülür.

Elde edilen elektroforetik hareketlilik verisi Denklem 3-2’de verilen Henry Eşitliği’ne uygulanarak zeta potansiyel hesaplanır.

$$U_E = \frac{2 \varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (3-2)$$

Henry Eşitliği’ndeki sembollerin ifade ettikleri kavramlar aşağıdaki gibidir:

- z : Zeta potansiyel (mV)
- U_E : Elektroforetik hareketlilik (m/s)
- ε : Dielektrik sabiti (C/V)
- η : Vizkozite (Pa.s)
- $f(ka)$: Henry fonksiyonu (sulu ortam için 1.5; susuz ortam için 1.0’dır.)

Tez çalışmasındaki numuneler sulu ortamda bulundukları için, yazılımda $f(ka)$ modeli belirleme adımında, Smoluchowski yaklaşımı seçilerek, $f(ka)$ değeri 1,5 olarak kullanılmıştır.

ZetaSizer Nanoseries Nano-ZS cihazıyla, 3,8 nm - 100 μ m çapındaki partiküllerin zeta potansiyeli ölçülebilmektedir [135]. Üretilen nanopartikül dispersiyonları herhangi bir seyreltme işlemi yapılmadan, kapiler elektroforez hücresine doldurulmuş ve ölçümler 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Cihaz, her bir numune için ölçüm sayısı üç olacak şekilde ayarlanmıştır. Her ölçüm de on adet alt ölçümden oluşturulmuştur. Zeta potansiyel, ZetaSizer Versiyon 8.01.4906 yazılımı aracılığıyla elde edilmiştir.

3.6. Boş Nanopartiküllerin Optimizasyon Çalışması

Kitozan ve TPP çözeltileri, iyonik jelasyon yoluyla nanopartikül oluşturmak üzere, farklı koşullarda bir araya getirilmiştir. Bu koşulların nanopartikül oluşumuna ve nanopartiküllerin boyutu ile zeta potansiyeline etkisi incelenmiştir. Böylece nanopartikül oluşumu için optimum koşullar deneysel olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Söz konusu farklı koşullar; **i.** kitozan/TPP kütle oranı, **ii.** kitozan çözeltisinin pH'sı, **iii.** iki çözeltinin birleştirilmesi sırasındaki karıştırma hızıdır.

Öncelikle kitozan ve TPP'nin değişik kütle oranları çalışılmıştır. Kitozan ve TPP çözeltilerinin her ikisinin de konsantrasyonu 1 mg/ml olduğundan, iki madde çözeltilerinin hacmen birleştirilme oranları, aynı zamanda bu iki maddenin nanopartikül dispersiyonundaki kütle oranlarına denktir. Tez çalışmasında literatür verilerinden yola çıkılarak, kitozan/TPP kütle oranları, [3.0:1], [3.5:1], [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1], [6.0:1] olacak şekilde, farklı formülasyonlar denenmiştir.

Kitozan/TPP kütle oranları [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için üç farklı pH'ya sahip kitozan çözeltisiyle ve iki farklı karıştırma hızı uygulanarak elde edilen nanopartiküller incelenmiştir. 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan kitozan çözelti pH'sının yaklaşık 4.0 olduğu tespit edilmiştir. pH'sı 4.5 ve 5.0 olan kitozan çözeltileri de, polimer çözeltileri manyetik karıştırıcıda karıştığı esnada bu çözeltilere 0.02 M NaOH çözeltisinin, damla damla eklenmesiyle elde edilmiştir. TPP çözeltileri, üç farklı pH'daki kitozan çözeltilerine, daha önce belirtildiği damlatma hızıyla eklenmiştir. Ekleme işlemi sırasında da, 300 rpm ve 600 rpm olmak üzere iki farklı karıştırma hızı uygulanmıştır. Bu

şekilde optimizasyon çalışmaları kapsamında, üç farklı kitozan/TPP kütle oranı için, kitozan çözelti pH'sının yanı sıra, karıştırma hızının partikül boyutu ve zeta potansiyel üzerinde etkili olup olmadığı incelenmiştir. Bahsedilen farklı parametrelerle hazırlanan 18 adet formülasyon Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Optimizasyon Çalışmaları Kapsamında Farklı Parametreler ile Hazırlanan Boş Nanopartikül Formülasyonları

Formülasyon No	Kitozan/TPP Kütle Oranı	Kitozan Çözelti pH'sı	Karıştırma Hızı (rpm)
1	[5.0:1]	pH 4.0	300
2			600
3		pH 4.5	300
4			600
5		pH 5.0	300
6			600
7	[5.5:1]	pH 4.0	300
8			600
9		pH 4.5	300
10			600
11		pH 5.0	300
12			600
13	[6.0:1]	pH 4.0	300
14			600
15		pH 4.5	300
16			600
17		pH 5.0	300
18			600

3.7. Liyofilizasyon Sonrası Disperse Edilen Boş Nanopartiküller

Nanopartikülleri uzun süre saklayabilme amacına yönelik olarak liyofilizasyon işlemi denenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen formülasyonun boyut ve zeta potansiyel ölçümleri Bölüm 3.4 ve 3.5'te anlatıldığı şekilde alınmıştır. Daha sonra nanopartikül dispersiyonları, liyofilizatörde (SP VirTis Advantage Plus EL-85, Amerika)

24 saat tutularak dondurarak kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen liyofilize toz halindeki nanopartiküller, yeniden ilk hacimleri kadar distile suyla sulandırılmış, ardından tekrar boyut ve zeta ölçümü alınmıştır. Bu şekilde, nanopartiküllerin liyofilizasyon işlemi sonrasında, bu işlemden önceki boyut ve zeta potansiyel değerlerine yeniden sahip olup olmadığı incelenmiştir. Yeniden sulandırma sonrasında liyofilize toz kolayca dağılmadığından, dispersiyon 1 dakika ve 15 dakika sürelerle ultrasonik banyoda (Bandelin Sonorex, Almanya) tutulduktan sonra da ölçümler alınmıştır.

3.8. Boş Nanopartiküllerin Dispersiyon Stabilitesi

Nanopartiküllerin dispersiyon stabilitesi, hem saatlik hem haftalık olarak, partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü alınarak incelenmiştir.

Formülasyonlar pH'sı 4.0 olan kitozan çözeltisiyle ve 600 rpm karıştırma hızıyla hazırlanmıştır.

5 saatlik dispersiyon stabilitesi, kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1] ve [5.5:1] olan formülasyonlar için, saat başı ölçüm alınarak incelenmiştir.

Haftalık dispersiyon stabiliteleri ise, kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için, $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı sıcaklıkta incelenmiştir.

3.9. Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammaddesinin FT-IR Spektrumları

Hem Kitozan HCl hammaddesinin hem de nanopartiküllerin FT-IR (Fourier dönüşümlü - kızılötesi) spektrumu çekilmiştir. Spektrum çekimleri için toz halde bulunan Kitozan HCl hammaddesi ve optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen, liyofilize edilip (HyperCOOL HC3110, Kore) toz hale getirilen nanopartikül dispersiyonu kullanılmıştır. Ölçümler, $450\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında, FT-IR spektrometresi (PerkinElmer UATR Two, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kitozan HCl hammaddesinin bantları ve hazırlanan boş nanopartiküllere ait bantlar kıyaslanmış, bant farklılıkları nanopartikül oluşumu açısından yorumlanmıştır.

3.10. Boş Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopi Analizi

Taramalı elektron mikroskopi (SEM) analizi için öncelikle numune hazırlığı gerçekleştirilmiştir. Bunun için optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen nanopartikül dispersiyonunun bir damlası, numune tablasına yapıştırılmış çift taraflı karbon bant üzerine damlatılarak yayılmıştır. Damlanın oda sıcaklığında kuruması beklenmiştir. Kuruyan numuneler öncelikle herhangi bir kaplama işlemi yapılmadan incelenmiş ve görüntü alınmıştır. Fakat netliğin ayarlanması sırasında numune, elektron bombardımanı sebebiyle kısa bir süre sonra zarar gördüğünden kaplama cihazıyla (Agar Sputter Coater AGB7340, İngiltere) altın kaplama işlemi de gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde numune, hem iletken hale getirilmiş hem de elektron bombardımanından korunarak daha rahat çalışma imkanı sağlanmıştır. Numuneler, taramalı elektron mikroskobunun (Zeiss Evo LS 10, Almanya) içine yerleştirilerek, bunlara ait çeşitli büyütmelelerde görüntüler elde edilmiştir. Numunelerin altın kaplama işlemi ve taramalı elektron mikroskobunda görüntülenmesi, Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (TÜTAGEM)’nde gerçekleştirilmiştir.

3.11. Boş Nanopartiküllerin Saflaştırılması

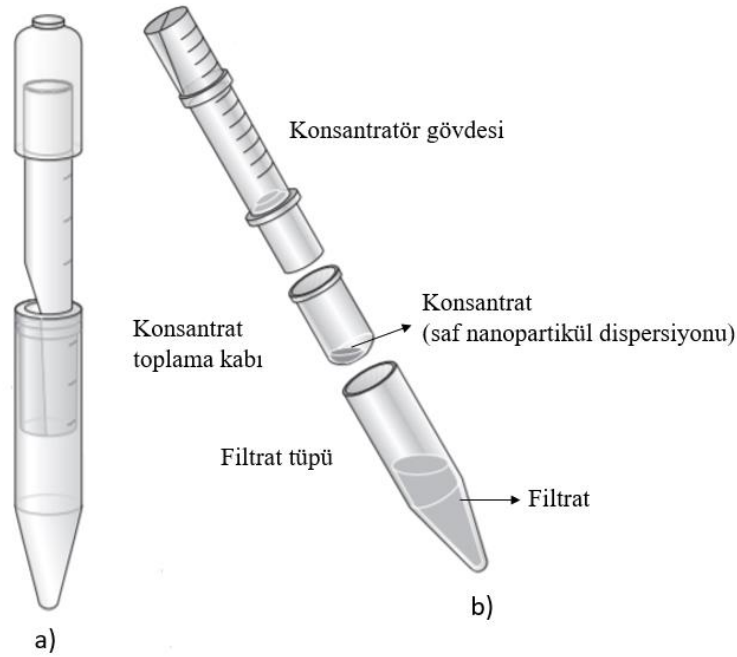
Optimizasyon işlemleri sonucu seçilen boş nanopartikül dispersiyonlarının öncelikle santrifüj işlemiyle saflaştırılması denenmiştir. Santrifüj işlemi öncesi saflaştırılacak formülasyonların boyut ve zeta potansiyel ölçümleri alınmıştır. Daha sonra dispersiyonlar 5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve 15000 rpm ($\sim 21000 \times g$)’de 1 saat boyunca 25°C’de santrifüj edilmiştir (Beckman Coulter Allegra X22 R, Amerika). Üstte kalan süpernatant kısmı atılmıştır. Dipte kalan pellet üzerine ilk hacmi kadar distile su eklenip, çöken nanopartiküller yeniden dağıtılmaya çalışılmıştır. Ancak pelletler, pipetaj işlemi ile dağıtılamadığından 15 dakika ultrasonik banyoda (Bandelin Sonorex, Almanya) bekletilmiştir. Ardından partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri tekrar alınmıştır. Santrifüj öncesi ve sonrası elde edilen değerler birbirleriyle kıyaslanmıştır. Yakın değerler elde edilmediğinden saflaştırma işleminin santrifüjle gerçekleştirilmemesine karar verilmiştir.

Santrifüj işleminden vazgeçilmesinin ardından nanopartiküllerin, Şekil 3-2’de [137] gösterilen Vivaspin®2 tüpleri (10.000 MWCO, membran materyali: polietersülfon) (Sartorius VS0201, Fransa) kullanılarak, santrifügal filtrasyonla saflaştırılmasına karar

verilmiştir. Bu şekilde nanopartiküller çöküp pellet oluşturmayacağından yeniden dağıtma basamağı da söz konusu olmayacak ve elde edilen saf konsantrat ilk hacmine seyreltilecektir. Bunun için, hazırlanan nanopartikül dispersiyonları Vivaspin®2 tüplerinin içine doldurulmuş ve tüpler santrifüj cihazına (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Almanya) yerleştirilerek 1000 x g’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerin gövdesinde kalan saf nanopartikül dispersiyonu, toplama kabında toplanmak üzere ters çevrilerek santrifüj cihazına tekrar yerleştirilmiş ve tüpler 3000 x g’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. (Filtrat tüpü kısmında biriken filtrat, enkapsülasyon etkinliği analizinde kullanılmadığı zamanlarda atılmıştır).

Saflaştırılacak formülasyonların boyut ve zeta potansiyel ölçümleri Vivaspin®2 tüplerine koyulmadan önce alınmıştır. Daha sonra, Vivaspin®2 tüpleriyle saflaştırma işlemi sonrası elde edilen saf nanopartikül konsantratının ve bu konsantrat suyla ilk hacmine tamamlandıktan sonra da, tekrar partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri alınmıştır. Saflaştırma öncesi ve sonrası elde edilen değerler birbirleriyle kıyaslanmıştır.

Elde edilen saf nanopartikül dispersiyonu, hücre kültürü deneylerinde ilk hacmine tamamlandıktan sonra kullanılmıştır.



Şekil 3-2: Vivaspin®2 konsantratörü a) Saflaştırma öncesi b) Saflaştırma sonrası

3.12. Antisens LNA™ GapmeR Oligonükleotitleri

Bu tez çalışmasında kullanılan Antisens LNA™ GapmeR'ler, (Qiagen, Almanya), 5'er nmol'lük liyofilize toz olarak satın alınmıştır. Hedefi olan lncRNA-UCA1'in seviyesini baskılamak üzere üç adet standart (ST) ve bir adet de negatif kontrol (NK) olmak üzere dört adet GapmeR oligonükleotidi ile çalışılmıştır. Bu oligonükleotitler, tescilli bir tasarım yazılımı kullanılarak özel ("custom design") olarak tasarlanmıştır. Standartlardan en uygun olanı ön çalışmalarla seçilerek ileri çalışmalara, seçilen tek bir standartla devam edilmiştir. GapmeR-NK, lncRNA-UCA1'i baskılamayacak özelliktedir ve oligonükleotit molekülünün varlığı dolayısıyla meydana gelebilecek hedef dışı etkileri elimine etme amaçlı kullanılmıştır. GapmeR-NK, moleküllerinin hücre içine alınıp alınmadığını yorumlayabilmek adına, 3' ucunda floresans boya (6-FAM) ile etiketli olarak satın alınmıştır. Kullanılan GapmeR'lere ait diziler Tablo 3-2'de sunulmuştur.

Tablo 3-2: Kullanılan Antisens LNA™ GapmeR Dizileri

GapmeR Adı	GapmeR Dizisi
GapmeR-NK	A* A* C* A* C* G* T* C* T* A* T* A* C* G* C* / 3' 6-FAM
GapmeR ST-1	G* G* C* G* T* G* G* A* A* A* G* T* T* A* C* A*
GapmeR ST-2	C* A* T* A* G* G* T* G* T* G* A* G* T* G* G* C*
GapmeR ST-3	G* C* G* G* C* A* G* G* T* C* T* T* A* A* G* A*

A: Adenin; G: Guanin; C: Sitozin; T: Timin; FAM: Floresein amidit

* işareti, nükleotitlerin fosforotiyoat omurgasına sahip olduğunu ifade etmektedir.

Oligonükleotitler, ekzojen nükleazlar tarafından bozunmaya karşı hassastırlar. Bu sebeple Antisense LNA™ GapmeR'lerle çalışırken, pudrasız eldivenlerle, DNaz ve RNaz içermeyen reaktiflerle ve filtreli pipet uçlarıyla çalışılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce, çalışma alanı RNaz temizleme ajanı ile silinmiştir.

3.13. GapmeR Oligonükleotitlerinin Yeniden Sulandırılması

GapmeR oligonükleotitleri liyofilize toz halde olduğundan, kullanılmadan önce sulandırılmaları (rekonstitüye edilmeleri) gerekmektedir. Bu işlem, ilgili protokolde [93] önerildiği şekliyle aşağıdaki adımlar takip edilerek gerçekleştirilmiştir:

1. Açılmadan önce tüm materyalin dipte toplandığına emin olmak için GapmeR flakonu düşük hızda (maksimum 4000 x g) kısa süre santrifüjlenmiştir.
2. Vidalı flakon kapağı dikkatlice açılarak, nükleaz içermeyen Tris-EDTA (TE) tamponu, her bir GapmeR flakonu içine 250'şer µl olarak eklenmiştir.

(Her bir vialdeki GapmeR miktarı 5'er nmol olduğundan, bu şekilde 20 mM'luk stok konsantrasyonu elde edilmiştir. Protokolde, GapmeR'lerin stok çözelti konsantrasyonlarının 10 mM'den az olmaması gerektiği bildirilmiştir.)

3. Flakon ortam sıcaklığında birkaç dakika bekletilmiştir.
4. Çözünmesi için 5 kez yavaşça pipetaj yapılmıştır.
5. 3. ve 4. adımlar tekrarlanmıştır.
6. Sulandırılmış GapmeR'ler, dondurma-çözme döngüsünün sayısını sınırlandırmak adına alikotlanmıştır ve kullanılana kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.14. GapmeR İçeren Nanopartiküllerin Hazırlanması

GapmeR (ST-1, ST-2, ST-3 ve NK) içeren nanopartiküllerin hazırlanması için öncelikle kitozan ve TPP çözeltileri, nükleaz içermeyen su kullanılarak ayrı ayrı hazırlanmıştır. Daha sonra nanopartikül dispersiyonunda 800 pmol/ml GapmeR molekülü olacak şekilde gerekli miktar GapmeR stoğundan alınıp, 1 mg/ml konsantrasyonundaki gerekli miktar TPP çözeltisine ilave edilmiştir. Pipetaj ile iki maddenin karışması sağlanmıştır. Daha sonra, GapmeR-TPP karışımı, boş nanopartiküllerin hazırlanması sırasında olduğu gibi, manyetik karıştırıcı üzerindeki 1 mg/ml konsantrasyonundaki kitozan çözeltisine damla damla ilave edilmiştir. Boş nanopartiküllerin optimizasyon çalışmalarından elde edilen veriler sonucunda, GapmeR içeren nanopartiküller oluşturulurken seçilen koşullar şu şekildedir:

1. Kitozan HCl ve TPP maddelerinin kütlece oranları [5.0:1]'dir.

2. Kitozan çözelti pH'sı yaklaşık olarak 4.0'tür. (1 mg/ml konsantrasyonundaki kitozan çözeltisinin kendi pH'sıdır. Ayrıca pH ayarlama işlemi yapılmamıştır.)
3. Kitozan çözeltisi ile gerekli miktar GapmeR-TPP çözeltisinin birleştirilmeleri esnasında karıştırma hızı 600 rpm'dir.

3.15. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Oranının Tayini

GapmeR oligonükleotitlerini içeren nanopartikül dispersiyonu, Vivaspin®2 tüpleri kullanılarak, boş nanopartiküllerde olduğu gibi Bölüm 3.11'de ifade edildiği şekilde saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası elde edilen filtratta, enkapsüle olmayan GapmeR oligonükleotitlerinin miktarı tayin edilmiştir. Bu amaçla "QuantiFluor® RNA System" (Promega, Amerika) isimli miktar tayini kiti kullanılmıştır. Bu kit, oligonükleotit miktarının floresans ölçümü aracılığıyla tayinini sağlamaktadır. Floresans ölçümünde kuyucuklar arası etkileşim olmaması adına siyah renkli 96-kuyucuklu bir plaka kullanılmıştır. Kit içinde stok RNA standardı, 20X TE tamponu ve QuantiFluor® RNA boyası bulunmaktadır. Bunlar kullanılarak öncelikle aşağıdaki üç hazırlık kit protokolü [138] doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

1. **1X TE tamponu hazırlanması:** 20X TE tamponu, nükleaz içermeyen su ile 20 kat seyreltilerek 1X TE tamponu elde edilmiştir. Örneğin, 10 ml 20X TE tamponu alınıp, 190 ml nükleaz içermeyen suya ilave edilmiş ve karıştırılmıştır.
2. **RNA boyası çalışma çözeltisinin hazırlanması:** QuantiFluor® RNA boyası, 1X TE tamponuyla 1 : 2.000 oranında seyreltilerek çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Örneğin, 4 µl QuantiFluor® RNA boyası, 7.996 µl 1X TE tamponuna ilave edilip karıştırılmıştır. Boya çözeltisini içeren tüpler alüminyum folyoya sarılarak ışıktan korunmuştur.
3. **RNA çalışma standartlarının hazırlanması:** Stok RNA standardından (100 ng/µl) hareketle çalışma standardı serisi hazırlanmıştır. Standart serisine ait konsantrasyonlar ve hazırlığına dair bilgiler Tablo 3-3'te verilmiştir.

Tablo 3-3: RNA Çalışma Standartlarının Hazırlığı

Standart No	Eklenen RNA standardı ve hacmi	Eklenen 1X TE tamponu (µl)	Standart RNA konsantrasyonu (ng/µl)	Kuyucuğa aktarılan RNA miktarı (ng/kuyucuk)
1	10 µl stok RNA (100 ng/µl)	490	2,000	20,00
2	50 µl Standart-1	50	1,000	10,00
3	50 µl Standart-2	50	0,500	5,00
4	50 µl Standart-3	50	0,250	2,50
5	50 µl Standart-4	50	0,125	1,25
6	50 µl St-5	50	0,063	0,63
7	50 µl St-6	50	0,031	0,31
8	50 µl St-7	50	0,016	0,16

Bu üç adımlı hazırlıktan sonra, 96-kuyucuklu siyah plakanın yeterli sayıda kuyucuğuna 200'er µl RNA boyası çalışma çözeltisi konulmuştur. 2'şer kuyucuk (n=2) boyanın üzerine, hazırlanan RNA standartlarından 10'ar µl ilave edilip pipetaj ile karıştırılmıştır. Böylece, Tablo 3-3'ün en son sütununda gösterilen, kuyucuk başına RNA miktarları (ng) elde edilmiştir. Aynı ekleme ve karıştırma işlemleri, blank (1X TE tamponu), nanopartikül filtratları (boş nanopartikül filtratı ve GapmeR ST-2 içeren nanopartikül filtratı) için de gerçekleştirilmiştir. Plaka, ışıktan korunarak oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir. Ölçümler floresans mikroparka okuyucu cihazıyla (Bio-Tek FLx800, Amerika) gerçekleştirilmiştir. Cihazda eksitasyon dalga boyu 485 nm, emisyon dalga boyu ise 530 nm seçilmiştir. Standartlar ve nanopartikül filtrat numunelerine ait tüm ölçüm değerlerinden, blank (1X TE tampon) değeri çıkarılarak düzeltilmiş değerler elde edilmiştir. Standart serisine ait RNA miktarlarına karşılık, düzeltilmiş floresans değerleri grafiğe geçirilmiş ve regresyon analizi yapılarak standart eğri elde edilmiştir. Bu standart eğriye ait doğru denklemi aracılığıyla GapmeR ST-2 içeren nanopartikül filtratında, enkapsüle olmamış oligonükleotit miktarı hesaplanmıştır. GapmeR ST-2 içeren nanopartikül filtratına ait değerden, boş nanopartikül filtrat numunesine ait değer çıkarılarak ikinci bir düzeltme uygulanmıştır.

Enkapsülasyon etkinliğini hesaplamak için aşağıda verilen Denklem 3-3'ten yararlanılmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği (\%)} = \frac{\text{Toplam GapmeR Miktarı} - \text{Serbest GapmeR Miktarı}}{\text{Toplam GapmeR Miktarı}} \times 100 \quad (3-3)$$

GapmeR oligonükleotitlerini içeren nanopartiküllerin yükleme oranını hesaplamak için ise aşağıda verilen Denklem 3-4 kullanılmıştır.

$$\text{Yükleme Oranı (\%)} = \frac{\text{Enkapsüle GapmeR (mg)}}{\text{Kitozan (mg)} + \text{TPP (mg)} + \text{Enkapsüle GapmeR (mg)}} \times 100 \quad (3-4)$$

3.16. Agaroz Jel Elektroforeziyle Afinite Tayini

Kitozan nanopartiküller ile GapmeR oligonükleotitlerinin afinitesi hakkında bilgi sahibi olmak için agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. %2 (a/h)'lik agaroz jel hazırlığı için gerekli miktar agaroz, gerekli hacim TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponunda, ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda ısıtılarak şeffaf hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Ardından 50-60°C sıcaklığa kadar soğuması beklenmiş ve dispersiyonun 100 ml'si için 3 µl etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml) eklenerek karıştırılmıştır. Elektroforez cihazının (Cleaver Scientific, İngiltere) tarağı, jelde kuyucuk oluşturmak üzere döküm tepsisine yerleştirilmiş ve hazırlanan agaroz dispersiyonu tepsie, kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek, dökülmüştür. Dispersiyon, jel haline geldikten sonra döküm tepsisi ile beraber elektroforez tankına alınmıştır. Tank, jelin hemen üstüne geçecek kadar TBE tamponu ile doldurulmuş ve tarak dikkatlice çekilerek jelden çıkarılmıştır. Oluşan kuyucuklardan ilkinde, jelin düzgün çalıştığına emin olmak adına DNA işaretleyicisi (ladder) uygulanmıştır. Takip eden kuyucuklara da elektroforez yükleme tamponuyla karıştırılmış numuneler, sırasıyla GapmeR ST-2 nanopartikül, GapmeR ST-2 oligonükleotit (pozitif kontrol) ve boş nanopartikül (negatif kontrol) yüklenmiştir. Nanopartikül formülasyonu için kullanılan oligonükleotit miktarıyla aynı miktarda serbest oligonükleotit uygulanmıştır. Ardından 60-80 V'luk elektrik akımı başlatılarak numuneler jelde

yürütülmüştür. 45 dakika sonra elektrik akımı kesilmiş ve görüntüleme cihazına (Fusion Fx Vilber Lourmat, Fransa) yerleştirilen jelin fotoğrafı alınmıştır.

3.17. Hücre Kültürü Çalışmaları

Bu tez çalışmasında ilk aşamada akciğer kanseri hücre hatlarından, Calu-3 (insan bronş epitel hücresi) ve A549 (insan alveol epitel hücresi) ile çalışılmaya başlanmıştır.

Calu-3 hücreleri için tam kültür ortamı olarak, 100 U/ml penisilin, 100 µg /ml streptomisin, 2 mM L-glutamin ve %10 (h/h) fetal bovin serum (FBS) içeren EMEM kullanılmıştır. A549 hücreleri için tam kültür ortamı olarak, 100 U/ml penisilin, 100 µg /ml streptomisin, 2 mM L-glutamin ve %10 (h/h) FBS, içeren DMEM kullanılmıştır.

Dondurulmuş hücrelerin çözülmesi, beslenmesi ve pasajlanması işlemleri için, hücrelerin tedarik edildiği ATCC protokolü izlenmiştir [139].

Dondurulmuş hücelere ait kriyovial, sıvı azot tankından alınıp 37°C'lik su banyosunda hafifçe sallanarak yaklaşık 2 dakika gibi bir sürede hızlıca çözündürülmüştür. Hemen ardından hücre viali %70'lik etanol ile dekontamine edilerek, sınıf II biyogüvenlik kabinine (Thermo Scientific MSC Advantage, Amerika) alınmış ve bundan sonra tüm işlemler aseptik koşullarda yürütülmüştür. Vial içindeki hücreler, tam kültür ortamı içeren santrifüj tüpüne aktarılmış ve tüp 130 x g'de 5 dakika döndürülmüştür. Süpernatant atılmış, dipteki hücre pelleti tam kültür ortamı ile yeniden dağıtılıp, kültür kabına (flask) aktarılmıştır. Hücreler inkübatörde (Thermo Scientific Forma Direct Heat, Amerika), 37°C de %5 CO₂ içeren atmosferde inkübe edilmiştir. Tam kültür ortamı, her 2-3 günde bir değiştirilmiş ve hücrelerin durumu ters mikroskop (Olympus, Japonya) aracılığıyla kontrol edilmiştir.

Hücreler, bulundukları kültür kabında %80-90 sıklığa (konfluent duruma) eriştiğinde tripsinize edilerek yeni kültür kaplarına pasajlanmıştır. Pasaj işlemi için, yüzeyi dekontamine edilerek kabin içerisine alınan kültür kabından, eski kültür ortamı steril pipet yardımıyla çekilip atılmıştır. Hücreler, fosfat tamponu çözeltisi (PBS) ile iki kez yıkanarak tripsini inhibe edebilecek serum kalıntısı uzaklaştırılmıştır. Ardından hücrelerin yüzeyini örtecek kadar tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek, kültür kabı inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin kültür kabının tabanından kalkıp kalkmadığı mikroskoptan bakılarak kontrol edilmiştir. Calu-3 hücreleri için bekletme süresi yaklaşık

15 dakika, A549 hücreleri için ise yaklaşık 3 dakika olmuştur. Kümeleşmenin önüne geçmek için, bekleme süresi boyunca kültür kabı sallanmamış veya kültür kabına vurulmamıştır. Hücrelerin kalktığı görüldükten sonra kültür kabına tripsini inhibe etmek üzere, eklenen tripsin-EDTA hacminin 2-3 katı kadar, %10 (h/h) FBS içeren tam kültür ortamı eklenmiş ve nazikçe pipetaj yapılarak hücreler birbirinden ayrılmıştır. Ardından yeni kültür kaplarına pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Hücre sayımı gerektiren işlemlerde %0,4 (a/h)'lik tripan mavisi kullanılarak sayım yapılmıştır. Bunun için hücre dispersiyonunun ve tripan mavisinin eşit hacimleri steril bir mikrosantrifüj tüpünde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Bu karışım hemositometreye alınmış ve hücreler mikroskop altında sayılmıştır. Sayım değeri, (tripan mavisi ile 1:1 oranındaki seyreltmeden dolayı) 2 ile, ve (sayımın yapıldığı hacim 0,1 mm³ olduğundan) 10⁴ ile çarpılarak, ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır.

Liverpool John Moores Üniversite'nde yürütülen ön çalışmayla, bu tez çalışmasında baskılanması hedeflenen lncRNA-UCA1 seviyesinin Calu-3 hücre hattında daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sebeple hücre kültürü çalışmalarına Calu-3 hücre hattı ile devam edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları kapsamında, Calu-3 hücre hattıyla sitotoksosite, konfokal mikroskopi ve ekspresyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmaların yöntemlerine aşağıda alt başlıklar halinde değinilmiştir.

3.17.1. Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite çalışması için MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testinden faydalanılmıştır. MTT testi, çoğalma ve sitotoksosite çalışmalarında yaşayan hücre yoğunluğunun tespiti için kullanılan, enzim aktivitesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. MTT soluk sarı renkli bir substrat olup, canlı hücrelerle inkübe edildiğinde koyu mavi-mor renkli bir formazan ürününe dönüşür. Bu dönüşüm sadece yaşayan, metabolik olarak aktif hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir ve geniş bir aralıkta, oluşan formazan miktarıyla canlı hücre sayısı doğru orantılıdır. Formazan kristalleri suda çözünmediğinden, organik çözücü veya sürfaktanlar ile çözündürme basamağı gerekir. Metot, ilk defa 1983 yılında Mosmann tarafından immünolojik çalışmalar için hızlı bir kolorimetrik yöntem olarak tanımlanmıştır [140].

MTT testi için, hücre kültürü kabından tripsinize edilerek kaldırılan Calu-3 hücreleri, tripan mavisi ile sayılarak 96-kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Hücreler sayıldıktan sonra hücre dispersiyonu, 100.000 hücre/ml olacak şekilde seyreltilmiş ve her kuyucuğa 100 µl hücre dispersiyonu koyulmuştur. Böylece kuyucuk başına 10.000 hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan 96-kuyucuklu plakalar, hücrelerin tutunabilmesi ve çoğalması için 48 saat boyunca inkübatörde 37°C’de, %5 CO₂ içeren atmosferde bekletilmiştir. 48 saat sonunda ortam atılmış, tam kültür ortamıyla 1/4, 1/16 ve 1/64 oranlarında seyreltilmiş olan 100’er µl kitozan çözeltisi, boş nanopartikül formülasyonu, GapmeR ST-2 içeren nanopartikül formülasyonu ve tek konsantrasyonda (50 nM) serbest GapmeR ST-2 oligonükleotidi hücrelere uygulanmıştır (n=6). GapmeR ST-2 içeren nanopartikül formülasyonlarının 1/4, 1/16 ve 1/64 seyreltme oranlarına göre içeriğindeki GapmeR ST-2 konsantrasyonu sırasıyla 200 nM, 50 nM ve 12.5 nM’dir. Numunelerden kitozan çözeltisi için, nanopartikül formülasyonları hazırlanırken kullanılan TPP çözeltisinin hacmi kadar su, 1 mg/ml konsantrasyonundaki kitozan çözeltisine eklenmiştir. Bu şekilde kitozan konsantrasyonları eşitlenen çözelti ve nanopartikül numunelerinin sitotoksitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Plakalar 2 saat boyunca inkübatörde 37°C’de, %5 CO₂ içeren atmosferde bekletilmiştir. Bu esnada, PBS içinde 5 mg/ml konsantrasyonda MTT çözeltisi hazırlanmış ve 0.22 µm’lik şırınga ucu filtreden süzülerek steril edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 25’er µl MTT çözeltisi ilave edilmiş ve 4 saat aynı koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonunda ortam ve MTT, oluşan formazan kristallerine zarar verilmeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Ardından her kuyucuğa 200’er µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş ve formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır.

Negatif kontrol olarak, %100 tam kültür ortamı kullanılmış ve deney sonucunda negatif kontrolün hücre canlılığı %100 kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak da sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (%1’lik NaOH içinde %0.01 konsantrasyonda) uygulanmıştır.

Kuyucuklara ait absorbanlar 570 nm ve 650 nm’de mikropılaka okuyucu (Bio-Tek Epoch, Amerika) ile okunmuştur. 570 nm’deki absorbanlardan referans dalga boyu olan 650 nm’deki absorbanlar çıkarılarak [141], bu değerler üzerinden aşağıda verilen

Denklem 3-4 yardımıyla hücre canlılığı yüzde cinsinden hesaplanmıştır . Kör olarak, hücre içermeyen kuyucuklardaki tam kültür ortamı kullanılmıştır.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Negatif Kontrolün Absorbansı}} \times 100 \quad (3-4)$$

3.17.2. Konfokal Mikroskopi Çalışması

GapmeR oligonükleotitlerinin hücre içine alımını gözlemleyebilmek için gerçekleştirilen konfokal mikroskopi çalışmasında, oligonükleotitlerden FAM-etiketli olan GapmeR-NK oligonükleotitleri kullanılmıştır.

Numune hazırlığı için, 12 mm çapındaki yuvarlak cam lameller, %70'lik alkol ile dekontamine edildikten sonra 24-kuyucuklu steril plakanın kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Ardından kuyucuklara 50.000 hücre/kuyucuk (500 µl) olacak şekilde Calu-3 hücre ekimi yapılmıştır. Tutunması ve çoğalması için hücreler, 48 saat boyunca inkübatörde 37°C'de, %5 CO₂ içeren atmosferde bekletilmiştir. 48 saat sonunda eski ortam atılmış ve numuneler hücrelere uygulanmıştır. Uygulanan numuneler Tablo 3-4'te gösterilmiştir.

Tablo 3-4: Konfokal Mikroskopi Çalışmasındaki Uygulamalar

No	Uygulama
1	Tam Kültür Ortamı (Kontrol)
2	GapmeR-NK oligonükleotit
3	Boş nanopartiküller
4	GapmeR-NK nanopartiküller

Numuneler uygulandıktan sonra hücreler, 24 saat boyunca inkübatörde bekletilmiş ve 24 saat sonunda numune içeren ortamlar atılmıştır. Hücreler PBS ile iki kez yıkandıktan sonra da, hazırlanan fiksasyon ajanı uygulanmıştır.

Fiksasyon ajanı olarak PBS içerisinde hazırlanan %4 (a/h)'lik paraformaldehit çözeltisi kullanılmıştır. Bunun için, PBS çeker ocak altında $\sim 60^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ısıtılmış ve buna paraformaldehit tozu eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu esnada karışım şeffaf hale gelene kadar, damla damla NaOH çözeltisi eklenmiştir. Çözelti ısıtıcıdan alınmış ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Ardından HCl çözeltisiyle pH'sı 7.4'e ayarlanmıştır.

Hücreler oda koşullarında 10 dakika boyunca fiksasyon ajanına maruz bırakılmıştır ve ardından PBS ile iki kez nazikçe yıkanmıştır. Her bir numune için farklı lamalar üzerine birer damla DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) boyası içeren gömme ortamı damlatılmıştır. Fikse edilmiş hücreleri taşıyan cam lameller, kuyucuklardan pens yardımıyla alınıp gömme ortamı üzerine ters çevrilerek kapatılmıştır. Preparatlar, bu şekilde bir gece ışıktan korunarak bekletilmiştir. Ertesi gün karanlık ortamdaki konfokal mikroskopta (Leica DFC365 FX, Almanya) 40x büyütmede immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Eksitasyon dalga boyu olarak DAPI boyası için 405 nm, FAM etiketli oligonükleotit için ise 488 nm seçilmiştir. Hazırlanan numunelerin konfokal mikroskopta görüntülenmesi İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden hizmet alımıyla gerçekleştirilmiştir.

3.17.3. Ekspresyon Deneyleri

Ekspresyon deneyleri kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar şunlardır:

- Hücre hattı seçim çalışması
- Transfeksiyon ajanı aracılığıyla transfeksiyon çalışması
- Geliştirilen nanopartiküller aracılığıyla transfeksiyon çalışması
- GapmeR ST-2'nin geliştirilen nanopartiküller aracılığıyla 24 saatlik, 48 saatlik ve 72 saatlik transfeksiyon çalışması

Bu çalışmaların uygulamalarına ait detaylar aşağıda alt başlıklar halinde sunulmuştur.

3.17.3.1. Hücre Hattı Seçim Çalışması

Bu tez çalışmasıyla baskılanması hedeflenen lncRNA-UCA1 seviyesi, Liverpool John Moores Üniversitesi'nde yürütülen ön çalışmayla Calu-3 ve A549 hücre hattı için kıyaslanmıştır. Bu çalışma sonunda elde edilen veriye göre, lncRNA-UCA1'in ekspresyon seviyesi hangi hücre hattında daha yüksek ise, çalışmalara o hücre hattı ile devam edilmesi planlanmıştır.

Hücre hattı seçim çalışması için 12-kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100.000 hücre olacak şekilde iki hücre hattı için de ekim gerçekleştirilmiştir. Tutunması ve çoğalması için hücreler, 24 saat boyunca inkübatörde 37°C'de, %5 CO₂ içeren atmosferde bekletilmiştir. Ardından eski ortam atılıp, her iki hücre hattı için de Tablo 3-5'te verilen uygulamalar yapılarak deney grupları oluşturulmuştur. 24 saat boyunca bu şekilde inkübatörde bekletilmiştir.

Tablo 3-5: Hücre Hattı Seçim Çalışmasındaki Deney Grupları

No	Hücre Hattı	Uygulama
1	Calu-3	Tam Kültür Ortamı (Kontrol)
2		Boş Nanopartikül
3	A549	Tam Kültür Ortamı (Kontrol)
4		Boş Nanopartikül

Bu çalışmada veriler analiz edilirken öncelikle, her iki hücre hattı için tam kültür ortamının uygulandığı kuyucuklar, o hücre hattına ait boş nanopartikül grubunun kontrolü olarak kullanılmıştır. Bu şekilde, boş nanopartikül uygulamasının lncRNA-UCA1 seviyesini değiştirip değiştirmediği, her bir hücre hattı için kendi içinde incelenmiştir. Veriler ikinci kez yeniden analiz edildiğinde ise Calu-3 hücre hattına uygulanan tam kültür ortamı kuyucuğu, A549 kuyucukları için de kontrol olarak kullanılmıştır. Bu şekilde lncRNA-UCA1 seviyesinin, iki hücre hattında kıyaslanması sağlanmıştır.

3.17.3.2. Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması

Hücre hattı seçiminden sonra GapmeR standartlarının (ST-1, ST-2, ST-3) ve GapmeR negatif kontrol (NK) oligonükleotitlerinin transfeksiyon ajanıyla transfeksiyon çalışması yürütülmüştür. Bu çalışma için 24-kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 50.000 Calu-3 hücresi olacak şekilde ekim yapılmıştır. Tutunması ve çoğalması için hücreler, 24 saat boyunca inkübatörde 37°C’de, %5 CO₂ içeren atmosferde bekletilmiştir. Ardından eski ortam atılıp, Tablo 3-6’da verilen uygulamalar yapılarak deney grupları oluşturulmuştur. Uygulamalar yapıldıktan sonra, hücreler 24 saat boyunca bu şekilde inkübatörde bekletilmiştir.

Tablo 3-6: Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - Deney Grupları

No	Uygulama
1	Tam kültür ortamı (Kontrol)
2	GapmeR-NK oligonükleotit + transfeksiyon ajanı
3	GapmeR ST-1 oligonükleotit + transfeksiyon ajanı
4	GapmeR ST-2 oligonükleotit + transfeksiyon ajanı
5	GapmeR ST-3 oligonükleotit + transfeksiyon ajanı

Her bir kuyucukta GapmeR konsantrasyonu 40 nM olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Transfeksiyon ajanı olarak Lipofectamine® RNAiMAX kullanılmıştır. Uygulanacak numuneler hazırlanırken transfeksiyon ajanının 24-kuyucuklu plaka için olan protokolü izlenmiştir [142].

1. Transfeksiyon ajanının 3 µl’si, 50 µl serum içermeyen kültür ortamı ile seyreltilmiştir. 53’er µl’lik bu karışımdan, ayrı ayrı mikrosantrifüj tüplerine, dört GapmeR oligonükleotidi için, dört adet hazırlanmıştır.
2. GapmeR NK, ST-1, ST-2, ST-3 stoklarının (20 pmol/µl) her birinin 2 µl’si ayrı ayrı 50’şer µl serum içermeyen kültür ortamı ile seyreltilmiştir.
3. 1 numarada hazırlanan her bir tüpe, 2 numarada hazırlanan GapmeR’ler ayrı ayrı mikropipet yardımıyla eklenmiş ve nazikçe pipetaj yapılarak karışması sağlanmıştır.

4. Karışımlar, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
5. Hazırlanan her bir “GapmeR oligonükleotit + transfeksiyon ajanı” kompleksinden 50’şer µl alınarak 450’şer µl serumsuz besiyeri içeren kuyucuklara ayrı ayrı ekleme işlemi yapılmıştır.

3.17.3.3. Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması

GapmeR negatif kontrol (NK) ve GapmeR standartlarının (ST-1, ST-2, ST-3) geliştirilen nanopartikül formülasyonu aracılığıyla transfeksiyon çalışması yürütülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda GapmeR ST-1, ST-2 ve ST-3 arasından lncRNA-UCA1’in baskılanmasını en fazla sağlayan GapmeR standardının seçimi yapılmıştır. Çalışma için 12-kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100.000 Calu-3 hücresi olacak şekilde ekim yapılmıştır. Tutunması ve çoğalması için hücreler, 24 saat boyunca inkübatörde 37°C’de, %5 CO₂ içeren atmosferde bekletilmiştir. Ardından eski ortam atılıp, Tablo 3-7’de verilen uygulamalar yapılarak deney grupları oluşturulmuştur. Uygulamalar yapıldıktan sonra, hücreler 24 saat boyunca bu şekilde inkübatörde bekletilmiştir.

Tablo 3-7: Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - Deney Grupları

No	Uygulama
1	Tam Kültür Ortamı (Kontrol)
2	Boş nanopartiküller
3	GapmeR-NK nanopartiküller
4	GapmeR ST-1 nanopartiküller
5	GapmeR ST-2 nanopartiküller
6	GapmeR ST-3 nanopartiküller

GapmeR içeren gruplarda, GapmeR konsantrasyonu her bir kuyucuk için 50 nM olacak şekilde uygulama yapılmıştır. GapmeR NK, ST-1, ST-2 ve ST-3’ü ayrı ayrı içeren

nanopartiküller Bölüm 3.14’te verildiği şekilde hazırlanmıştır. Boş nanopartiküller de GapmeR içeren nanopartiküllerle aynı koşullarda hazırlanmıştır.

3.17.3.4. GapmeR ST-2’nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24, 48 ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması

Çalışma, 24 saatlik, 48 saatlik ve 72 saatlik uygulama süreleri için gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik çalışmada 24-kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 50.000 Calu-3 hücresi, 48 ve 72 saatlik çalışmalarda ise 12-kuyucuklu plakaya kuyucuk başına 100.000 Calu-3 hücresi olacak şekilde, ekim yapılmıştır. Tutunması ve çoğalması için hücreler, 24 saat boyunca inkübatörde 37°C’de, %5 CO₂ içeren atmosferde bekletilmiştir. Ardından eski ortam atılıp, Tablo 3-8’de verilen uygulamalar yapılarak deney grupları oluşturulmuştur. Uygulamalar yapıldıktan sonra, hücreler 24 saat boyunca bu şekilde inkübatörde bekletilmiştir.

Tablo 3-8: GapmeR ST-2’nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik, 48 Saatlik ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - Deney Grupları

No	Uygulama
1	Tam Kültür Ortamı (Kontrol)
2	Boş nanopartiküller
3	GapmeR-NK nanopartiküller
4	GapmeR ST-2 nanopartiküller
5	GapmeR ST-2 oligonükleotit
6	GapmeR-NK oligonükleotit*

* Bu uygulama sadece 24 saatlik çalışma için gerçekleştirilmiştir.

GapmeR içeren gruplarda, GapmeR konsantrasyonu her bir kuyucuk için 50 nM olacak şekilde uygulama yapılmıştır. GapmeR NK ve ST-2’yi ayrı ayrı içeren nanopartiküller Bölüm 3.14’te verildiği şekilde hazırlanmıştır. Boş nanopartiküller de GapmeR içeren nanopartiküllerle aynı koşullarda hazırlanmıştır.

Ekspresyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen ve dört alt başlık halinde verilen bu uygulamaları takiben bekletme sürelerinin sonunda, hücreler üzerindeki eski ortamlar atılmış ve RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu esnasında kolon yükleme adımından sonra numuneleri DNA'lardan arındırmak üzere DNaz uygulaması yapılmıştır. Çünkü DNA'lar, Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) veya düşük miktardaki transkriptlerin kantifikasyonu sırasında problem yaratabilmektedir [143]. RNA izolasyonunu takiben sırasıyla, RNA kantitasyonu, ters transkripsiyon ile tamamlayıcı DNA (cDNA) eldesi ve kantitatif (gerçek zamanlı) polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlere ait detaylar da sırasıyla alt başlıklar halinde verilmiştir.

3.17.3.5. Toplam RNA İzolasyonu

Ekspresyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen uygulamaların bekletme süreleri sonunda, hücrelerin toplam RNA'sı, ticari bir kit (Jena Bioscience Total RNA Purification Kit - Column Kit) kullanılarak, silika-jel membran adsorbsiyon yöntemiyle izole edilmiştir. İlgili kite ait protokol izlenmiştir [143].

1. **Hücrelerin parçalanması:** Hücrelere kit içeriğindeki lizis tampounundan (2-ME içeren) 500'er µl eklenmiştir. Parçalanmış hücreler, birkaç kez pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiş ve lizatlar 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
 2. **Kolon aktivasyonu:** Yeterli sayıda spin kolon 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş ve her spin kolona kit içeriğindeki aktivasyon tamponundan 100'er µl eklenmiştir. 10.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiş (Weightlab Instruments WN-CMV6000, Türkiye) ve toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.
 3. **Kolona yükleme:** Elde edilen hücre lizatlarına 300'er µl izopropanol eklenmiş ve vortekslenmiştir (IKA, Almanya). Karışımlar aktivasyonu yapılmış spin kolonlara aktarılmıştır. 10.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilmiş (Weightlab Instruments WN-CMV6000, Türkiye), toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.
- **DNaz uygulaması:** RNAz içermeyen DNaz kiti (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Liyofilize haldeki DNaz I enzimine 550 µl RNaz içermeyen su eklenmiş ve nazikçe alt üst edilerek karıştırılmıştır. Enzim, fiziksel denatürasyona duyarlı olduğundan vorteksleme yapılmamıştır. Numune başına,

kit içeriğindeki RDD tamponundan 70 µl ve DNaz I enzim çözeltisinden 10 µl olacak şekilde karışım hazırlanmıştır. Bu karışımdan, kolona yüklenmiş her numuneye 80 µl ilave edilmiştir ve bu şekilde 20-30°C’de 15 dakika bekletilmiştir [144].

4. **Birinci kolon yıkama:** Kit içeriğindeki birinci yıkama tamponundan (etanol içeren) her bir spin kolona 700’er µl uygulanmıştır. 10.000 x g’de 30 saniye santrifüj edilmiş ve toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır.
5. **İkinci kolon yıkama:** Kit içeriğindeki ikinci yıkama tamponundan (etanol içeren) her bir spin kolona 700’er µl uygulanmıştır. 10.000 x g’de 30 saniye santrifüj edilmiş ve toplama tüpünde biriken sıvı atılmıştır. Kalan etanolden tamamen arındırmak adına 10.000 x g’de 2 dakika tekrar santrifüj edilmiştir.
6. **RNA’nın elüsyonu:** Spin kolonlar, RNaz/DNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Kolon membranının ortasına 40’ar µl elüsyon tamponundan eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. RNA’yı elüe etmek için 10.000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İzole edilen RNA -20°C veya -80°C’de saklanmıştır.

3.17.3.6. RNA Kantitasyonu

İzolasyon işlemi sonucu elde edilen numunelere ait saf RNA’ların konsantrasyonları uygun spektrofotometre cihazıyla (Thermo Scientific Nanodrop 2000, Amerika veya BioTek Epoch, Amerika) kantite edilerek saptanmıştır. Kör olarak, RNA’nın elüe edildiği elüsyon tamponu kullanılmıştır. Örnek koyma yerine, toplam RNA örneğinden 2 µl damlatılarak, nükleik asitlerin maksimum absorbands verdiği 260 nm’de ve saflık kontrolleri için de proteinlerin maksimum absorbands verdiği 280 nm’de ölçüm alınmıştır. 260 nm’de bir birimlik absorbands, ml başına 40 µg RNA’ya karşılık gelmektedir. Bu nedenle, okunan absorbands değeri 40 ile çarpılarak RNA konsantrasyonu µg/ml veya ng/µl cinsinden belirlenir. Nükleik asit kantitasyon cihazları bu konsantrasyon değerlerini ve A260/A280 oranlarını otomatik olarak vermektedir. Konsantrasyonlar elde edikten sonra, 500 ng RNA için alınması gerekli hacim hesaplanmıştır. Ayrıca A260/A280 oranları kontrol edilmiştir. Bu oranların 1.9-2.1 aralığına yakın olması RNA’nın saf olarak elde edilebildiğini göstermektedir [144].

3.17.3.7. Ters Transkripsiyon İşlemiyle cDNA Eldesi

Her bir numuneye ait elde edilen kalıp RNA'lerden ters transkriptaz işlemi aracılığıyla cDNA oluşumu için, ticari bir kit (Qiagen miScript II RT, Almanya) kullanılmıştır. İlgili kite ait protokol izlenmiştir [145].

1. Hücre lizatlarından elde edilen kalıp RNA buz üzerinde, kit içeriğinde yer alan tampon ve nükleik karışımı (deoksiribonükleozit trifosfatlar ve primerler) ise, oda sıcaklığında (15–25°C) eritilmiştir. Tüplerin diplerine vurularak karışması sağlanmış ve kısa bir santrifüj işlemi ile sıvıların dipte toplanması sağlanmıştır. Tüpler, deney boyunca buz üstünde tutulmuştur.
2. “RT-mix” olarak adlandırılan ters transkripsiyon karışımı ile, “No RT-mix” olarak adlandırılan ve “RT-mix” ten farklı olarak yalnızca ters transkriptaz içermeyen aynı karışım bir mikrosantrifüj tüpünde, Tablo 3-9’a göre ve gereken reaksiyon sayısına yetecek hacimde hazırlanıp buz üstüne alınmıştır. Ters transkripsiyon karışımı kalıp RNA hariç, cDNA’nın ilk zincirinin sentezi için gerekli tüm bileşenleri içermektedir.

Not: Ters transkriptaz karışımı, “RT-mix” hazırlanmadan hemen önce –20°C’lik dondurucudan çıkarılmış ve buz üzerine yerleştirilmiştir. Kullanımdan hemen sonra dondurucuya geri konulmuştur.

Tablo 3-9: Ters Transkripsiyon Karışımının Bileşenleri

Bileşen	RT-mix için hacim/reaksiyon	No RT-mix için hacim/ reaksiyon
5x tampon	4 µl	4 µl
10x nükleik karışım	2 µl	2 µl
RNaz içermeyen su	değişken*	değişken*
Ters transkriptaz	2 µl	-
Kalıp RNA	değişken**	değişken**
Toplam	20 µl	20 µl

* 20 µl’ye tamamlayan hacimdir.

* RNA kantitasyonu sonucunda, 500 ng kalıp RNA için alınması gereken hacim hesaplanmıştır.

3. 20'şer µl “RT-mix” ve “No-RT-mix” içeren tüplere, her bir numunenin kalıp RNA'sının gerekli hacimleri ayrı ayrı eklenmiş, nazikçe karıştırılmış ve kısa bir santrifüj yapılmıştır.
4. Tüpler, 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
5. Ardından, ters transkriptazı inaktive etmek için 95°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
6. Elde edilen cDNA numuneleri, polimeraz zincir reaksiyonu çalışmalarına kadar -20°C'de saklanmıştır. (Bu çalışmalar için kullanılacağı zaman ise 10 kat seyreltmıştır.)

3.17.3.8. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ilk kez Mullis vd., tarafından 1985 yılında bulunmuştur. Bu buluşundan dolayı, Mullis'e 1993 yılında Nobel ödülü verilmiştir. PCR, hedef DNA diziliminin, in vitro olarak enzimatik çoğalmasını sağlayan, oldukça güvenilir bir moleküler biyoloji tekniğidir. Yöntem, ayrışma (denatürasyon), hibridizasyon (birleşme) ve uzama (polimerizasyon) olarak adlandırılan, 3 aşamalı tekrarlayan bir işlem şeklinde yürütülür. İlk aşamada, çift iplikçikli DNA yüksek sıcaklığa maruz bırakılarak denatüre edilir ve iplikçiklerin ayrılması sağlanır. Ortamda tampon, deoksiribonükleozit trifosfatlar (dNTPs), primerler ve polimeraz enzimi mevcuttur. İkinci aşamada sıcaklık düşürülür ve primerlerin hedef DNA'ya bağlanması sağlanır. Üçüncü aşamada ise ısıya dayanıklı polimeraz enzimi sayesinde, tek iplikçikli DNA kalıp olarak kullanılarak primerler, ortamdaki nükleotitlerle uzar ve çift iplikçikli DNA sentezlenir. Bu şekilde bir döngü tamamlanır [146].

Eğer test edilmesi istenilen örnek RNA ise, RT-PCR gerçekleştirilir. Yani PCR'dan önce ters transkripsiyon (RNA'dan DNA'ya çevrim) işlemiyle cDNA oluşturulur ve ardından PCR adımına geçilir.

Kantitatif (gerçek zamanlı / real time) PCR (qPCR)'da ise, DNA çoğalması ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyali ölçülür. Bu floresan sinyali, floresan işaretli probalar veya çift sarmallı DNA'ya bağlandığı zaman ışıma yapabilen boyalar (örn. SYBR® yeşil) sayesinde oluşur. Bu şekilde her yeni oluşan DNA parçasının kantitatif analizi, reaksiyon sırasında yapılabilmektedir.

Tez çalışmasında, ters transkripsiyon işlemiyle elde edilen cDNA'lardan hedef gen olan UCA1'i, qPCR aracılığıyla çoğaltmak için UCA1 primer seti (Primerdesign Ltd., İngiltere) ve SYBR® yeşil boyası içeren ticari bir PCR kiti (Primerdesign 2x Precision®PLUS qPCR Master Mix, İngiltere) satın alınmıştır. Çoğaltmanın kantite edilmesi için kullanılan SYBR® yeşil boyası, nükleik asitlerin görüntülenmesinde kullanılan floresan bir boyadır.

Verileri normalleştirmek için endojen kontrol geni olarak gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır. GAPDH geninin çoğaltılması için GAPDH primer seti (Qiagen QuantiTect Primer Assays, Almanya) satın alınmıştır.

qPCR öncesi ilgili primer setleri [147,148] ve qPCR kitine [149] ait protokoller izlenmiştir.

1. UCA1 ve GAPDH genlerine ait liyofilize haldeki primerleri içeren tüpler, açılmadan önce, kısa bir santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Böylece meydana gelebilecek kayıplar önlenmeye çalışılmıştır.
2. UCA1 primerleri kit içeriğinde yer alan nükleaz içermeyen suyla, GAPDH primerleri ise TE (pH 8.0) tamponu ile resüspande edilmiştir. Resüspansiyon işleminden emin olmak adına tüpler 5 dakika arayla 2 kez vortekslenmiştir (IKA, Almanya).
3. qPCR işlemi için, UCA1 veya GAPDH primerleri kullanılarak iki ayrı karışım hazırlanmıştır. Karışımın bileşenleri mikrosantrifüj tüplerinde, Tablo 3-10'a göre ve gereken reaksiyon sayısına yetecek hacimlerde bir araya getirilmiştir.

Tablo 3-10: qPCR Karışımının Bileşenleri

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
SYBR® yeşil içeren qPCR karışımı (2x Precision®PLUS qPCR Master Mix)	10 µl
Primerler (UCA1 veya GAPDH için)	1 µl
RNaz/DNaz içermeyen su	7 µl
Toplam	18 µl

4. Bu karışımların 18 µl'si (UCA1 ve GAPDH için ayrı ayrı) PCR plakasının kuyucuklarına veya PCR tüplerine pipetlenmiştir.
5. cDNA örnekleri 10 kat seyreltilerek hazırlanmıştır.
6. Seyreltilmiş cDNA örneklerinin 2 µl'si, qPCR karışımını içeren kuyucuklara veya tüplere pipetlenmiştir. Böylece son hacim 20 µl olmuştur.
7. Negatif kontrol olarak, cDNA yerine su (nükleaz içermeyen) konulan tüpler/kuyucuklar hazırlanmıştır. Bu negatif kontrol tüplerinde/kuyucuklarında herhangi bir çoğalma, tüpler/kuyucuklar arasında çapraz cDNA kontaminasyonunun veya bir ya da daha fazla reaktifin kontamine olduğunun göstergesidir. Çalışmada yer alan bir diğer negatif kontrol, ters transkripsiyon basamağında, ters transkriptaz enzimini içermeyen “No RT-mix” örnekleridir. Bu tüplerde/kuyucuklarda çoğalma olması ise, RNA örneğinin genomik DNA ile kontamine olduğunu gösterir. RNA izolasyonu esnasında DNaz uygulama basamağı bu durumun önüne geçilmesinde oldukça faydalıdır.
8. Hazırlanan PCR plakası veya tüpleri, PCR cihazına (Bio-Rad CFX96, Almanya veya Qiagen Rotor-Gene Q, Almanya) yerleştirilerek termal döngüler başlatılır. Uygulanan çoğaltma protokolü Tablo 3-11’de verilmiştir.

Tablo 3-11: qPCR protokolü

	Adım	Zaman	Sıcaklık
	Enzim aktivasyonu	2 dakika	95°C
Döngü x 40	Denatürasyon	10 saniye	95°C
	Veri Toplama*	60 saniye	60°C

* Fluorojenik veri bu adım sırasında SYBR® yeşil aracılığıyla toplanmaktadır.

lncRNA-UCA1'in göreceli seviyeleri, karşılaştırmalı döngü eşiği ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır [150]. Döngü eşiği (C_T) değeri, hedef genin çoğalması sonucu oluşan floresan sinyalin pozitiflik eşik seviyesine ulaştığı termal döngü sayısını temsil etmektedir. Yani C_T değeri ne kadar düşükse, bu tez çalışması için örnekteki lncRNA-UCA1 kopya sayısı o kadar yüksek demektir.

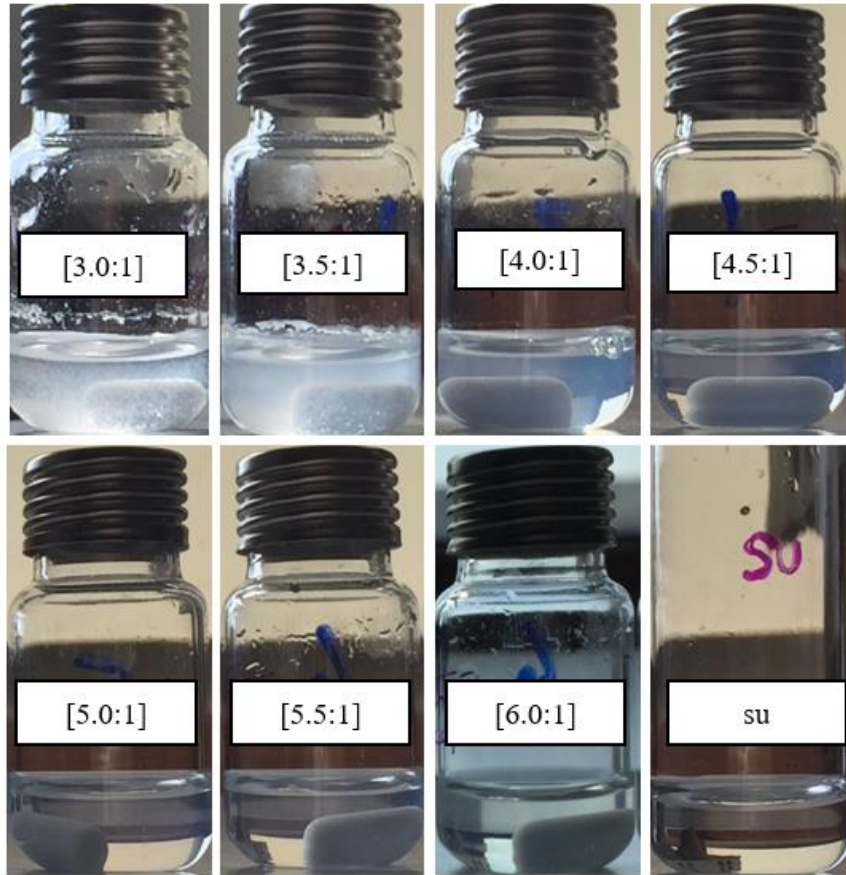
3.18. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında veriler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler GraphPad Prism Version 8.0.1 programı kullanılarak yapılmıştır. Grafiklerin çizimi için de GraphPad Prism Version 8.0.1 programından yararlanılmıştır. *In vitro* deneylerden elde edilen verilere, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunup bulunmadığının tespiti için verilerin uygunluğuna göre tek veya çift yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Gruplar arasında fark bulunduğunda farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla Mann-Whitney U testi veya Tukey yöntemine göre ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Güven aralığı %95 olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılığın önemliliği elde edilen p değerinin α yanılma düzeyinden büyük ($p>0,05$, istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ($p<0,05$, istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Boş Nanopartiküllerin Optimizasyon Çalışmasına Ait Bulgular

Bölüm 3.6’da belirtildiği şekilde, kütlece farklı oranlardaki kitozan ve TPP ile hazırlanan dispersiyonlara ait görüntüler suyun görüntüsü ile kıyaslamalı olarak Şekil 4-1’de verilmiştir. Kitozan/TPP kütle oranının [3.0:1] ve [3.5:1] olduğu formülasyonlarda çökme gözlemlendiğinden bu oranlar ile çalışılmaya devam edilmemiştir. Çalışılan diğer kitozan/TPP kütle oranlarındaki formülasyonlarda ise suya göre hafif bulanıklık gözlenmiştir.

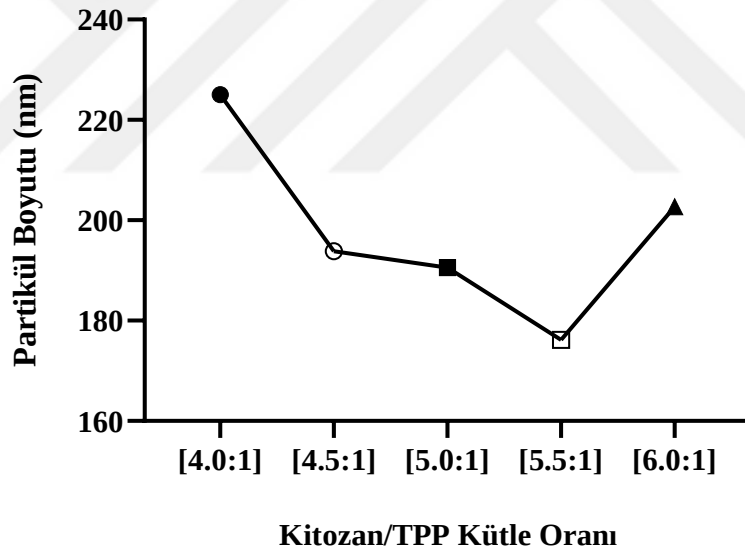


Şekil 4-1: Farklı Kitozan/TPP Kütle Oranı ile Hazırlanan Dispersiyonların Görünüşleri

Dispersiyonların ortalama partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4-1 ve Şekil 4-2’de sunulmuştur.

Tablo 4-1: Kitozan/TPP Kütle Oranına Göre Boş Nanopartiküllerin Partikül Boyutu, PDI ve Zeta Potansiyel Değerleri

Kitozan/TPP kütle oranı	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
[3.0 : 1]	Çökme gerçekleştiğinden ölçüm alınmadı.		
[3.5 : 1]	Çökme gerçekleştiğinden ölçüm alınmadı.		
[4.0 : 1]	225,00 ± 3,61	0,29 ± 0,04	29,10 ± 1,49
[4.5 : 1]	193,80 ± 2,04	0,24 ± 0,01	31,70 ± 0,71
[5.0 : 1]	190,60 ± 3,31	0,19 ± 0,02	33,60 ± 0,81
[5.5 : 1]	176,20 ± 2,16	0,23 ± 0,01	34,00 ± 0,72
[6.0 : 1]	202,70 ± 4,06	0,23 ± 0,03	34,20 ± 2,71



Şekil 4-2: Kitozan/TPP Kütle Oranına Göre Partikül Boyutu

Optimizasyon çalışmaları kapsamında, üç farklı pH'ya sahip kitozan çözeltisiyle, farklı iki karıştırma hızı uygulanarak elde edilen nanopartiküllere ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri, kitozan/TPP kütle oranları [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için sırasıyla Tablo 4-2, Tablo 4-3 ve Tablo 4-4'de verilmiştir.

Tablo 4-2: Kitozan/TPP Kütle Oranı [5.0:1] Olan Formülde Optimizasyon Çalışması

Kitozan Çözelti pH'sı	Karıştırma Hızı (rpm)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
4.00 ± 0.05	300	174,40 ± 0,95	0,18 ± 0,03	28,40 ± 0,15
	600	145,50 ± 1,08	0,13 ± 0,03	28,70 ± 0,59
4.50 ± 0.05	300	171,70 ± 2,05	0,17 ± 0,04	18,20 ± 3,48
	600	165,90 ± 2,24	0,15 ± 0,03	17,40 ± 0,46
5.00 ± 0.05	300	169,10 ± 2,80	0,14 ± 0,04	11,80 ± 1,00
	600	151,50 ± 1,94	0,09 ± 0,03	13,30 ± 0,35

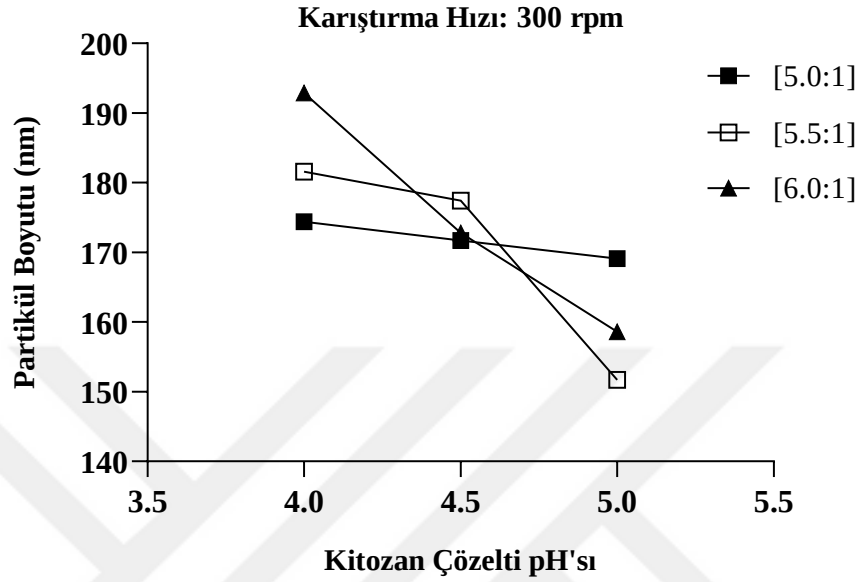
Tablo 4-3: Kitozan/TPP Kütle Oranı [5.5:1] Olan Formülde Optimizasyon Çalışması

Kitozan Çözelti pH'sı	Karıştırma Hızı (rpm)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
4.00 ± 0.05	300	181,60 ± 2,01	0,17 ± 0,02	17,30 ± 0,60
	600	150,70 ± 3,65	0,11 ± 0,03	27,10 ± 0,67
4.50 ± 0.05	300	177,40 ± 3,42	0,18 ± 0,02	21,80 ± 0,35
	600	168,30 ± 1,26	0,20 ± 0,02	23,80 ± 0,86
5.00 ± 0.05	300	151,70 ± 0,75	0,14 ± 0,04	16,50 ± 0,51
	600	143,10 ± 3,31	0,13 ± 0,04	17,50 ± 0,61

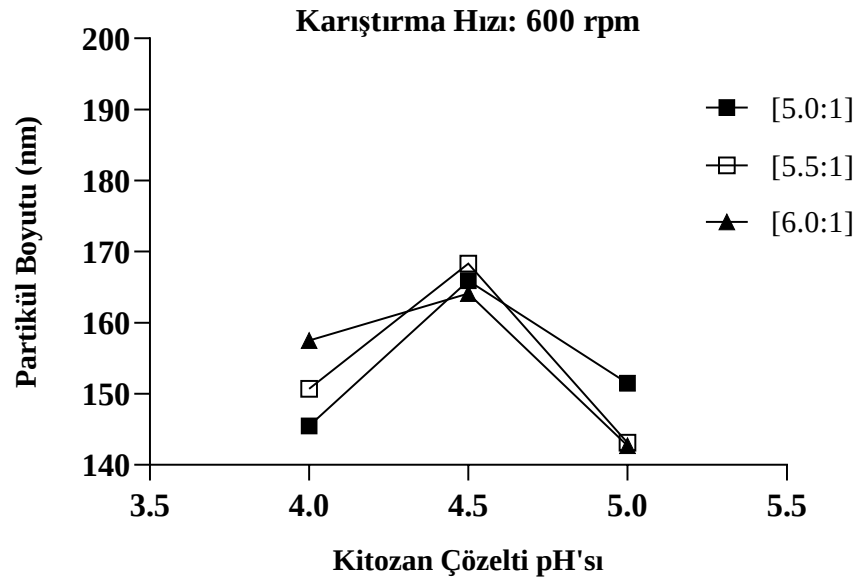
Tablo 4-4: Kitozan/TPP Kütle Oranı [6.0:1] Olan Formülde Optimizasyon Çalışması

Kitozan Çözelti pH'sı	Karıştırma Hızı (rpm)	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
4.00 ± 0.05	300	192,90 ± 7,66	0,18 ± 0,02	26,90 ± 1,85
	600	157,50 ± 2,55	0,15 ± 0,02	31,00 ± 0,60
4.50 ± 0.05	300	172,80 ± 1,28	0,18 ± 0,02	24,00 ± 0,72
	600	164,10 ± 1,83	0,18 ± 0,01	24,20 ± 0,55
5.00 ± 0.05	300	158,60 ± 1,78	0,12 ± 0,01	22,30 ± 0,47
	600	142,70 ± 1,71	0,15 ± 0,02	18,40 ± 0,59

Kitozan çözelti pH'sına göre partikül boyutu değişimleri, 300 rpm için Şekil 4-3'te ve 600 rpm için Şekil 4-4'te sunulmuştur.



Şekil 4-3: Kitozan Çözelti pH'sının Farklı Kitozan/TPP Kütle Oranlarında Partikül Boyutuna Etkisi (300 rpm)



Şekil 4-4: Kitozan Çözelti pH'sının Farklı Kitozan/TPP Kütle Oranlarında Partikül Boyutuna Etkisi (600 rpm)

4.2. Liyofilizasyon Sonrası Disperse Edilen Boş Nanopartiküllere Ait Bulgular

Bölüm 3.7’te belirtildiği şekilde, nanopartikül dispersiyonunun liyofilizasyon işlemi öncesine ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri ile liyofilizasyon sonrası katı nanopartiküller yeniden sulandırıldıktan sonra elde edilen partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4-5’te verilmiştir.

Tablo 4-5: Liyofilizasyon İşlemi Öncesi ve Sonrasında Boş Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyel Değerleri

İşlem	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
Liyofilizasyondan önce	210,10 ± 4,04	0,29 ± 0,01	40,50 ± 0,74
Liyofilizasyondan sonra*	2771,00 ± 767,90	0,22 ± 0,08	20,00 ± 1,70
Liyofilizasyondan sonra* ve 1 dk ultrasonikasyon	419,50 ± 9,36	0,51 ± 0,06	47,40 ± 1,67
Liyofilizasyondan sonra* ve 15 dk ultrasonikasyon	316,70 ± 7,84	0,35 ± 0,04	42,50 ± 1,05

* “Liyofilizasyondan sonra” ifadesi, liyofilize edilmiş nanopartiküllerin yeniden sulandırılması sonrası oluşan dispersiyonu ifade etmektedir.

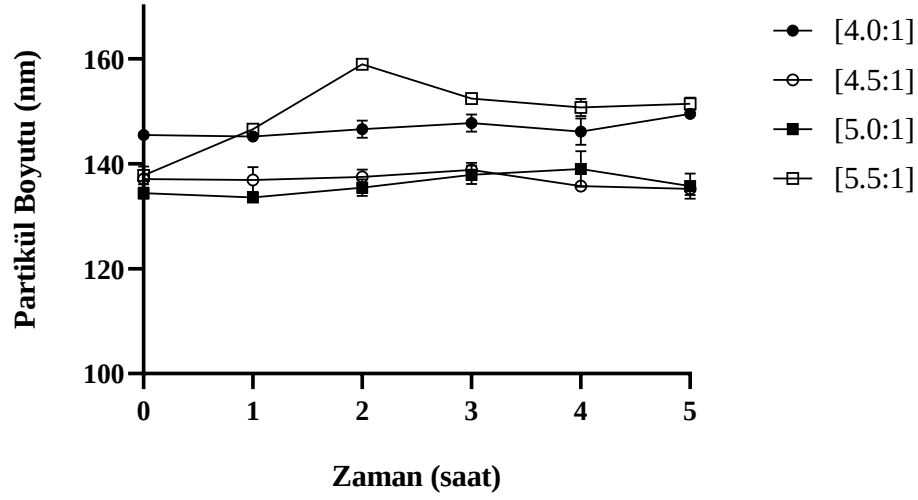
4.3. Boş Nanopartiküllerin Dispersiyon Stabilitésine Ait Bulgular

Bölüm 3.8’de belirtildiği şekilde hazırlanan, kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1] ve [5.5:1] olan formülasyonlar için nanopartikül dispersiyonlarını oda sıcaklığında 5 saat bekletme sonrası partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4-6 ve partikül boyutu değişimi Şekil 4-5’te verilmiştir.

Kitozan/TPP kütle oranı, [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için nanopartikül dispersiyonlarının 5°C ± 3°C’deki haftalık dispersiyon stabilitésine ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4-7 ve partikül boyutu değişimleri Şekil 4-6’da verilmiştir.

Tablo 4-6: Boş Nanopartiküllerin Oda Koşullarında 5 Saatlik Dispersiyon Stabilitesi

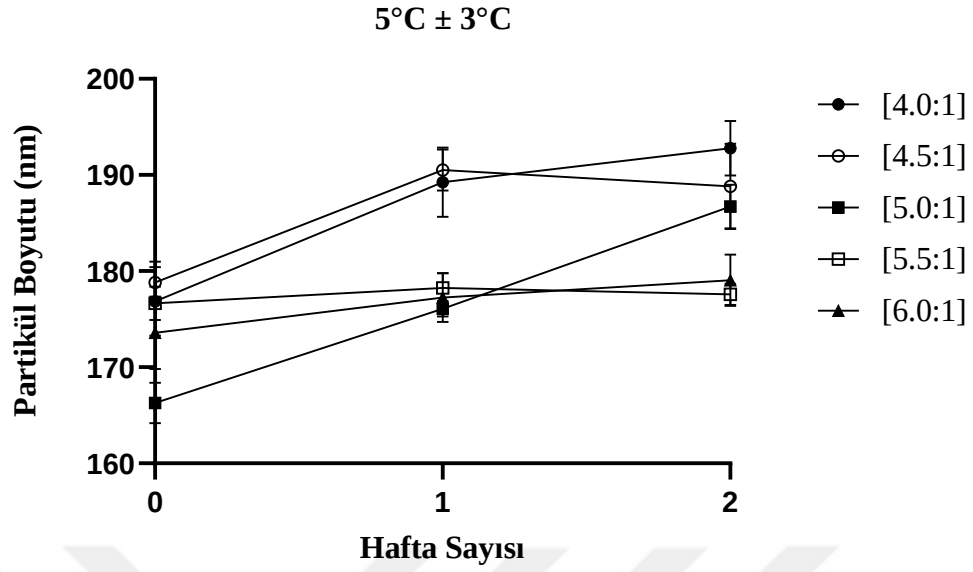
Kitozan/TPP Kütle Oranı	Saat	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
[4.0:1]	0.	145,50 ± 0,67	0,16 ± 0,03	+ 23,50 ± 0,85
	1.	145,20 ± 0,87	0,16 ± 0,03	+ 24,50 ± 0,59
	2.	146,60 ± 1,67	0,17 ± 0,03	+ 23,70 ± 0,50
	3.	147,80 ± 1,65	0,18 ± 0,02	+ 24,40 ± 0,35
	4.	146,10 ± 2,55	0,19 ± 0,02	+ 22,00 ± 1,25
	5.	149,50 ± 1,02	0,20 ± 0,04	+ 24,50 ± 0,86
[4.5:1]	0.	137,10 ± 0,25	0,19 ± 0,03	+ 22,50 ± 1,15
	1.	136,90 ± 2,50	0,17 ± 0,02	+ 27,20 ± 0,92
	2.	137,50 ± 1,43	0,16 ± 0,01	+ 25,60 ± 0,40
	3.	138,80 ± 1,36	0,19 ± 0,02	+ 26,10 ± 2,20
	4.	135,70 ± 0,42	0,19 ± 0,01	+ 25,00 ± 0,97
	5.	135,20 ± 1,15	0,19 ± 0,01	+ 22,70 ± 1,08
[5.0:1]	0.	134,40 ± 1,05	0,16 ± 0,02	+ 28,40 ± 0,47
	1.	133,60 ± 0,60	0,17 ± 0,02	+ 24,70 ± 0,60
	2.	135,40 ± 1,59	0,20 ± 0,02	+ 30,40 ± 0,25
	3.	137,90 ± 1,74	0,15 ± 0,02	+ 24,70 ± 1,21
	4.	139,00 ± 3,41	0,10 ± 0,02	+ 24,90 ± 0,90
	5.	135,70 ± 2,43	0,16 ± 0,02	+ 24,00 ± 1,42
[5.5:1]	0.	137,80 ± 1,70	0,20 ± 0,02	+ 14,20 ± 1,56
	1.	146,60 ± 0,44	0,20 ± 0,01	+ 25,30 ± 1,00
	2.	158,90 ± 1,01	0,25 ± 0,02	+ 28,60 ± 0,40
	3.	152,40 ± 0,75	0,21 ± 0,01	+ 26,90 ± 1,48
	4.	150,70 ± 1,65	0,17 ± 0,01	+ 27,70 ± 0,36
	5.	151,40 ± 1,18	0,22 ± 0,01	+ 25,80 ± 0,55



Şekil 4-5: Boş Nanopartiküllerin Oda Koşullarında 5 Saatlik Dispersiyon Stabilitesi

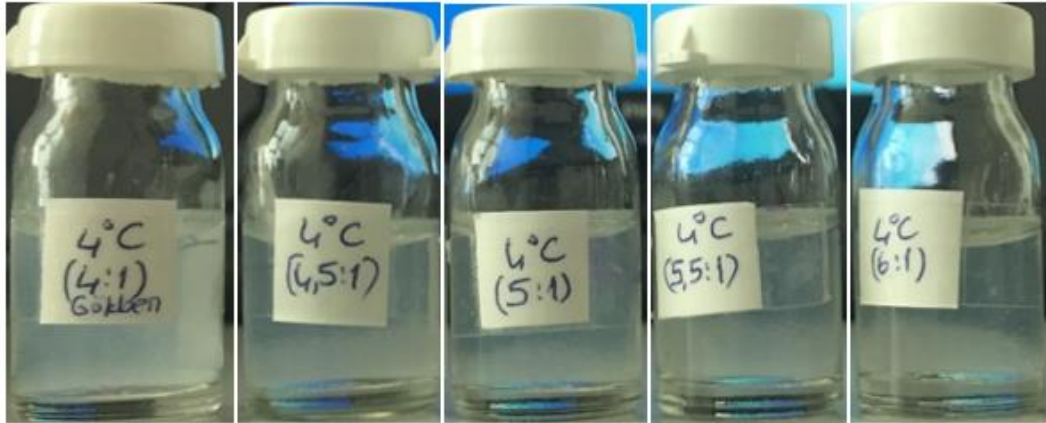
Tablo 4-7: Boş Nanopartiküllerin 5°C ± 3°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi

Kitozan/TPP Kütle Oranı	Hafta	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
4.0 : 1	0	176,80 ± 3,59	0,25 ± 0,02	+ 29,80 ± 0,50
	1	189,30 ± 3,63	0,24 ± 0,02	+ 29,40 ± 0,90
	2	192,80 ± 2,84	0,22 ± 0,01	+ 30,20 ± 0,66
4.5 : 1	0	178,80 ± 2,17	0,24 ± 0,01	+ 34,80 ± 0,61
	1	190,50 ± 2,17	0,25 ± 0,02	+ 35,00 ± 1,27
	2	188,80 ± 4,44	0,22 ± 0,01	+ 34,70 ± 0,90
5.0 : 1	0	166,30 ± 2,12	0,17± 0,03	+ 36,50 ± 0,62
	1	176,10 ± 0,81	0,18± 0,02	+ 35,20 ± 1,30
	2	186,70 ± 2,29	0,22 ± 0,01	+ 36,60 ± 0,12
5.5 : 1	0	176,70 ± 1,74	0,23 ± 0,02	+ 34,10 ± 0,25
	1	178,20 ± 1,55	0,27 ± 0,04	+ 35,00 ± 1,01
	2	177,60 ± 1,13	0,23 ± 0,02	+ 36,30 ± 0,76
6.0 : 1	0	173,60 ± 3,77	0,18 ± 0,02	+ 35,80 ± 1,01
	1	177,20 ± 2,56	0,17 ± 0,04	+ 36,10 ± 0,10
	2	179,00 ± 2,69	0,18 ± 0,02	+ 37,10 ± 0,55

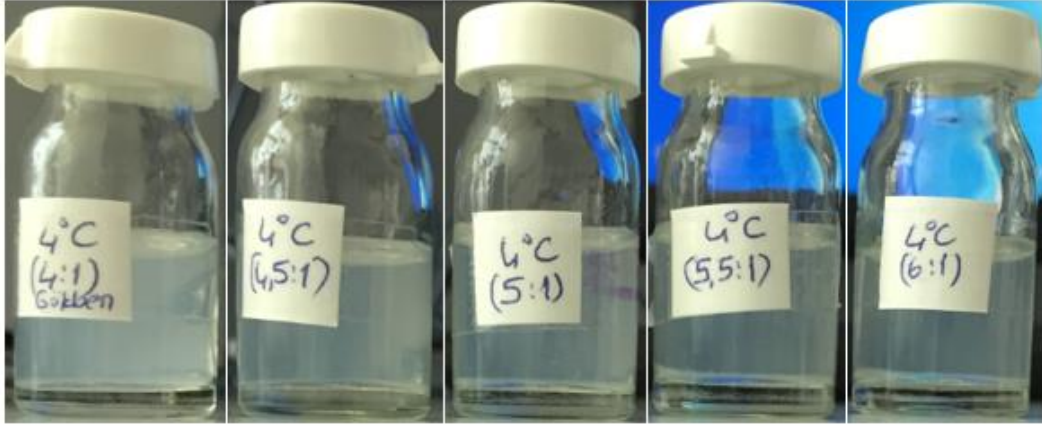


Şekil 4-6: Boş Nanopartiküllerin $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi

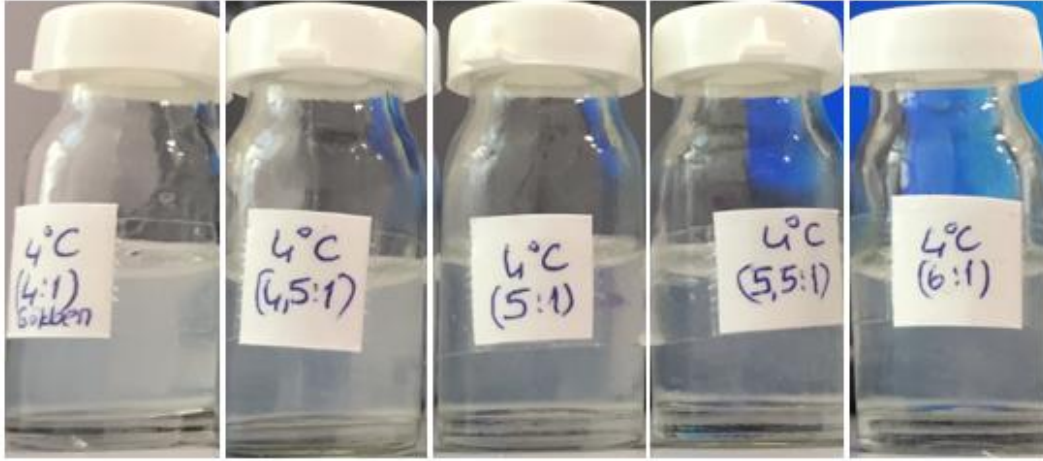
$5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 1, 2 ve 3 hafta bekletilen numunelere ait görüntüler ise sırasıyla Şekil 4-7, Şekil 4-8 ve Şekil 4-9'da sunulmuştur.



Şekil 4-7: Boş Nanopartiküllerin $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 1 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri



Şekil 4-8: Boş Nanopartiküllerin $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 2 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri



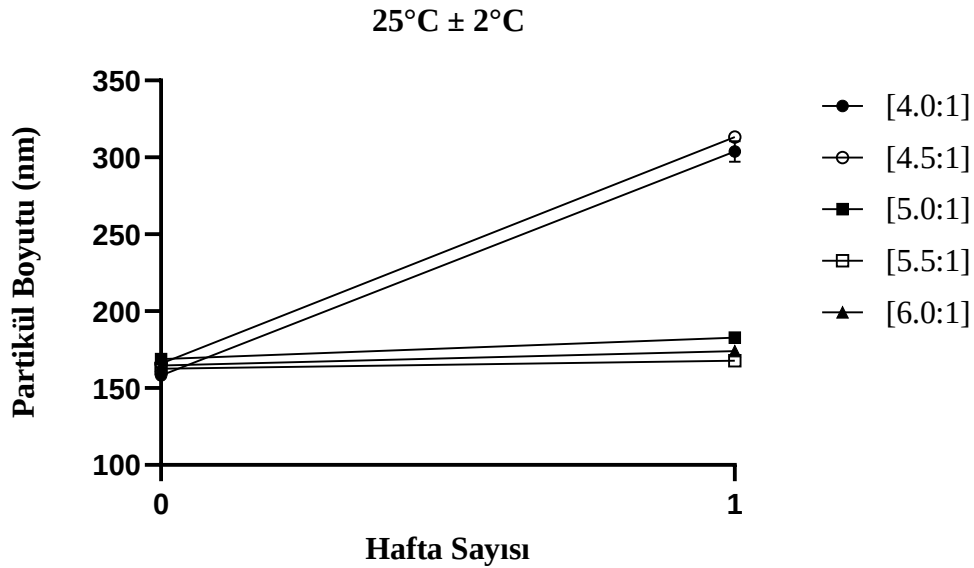
Şekil 4-9: Boş Nanopartiküllerin $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 3 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri

Kitozan/TPP kütle oranı, [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için nanopartikül dispersiyonlarının $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki haftalık dispersiyon stabilitesine ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4-8 ve partikül boyutu değişimleri Şekil 4-10'da verilmiştir.

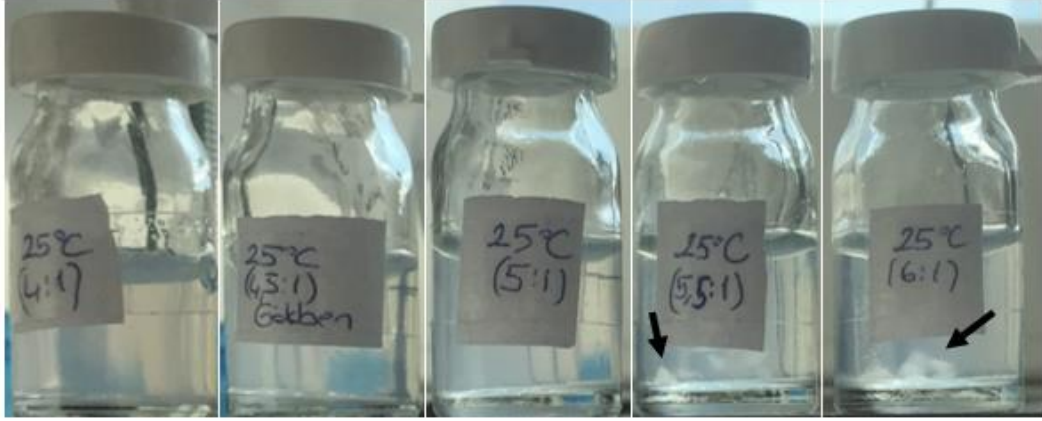
Tablo 4-8: Boş Nanopartiküllerin 25°C ± 2°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi

Kitozan/TPP Kütle Oran	Hafta	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
4.0 : 1	0	158,30 ± 0,70	0,20 ± 0,01	+ 29,80 ± 0,49
	1	303,90 ± 6,77	0,45 ± 0,03	+ 27,50 ± 0,44
4.5 : 1	0	166,00 ± 0,89	0,26 ± 0,03	+ 33,10 ± 0,57
	1	313,20 ± 3,61	0,45 ± 0,04	+ 31,60 ± 0,40
5.0 : 1	0	168,80 ± 3,00	0,21 ± 0,01	+ 33,20 ± 0,57
	1	182,80 ± 0,61	0,19 ± 0,01	+ 32,80 ± 0,74
5.5 : 1	0	162,60 ± 2,57	0,23 ± 0,02	+ 36,20 ± 0,90
	1	*167,90 ± 1,04	0,22 ± 0,01	+ 32,10 ± 0,45
6.0 : 1	0	164,70 ± 1,64	0,18 ± 0,02	+ 36,20 ± 0,72
	1	*174,20 ± 0,40	0,20 ± 0,03	+ 28,40 ± 0,72

*Büyük jelimsi yapılar gözlenmiştir. Pipetajla kolayca dağılabilmektedir. Ölçümler, dağıtılma sonrasına aittir.

**Şekil 4-10: Boş Nanopartiküllerin 25°C ± 2°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi**

25°C $\pm$ 2°C’de 1 hafta bekletilen numunelere ait görüntüler Şekil 4-11’de verilmiştir. Kitozan/TPP kütle oranları [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar 1 hafta sonunda meydana gelen jelimsi agregasyonlar bu şeklin üzerinde ok ile gösterilmiştir.



Şekil 4-11: Boş Nanopartiküllerin 25°C $\pm$ 2°C’de 1 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri

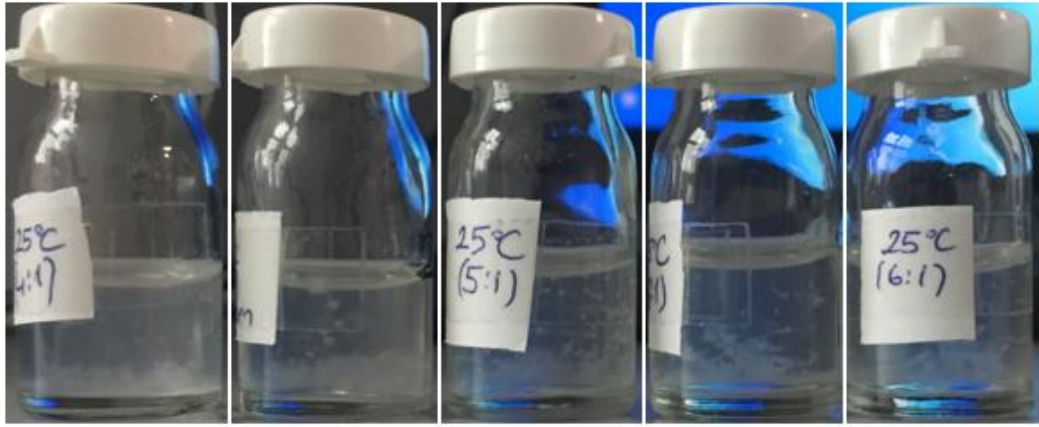
25°C $\pm$ 2°C’de 2, 3 ve 4 hafta bekletilen numunelerde belirgin çökmeler olduğundan, ölçüm alınmamıştır. Bu numunelere ait görüntüler sırasıyla Şekil 4-12, Şekil 4-13 ve Şekil 4-14’de verilmiştir.



Şekil 4-12: Boş Nanopartiküllerin 25°C $\pm$ 2°C’de 2 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri



Şekil 4-13: Boş Nanopartiküllerin 25°C ± 2°C’de 3 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri

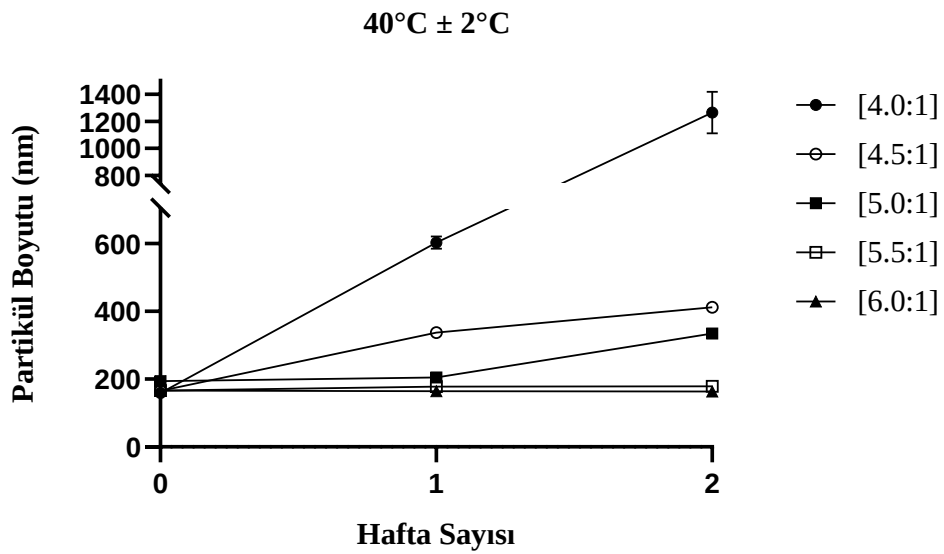


Şekil 4-14: Boş Nanopartiküllerin 25°C ± 2°C’de 4 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri

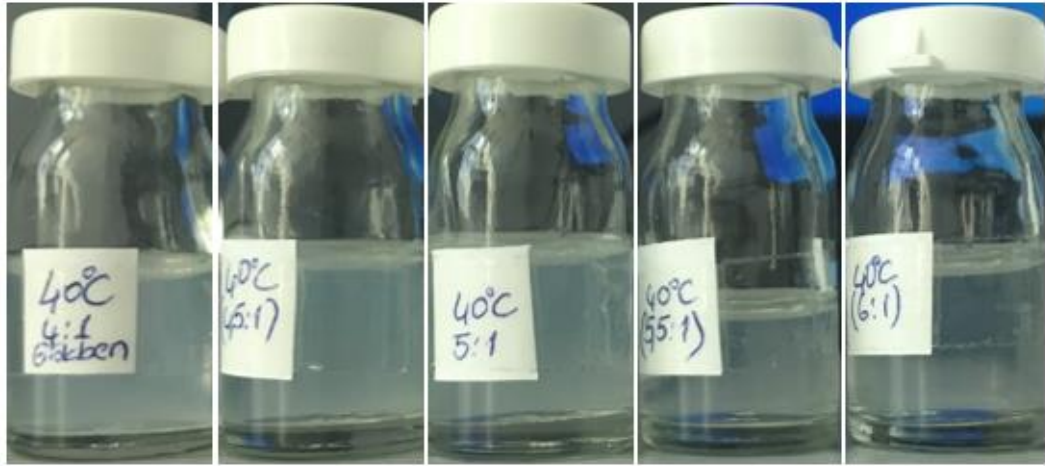
Kitozan/TPP kütle oranı, [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için nanopartikül dispersiyonlarının 40°C ± 2°C’deki haftalık dispersiyon stabilitesine ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4-9’da ve partikül boyutu değişimleri Şekil 4-15’te verilmiştir.

Tablo 4-9: Boş Nanopartiküllerin 40°C ± 2°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi

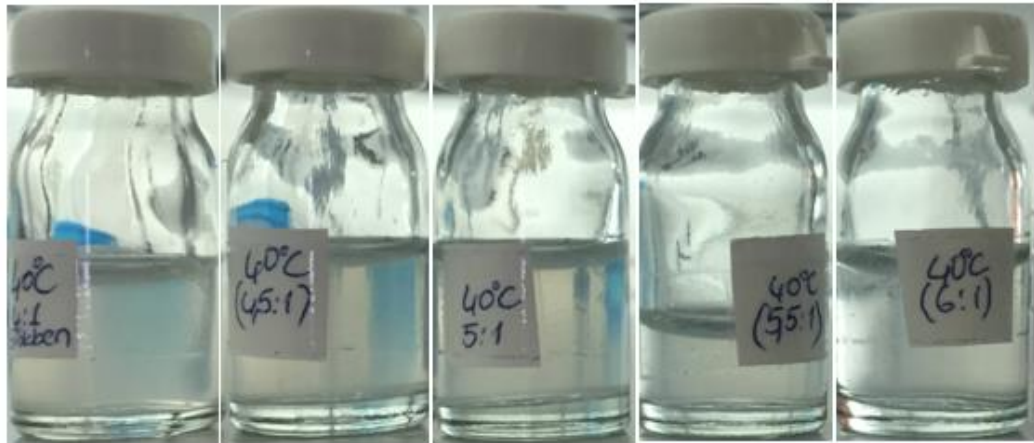
Kitozan/TPP Kütle Oranı	Hafta	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
4.0 : 1	0	159,40 ± 2,10	0,21 ± 0,01	+ 26,80 ± 0,72
	1	603,50 ± 18,21	0,50 ± 0,05	+ 23,70 ± 0,42
	2	1265,00 ± 152,270	0,40 ± 0,04	+ 25,20 ± 0,86
4.5 : 1	0	165,00 ± 0,70	0,17 ± 0,01	+ 30,20 ± 0,87
	1	337,10 ± 4,46	0,34 ± 0,01	+ 26,00 ± 0,55
	2	412,20 ± 3,41	0,41 ± 0,01	+ 25,10 ± 0,32
5.0 : 1	0	194,40 ± 1,89	0,26 ± 0,00	+ 33,80 ± 0,50
	1	204,60 ± 2,06	0,20 ± 0,01	+ 31,30 ± 0,46
	2	334,80 ± 5,85	0,36 ± 0,06	+ 32,30 ± 0,62
5.5 : 1	0	165,80 ± 1,10	0,22 ± 0,00	+ 35,90 ± 0,15
	1	177,60 ± 1,50	0,20 ± 0,02	+ 34,40 ± 0,98
	2	178,70 ± 2,63	0,20 ± 0,01	+ 33,60 ± 0,72
6.0 : 1	0	166,60 ± 0,64	0,33 ± 0,05	+ 35,90 ± 0,68
	1	164,70 ± 1,50	0,18 ± 0,03	+ 34,60 ± 0,25
	2	163,50 ± 0,79	0,21 ± 0,03	+ 37,30 ± 1,36

**Şekil 4-15: Boş Nanopartiküllerin 40°C ± 2°C'deki Haftalık Dispersiyon Stabilitesi**

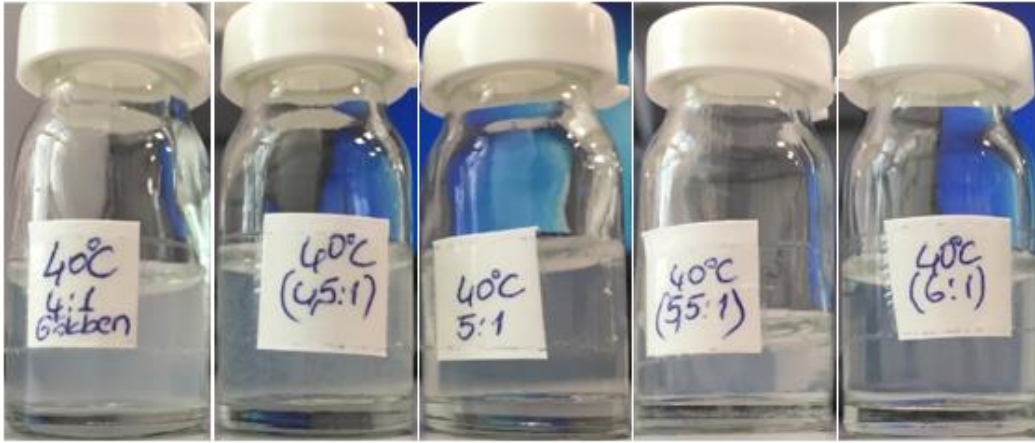
40°C $\pm$ 2°C’de 1, 2, 3 ve 4 hafta bekletilen numunelere ait görüntüler sırasıyla Şekil 4-16, Şekil 4-17, Şekil 4-18 ve Şekil 4-19’da verilmiştir.



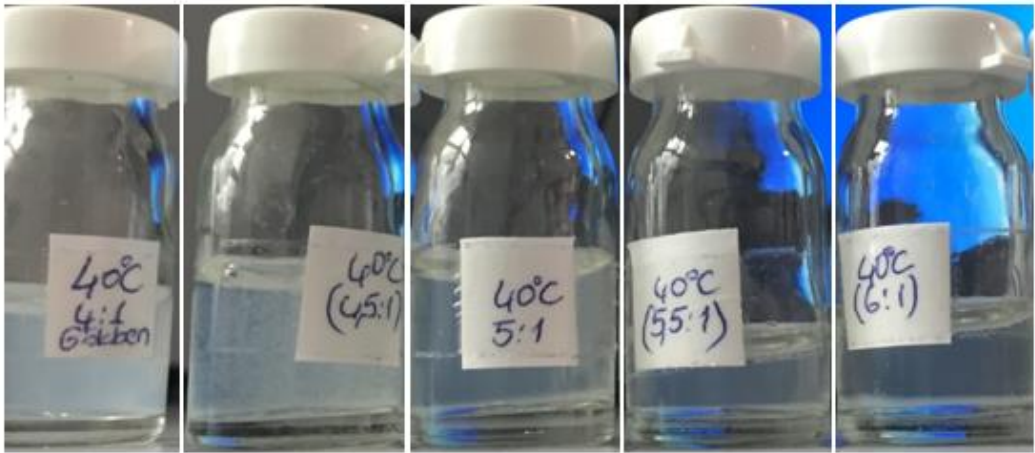
Şekil 4-16: Boş Nanopartiküllerin 40°C $\pm$ 2°C’de 1 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri



Şekil 4-17: Boş Nanopartiküllerin 40°C $\pm$ 2°C’de 2 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri



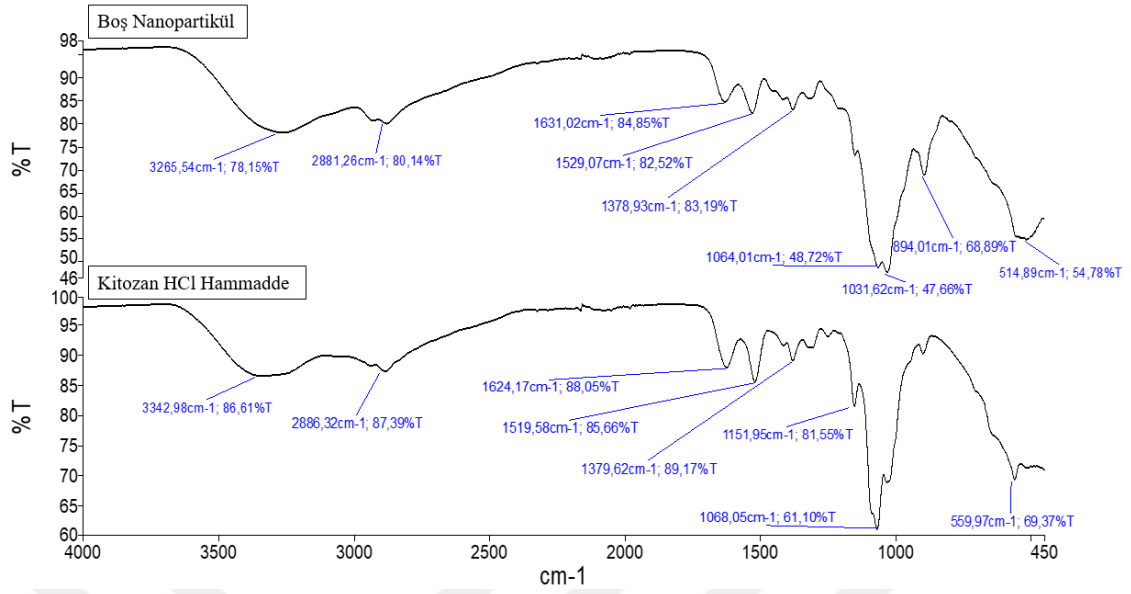
Şekil 4-18: Boş Nanopartiküllerin $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'deki 3 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri



Şekil 4-19: Boş Nanopartiküllerin $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 4 Hafta Bekletilen Numunelerin Görünüşleri

4.4. Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammadesinin FT-IR Spektrumlarına Ait Bulgular

Boş nanopartikül ve Kitozan HCl hammadesinin FT-IR spektrumu Bölüm 3.9'da açıklandığı şekilde alınmıştır. Spektrumlar Şekil 4-20'de, bazı bantlar ve dalga boyları ise Tablo 4-10'da sunulmuştur.



Şekil 4-20: Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammaddesine ait FT-IR Spektrumları

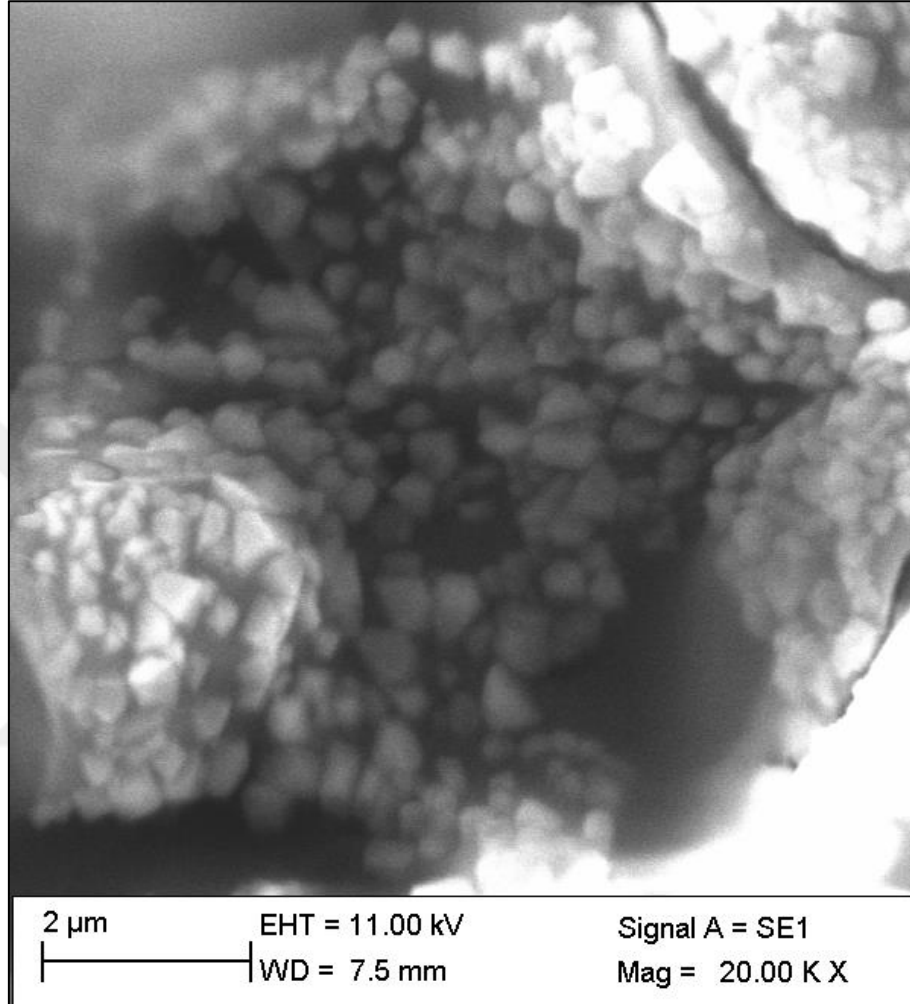
Tablo 4-10: Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammaddesinin FT-IR Spektrumlarındaki Bazı Bantlar ve Dalga Boyları

Boş Nanopartikül Dalga boyu (cm ⁻¹)	Bantlar	Kitozan HCl Hammadde Dalga boyu (cm ⁻¹)
3265,54	NH ₂ ve OH gerilme bantları	3342,98
2881,26	C-H gerilme bandı	2886,32
1631,02	CONH ₂ (C=O) gerilme bandı	1624,17
1529,07	NH ₂ (N-H) bükülme bandı	1519,58
1378,93	C-H deformasyon bandı	1379,62
1031,62	P=O gerilme bandı	-

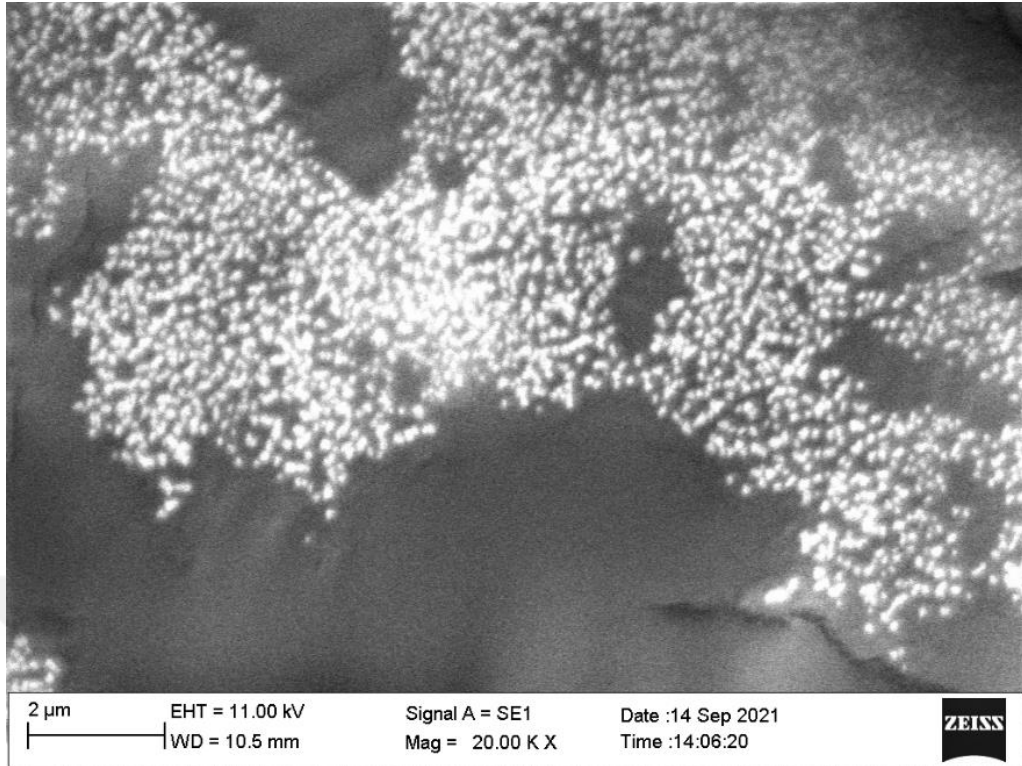
4.5. Boş Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopi Analizine Ait Bulgular

Hazırlanan boş nanopartiküllerin SEM analizi Bölüm 3.10’da açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4-21, kaplama işlemi uygulanmayan numuneye ait SEM görüntüsüdür. Şekil 4-22, Şekil 4-23 ve Şekil 4-24’te ise altın kaplama yapılan numuneye ait, farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri sunulmuştur. SEM görüntüleri ile hem partikül şeklinin karakterizasyonu yapılmış hem de partikül boyutu hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Şekil 4-21 incelendiğinde, nanometrik ölçekte polihedron (çok yüzlü)

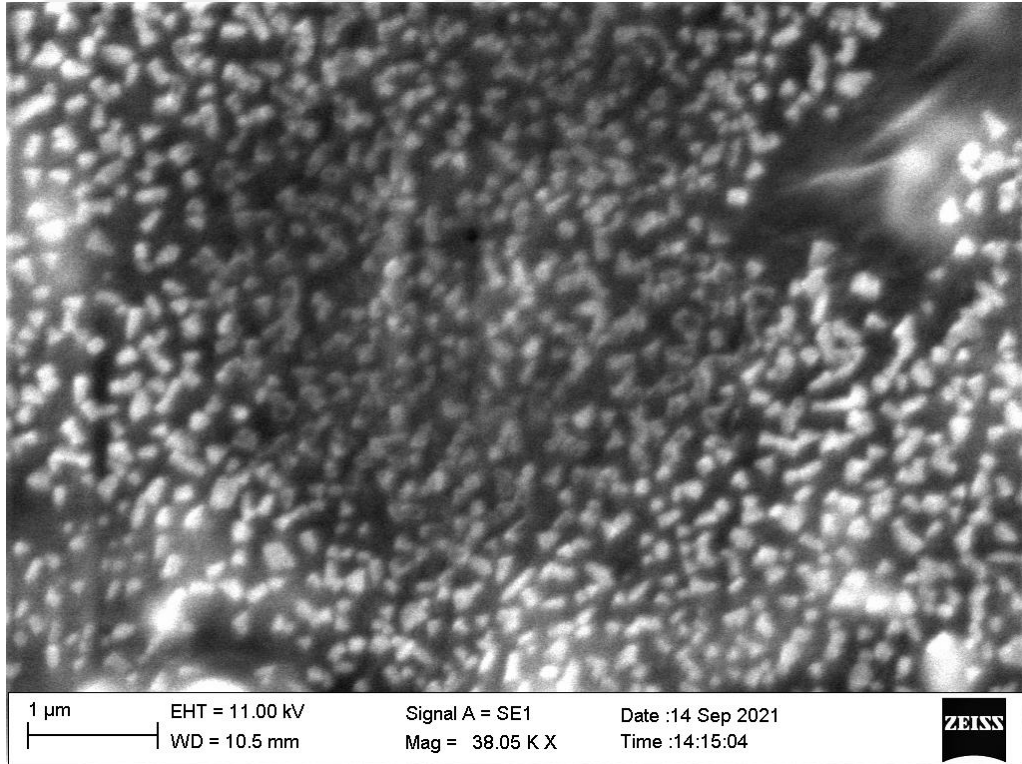
benzeri düzgün yüzlü yapıların oluştuğu görülmektedir. Çap büyüklüğü olarak 120 nm, 150 nm, 170 nm civarlarında nanopartiküllerin oluştuğu görülmüştür (Şekil 4-24).



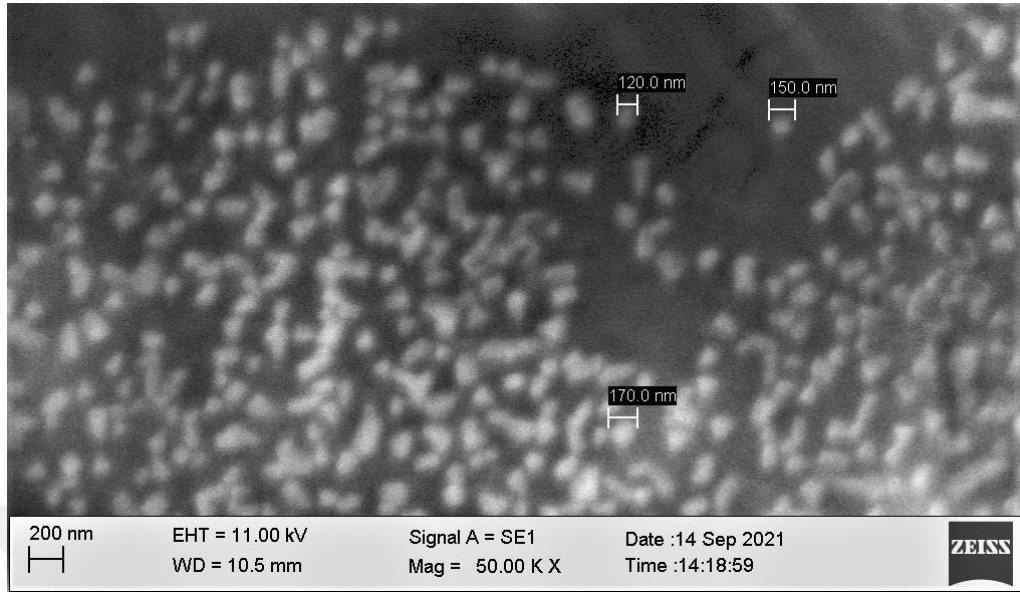
Şekil 4-21: Boş Nanopartikül SEM Görüntüsü (kaplama yapılmadan)



Şekil 4-22: Boş Nanopartikül SEM Görüntüsü - 20.000 Büyütme (altın kaplama)



Şekil 4-23: Boş Nanopartikül SEM Görüntüsü - 38.000 Büyütme (altın kaplama)



Şekil 4-24: Boş Nanopartikül SEM Görüntüsü - 50.000 Büyütme (altın kaplama)

4.6. Saflaştırma Öncesi ve Sonrasında Boş Nanopartiküllere Ait Bulgular

Hazırlanan boş nanopartiküllerin, Bölüm 3.11’te belirtildiği şekilde santrifüjle veya santrifügal filtrasyonla saflaştırma öncesi ve sonrasına ait partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümlerine dair bulgular sırasıyla Tablo 4-11 ve Tablo 4-12’de verilmiştir.

Tablo 4-11: Santrifüjle Saflaştırma Öncesi ve Sonrası Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Değerleri

İşlem	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
Saflaştırma öncesi	161,15 ± 1,85	0,23 ± 0,03	+ 38,05 ± 0,35
Saflaştırma sonrası yeniden dispersiyon (15 dakika ultrasonikasyon)	263,60 ± 1,50	0,33 ± 0,00	+ 31,60 ± 3,50

Tablo 4-12: Santrifügal Filtrasyonla Saflaştırma Öncesi ve Sonrası Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Değerleri

İşlem	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
Saflaştırma öncesi	137,60 ± 1,42	0,15 ± 0,01	+ 22,70 ± 1,55
Saflaştırma sonrası konsantrat	142,80 ± 3,35	0,19 ± 0,02	+ 27,50 ± 0,78
Saflaştırma ve ilk hacmine tamamlama sonrası	140,00 ± 1,72	0,18 ± 0,01	+ 27,70 ± 0,78

4.7. GapmeR İçeren Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeline Ait Bulgular

Bölüm 3.14’de belirtildiği şekilde hazırlanan GapmeR içeren nanopartiküller ile boş nanopartiküllere ait partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4-13’te verilmiştir.

Tablo 4-13: GapmeR İçeren ve Boş Nanopartiküllere Ait Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Değerleri

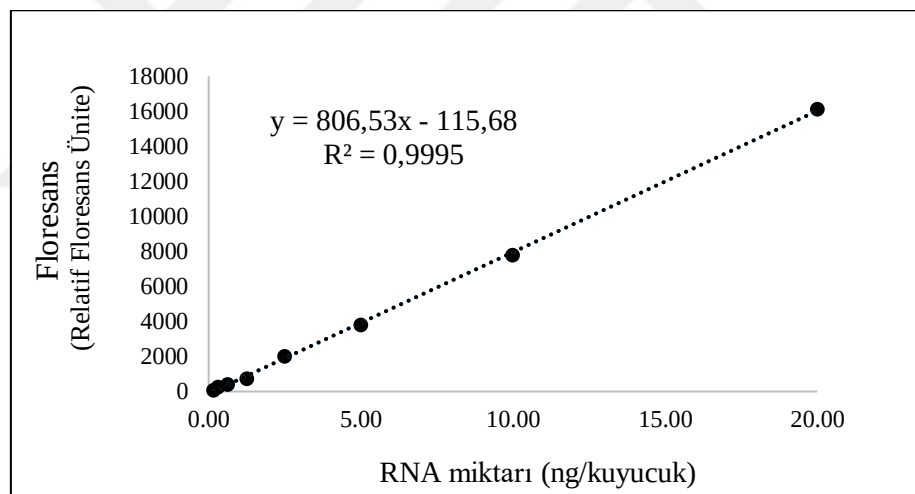
Fomülasyon	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Ortalama PDI	Ortalama Zeta Potansiyel (mV)
Boş nanopartiküller	164,90 ± 2,51	0,25 ± 0,01	+ 39,60 ± 0,81
GapmeR-NK nanopartiküller	154,20 ± 2,61	0,19 ± 0,01	+ 34,70 ± 0,55
GapmeR ST-1 nanopartiküller	153,90 ± 2,45	0,23 ± 0,01	+ 31,90 ± 0,72
GapmeR ST-2 nanopartiküller	149,00 ± 0,36	0,20 ± 0,01	+ 32,20 ± 0,87
GapmeR ST-3 nanopartiküller	154,10 ± 2,27	0,24 ± 0,03	+ 35,20 ± 0,27

4.8. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Oranına Ait Bulgular

RNA standart serisi değerleri kullanılarak, RNA miktarına karşılık floresans değerlerine ait standart eğri Bölüm 3.15’te belirtildiği şekilde elde edilmiştir. İlgili değerler Tablo 4-14’te, standart eğri ise Şekil 4-25’te verilmiştir. Standart eğri denklemi, $y=805.53x-115.68$ ve determinasyon katsayısı (R^2) 0.995 olarak bulunmuştur.

Tablo 4-14: RNA Standartlarının Floresans Değerleri

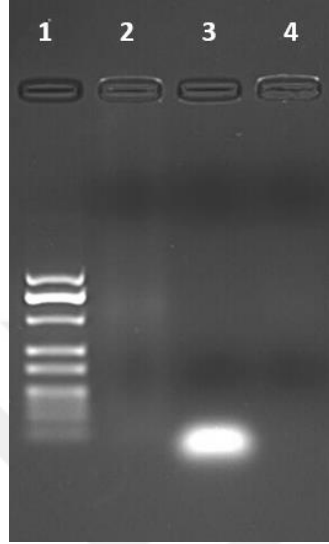
Standart No	RNA Standart Miktarı (ng/kuyucuk)	Ortalama Floresans Değerleri (Relatif Floresans Ünite)
1	20,00	16120 ± 15
2	10,00	7782 ± 227
3	5,00	3804 ± 280
4	2,50	2009 ± 139
5	1,25	746 ± 125
6	0,63	398 ± 10
7	0,31	277 ± 28
8	0,16	75 ± 6

**Şekil 4-25: RNA Miktarına Karşılık Floresans Değerlerine Ait Standart Eğri**

Bu standart eğriye ait doğru denklemi aracılığıyla GapmeR ST-2 içeren nanopartikül filtratında enkapsüle olmamış, yani serbest haldeki GapmeR miktarı tayin edilmiş ve Bölüm 3.15'te verilen Denklem 3-3 yardımıyla enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği 99.42 ± 1.10 olarak oldukça yüksek bir değer bulunmuştur. Bölüm 3.15'te verilen Denklem 3-4 yardımıyla hesaplanan yükleme oranı ise 0.43 olarak hesaplanmıştır.

4.9. Agaroz Jel Elektroforeziyle Afinite Tayinine Ait Bulgular

Agaroz jel elektroforezi çalışması Bölüm 3.16'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen elektroforez görüntüsü Şekil 4-26'da sunulmuştur.



1. DNA işaretleyicisi
2. GapmeR ST-2 nanopartikül
3. GapmeR ST-2 oligonükleotit (pozitif kontrol)
4. Boş nanopartikül (negatif kontrol)

Şekil 4-26: Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü

Jel elektroforez görüntüsüne göre 3 numaralı kuyucukta çıplak halde bulunan negatif yüklü GapmeR oligonükleotidi, elektrik akımının etkisiyle negatif yüklü elektrot katottan, pozitif yüklü elektrot anoda doğru göç etmiştir. GapmeR oligonükleotidi, enkapsüle halde kitozan nanopartiküller ile verildiğinde ise uygulandığı 2 numaralı kuyucukta büyük oranda hareketsiz olarak kalmıştır.

4.10. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

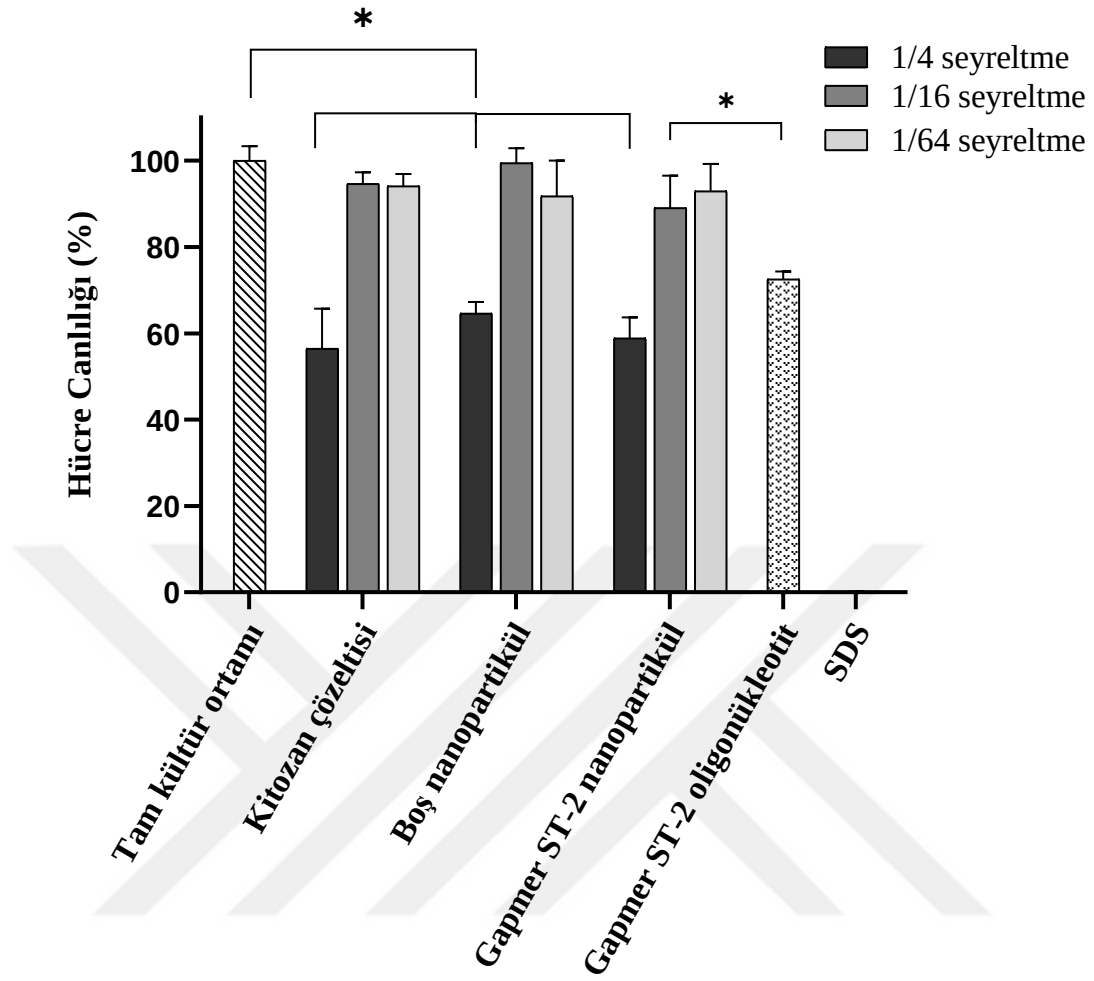
Hücre kültürü çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen sitotoksosite, konfokal mikroskopi ve ekspresyon çalışmalarına ait bulgular aşağıda alt başlıklar halinde verilmiştir.

4.10.1. Sitotoksosite Çalışmasına Ait Bulgular

Sitotoksosite çalışması için Bölüm 3.17.1’de belirtildiği gibi gerçekleştirilen MTT testi sonucunda elde edilen % hücre canlılığı değerleri Tablo 4-15’te ve Şekil 4-27’de verilmiştir.

Tablo 4-15: Uygulanan Formülasyonlara Ait Hücre Canlılığı

Formülasyon	Seyreltme Oranı	Hücre Canlılığı (%)
Tam kültür ortamı (negatif kontrol)	-	100,00 ± 0,03
Kitozan çözeltisi	1/4	56,50 ± 0,07
	1/16	94,69 ± 0,06
	1/64	94,11 ± 0,02
Boş nanopartikül	1/4	64,61 ± 0,02
	1/16	99,47 ± 0,03
	1/64	91,76 ± 0,07
GapmeR ST-2 nanopartikül	1/4	58,87 ± 0,04
	1/16	89,10 ± 0,06
	1/64	92,98 ± 0,05
GapmeR ST-2 oligonükleotit	-	72,56 ± 0,11
SDS (pozitif kontrol)	-	0,12 ± 0,00



Şekil 4-27: Uygulanan Formülasyonlara Ait Hücre Canlılığı (%)

1/4 seyreltme oranında elde edilen hücre canlılığı değeri, negatif kontrolden anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$) bulunmuştur. 1/16 ve 1/64 seyreltme oranlarında elde edilen hücre canlılığı değerleriyle negatif kontrol arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Her bir seyreltme oranı için, kitozan çözeltisi ve boş nanopartiküller için elde edilen canlılık değerleri, birbirleriyle kıyaslandığında arada anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

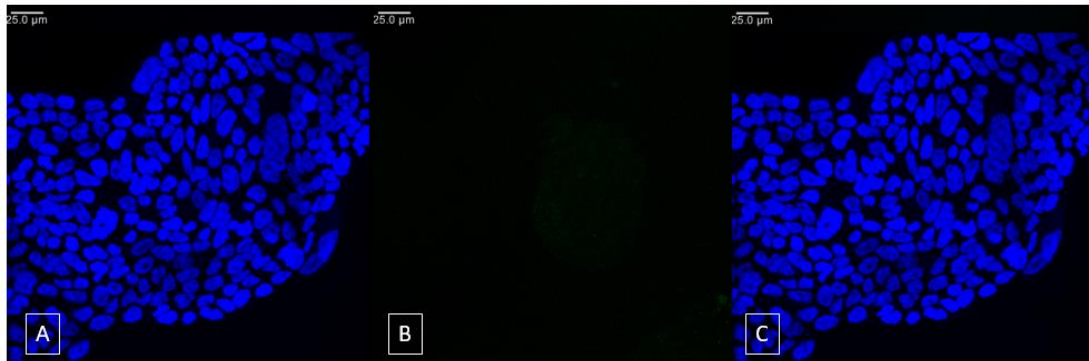
GapmeR ST-2 içeren nanopartiküllerle elde edilen hücre canlılık değerlerin, aynı seyreltme oranındaki boş nanopartiküllere ait değerlerden anlamlı olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Serbest GapmeR ST-2 oligonükleotitleriyle elde edilen hücre canlılığı, GapmeR ST-2 içeren nanopartiküllerle elde edilenden anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).

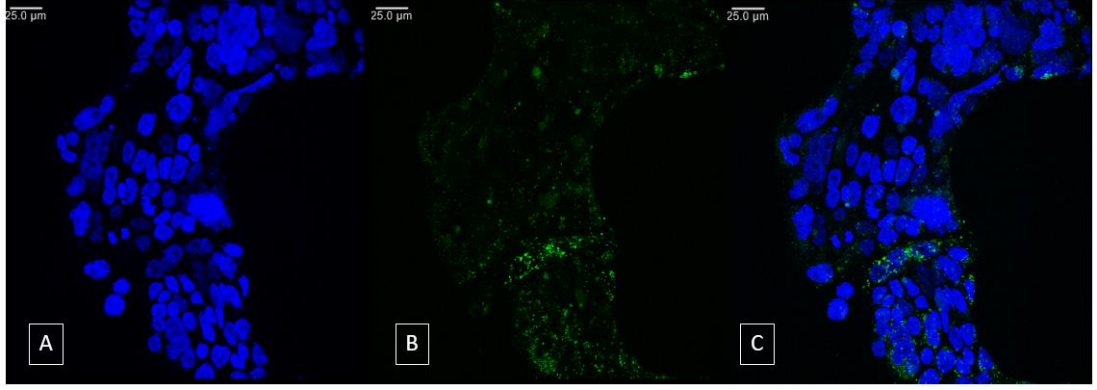
Kitozan çözeltisi, boş nanopartiküller ve GapmeR ST-2 içeren nanopartiküllerin, kendi içlerinde seyreltme oranları (1/4, 1/16 ve 1/64) birbirleriyle kıyaslandığında, 1/4 seyreltme oranındaki hücre canlılıklarının, 1/16 ile 1/64'tekilere göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). 1/16 ve 1/64 seyreltme oranlarının hücre canlılık değerleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$).

4.10.2. Konfokal Mikroskopi Çalışmasına Ait Bulgular

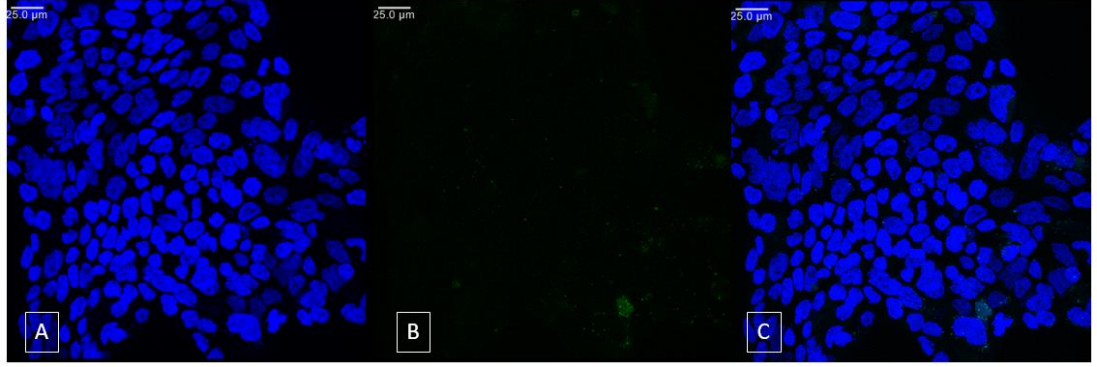
Konfokal mikroskopi çalışması Bölüm 3.17.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. 4 ayrı numunenin uygulandığı hücrelere ait görüntüler Şekil 4-28 ve Şekil 4-31 arasında verilmiştir. A görüntüleri 405 nm'deki eksitasyonda alınmış olup, DAPI ile maviye boyanmış olan hücre çekirdeklerini göstermektedir. B görüntüleri ise, 488 nm'deki eksitasyonda alınmıştır ve bu görüntülerdeki yeşil alanlar, FAM-etiketli olan GapmeR-NK oligonükleotidini göstermektedir. C görüntüleri ise farklı dalga boylarında alınan A ve B görüntülerinin çakıştırılmış halidir.



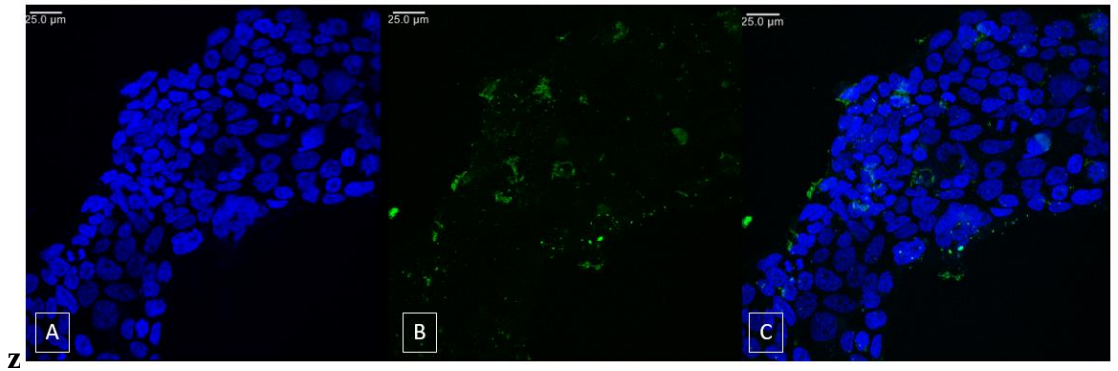
Şekil 4-28: Tam Kültür Ortamı Uygulanan Hücrelere Ait Görüntüler
A) 405 nm eksitasyonu B) 488 nm eksitasyonu C) A ve B görüntülerinin birleşimi



Şekil 4-29: GapmeR-NK Oligonükleotidi Uygulanan Hücelere Ait Görüntüler
 A) DAPI ile boyanan hücre çekirdekleri. B) FAM etiketli-GapmeR-NK oligonükleotidi.
 C) A ve B görüntülerinin birleşimi.



Şekil 4-30: Boş Nanopartikül Uygulanan Hücelere Ait Görüntüler A) 405 nm
 Eksitasyonu B) 488 nm Eksitasyonu C) 405 nm ve 488 nm Eksitasyonlarının
 Birleştirilmiş Hali



Şekil 4-31: GapmeR-NK Nanopartikül Uygulanan Hücelere Ait Görüntüler A) 405 nm
 Eksitasyonu B) 488 nm Eksitasyonu C) 405 nm ve 488 nm Eksitasyonlarının
 Birleştirilmiş Hali

4.10.3. Ekspresyon Deneylerine Ait Bulgular

Ekspresyon deneyleri Bölüm 3.17.3'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmaların RNA kantitasyonu ve ters transkriptaz qPCR analizlerine ait bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.10.3.1. Hücre Hattı Seçim Çalışmasına Ait Bulgular

Bekletme süresinin sonunda, hücrelerden izole edilen toplam RNA konsantrasyonları ile A260/280 oranları ve 500 ng RNA için alınması gerekli hacimler, Tablo 4-16'da verildiği gibidir.

Tablo 4-16: Hücre Hattı Seçim Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu

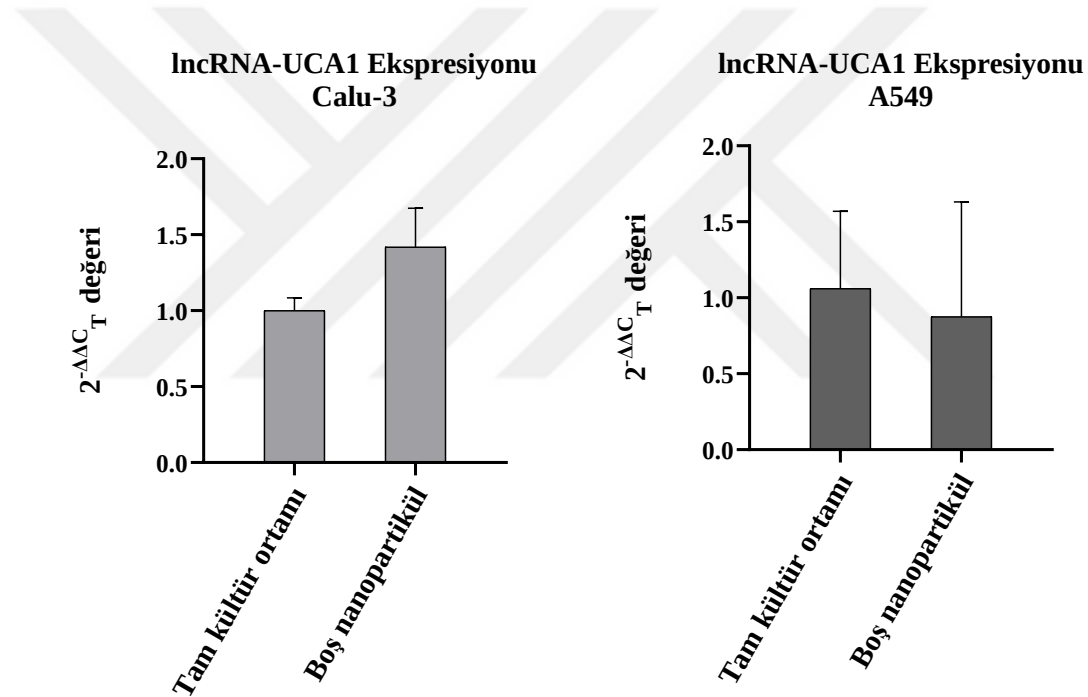
No	Numune Adı	A260/A280 oranı	RNA konsantrasyonu (ng/ μ L)	500 ng RNA için gerekli hacim (μ L)
1	Calu-3 Tam kültür ortamı	2,09	168,30	3,0
2	Calu-3 Boş nanopartikül	2,11	68,30	7,3
3	A549 Tam kültür ortamı	2,09	89,40	5,6
4	A549 Boş nanopartikül	2,08	95,90	5,2

Calu-3 ve A549 hücre hatlarında lncRNA-UCA1 ekspresyonlarının kıyaslanması için, GAPDH'e göre normalize edilmiş ve kendi kontrol kuyucuklarıyla kıyaslanarak elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri Tablo 4-17'de verilmiş ve Şekil 4-32'de gösterilmiştir.

Her hücre hattı kendi kontrolü ile kıyaslandığında, boş nanopartiküllerin beklendiği gibi lncRNA-UCA1 seviyesinde anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür.

Tablo 4-17: Hücre Hattı Seçim Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi

Hücre Hattı	Uygulama	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ Değeri (lncRNA-UCA1 Seviyesi)
Calu-3	Tam kültür ortamı (kontrol)	$1,00 \pm 0,08$
	Boş Nanopartikül	$1,42 \pm 0,26$
A549	Tam kültür ortamı (kontrol)	$1,06 \pm 0,51$
	Boş Nanopartikül	$0,88 \pm 0,75$

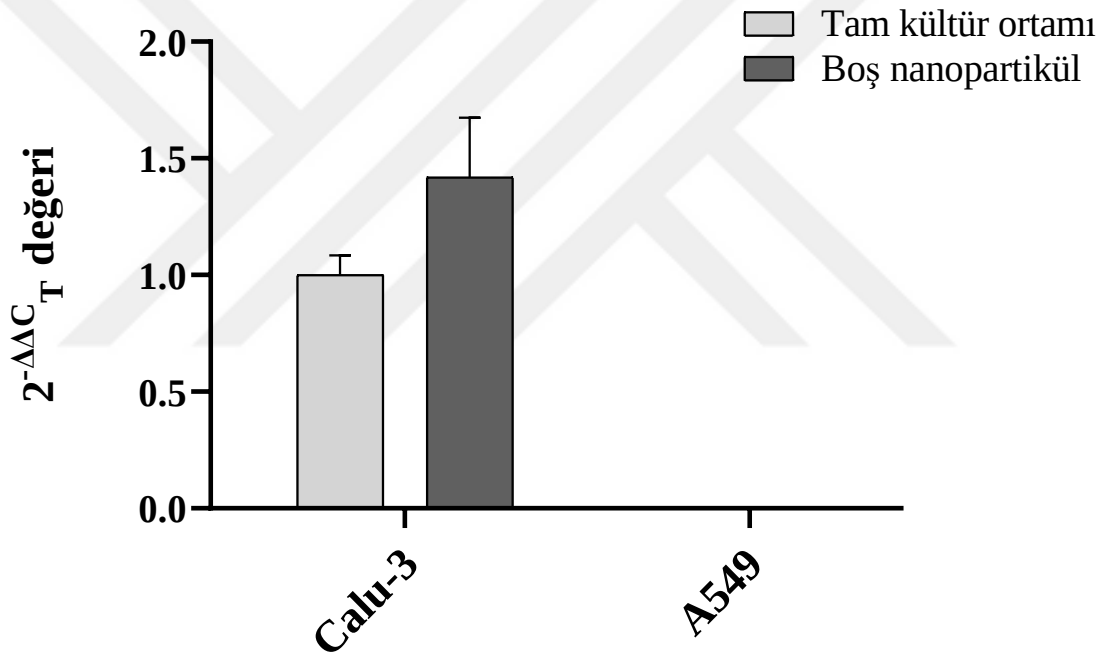


Şekil 4-32: Hücre Hattı Seçim Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi

Veriler, Calu-3 için uygulanan “tam kültür ortamı” kuyucuğu kontrol olarak kullanılarak tekrar analiz edilmiş ve bu şekilde lncRNA-UCA1 seviyeleri, hücre hatları arasında kıyaslanmıştır. GAPDH’e göre normalize edilmiş $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri Tablo 4-18’de verilmiş ve Şekil 4-33’te gösterilmiştir.

Tablo 4-18: lncRNA-UCA1 Seviyelerinin Calu-3 ve A549 Hücre Hatlarında Kıyaslanması

Hücre Hattı	Uygulama	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ Değeri (lncRNA-UCA1 Seviyesi)
Calu-3	Tam kültür ortamı (kontrol)	$1,00 \pm 0,08$
	Boş nanopartikül	$1,42 \pm 0,26$
A549	Tam kültür ortamı	$0,00 \pm 0,00$
	Boş nanopartikül	$0,00 \pm 0,00$

**Şekil 4-33: lncRNA-UCA1 Seviyelerinin Calu-3 ve A549 Hücre Hatlarında Kıyaslanması**

Bu sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildiğinde, lncRNA-UCA1 seviyesinin Calu-3 hücrelerinde, A549 hücrelerine göre anlamlı derece ($p < 0,05$) yüksek olduğu görülmüştür. Bu sebeple ileri çalışmalara Calu-3 hücre hatları ile devam edilmiştir.

4.10.3.2. Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışmasına Ait Bulgular

Bekletme süresinin sonunda, A260/280 oranları, hücrelerden izole edilen toplam RNA konsantrasyonları ve 500 ng RNA için alınması gerekli hacimler, Tablo 4-19’da verilmiştir.

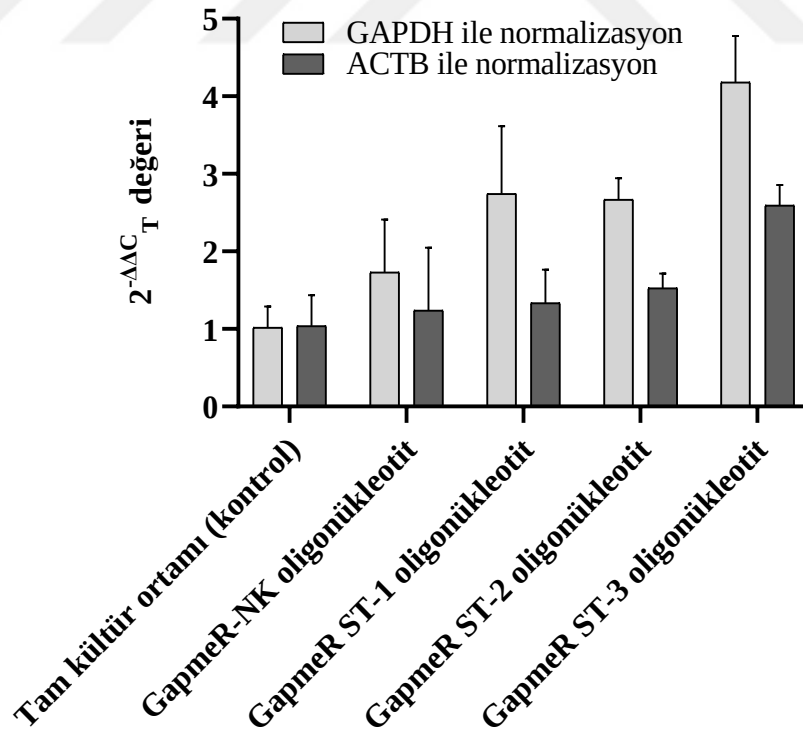
Tablo 4-19: Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu

No	Numune Adı	A260/A280 oranı	RNA konsantrasyonu (ng/ μ L)	500 ng RNA için gerekli hacim (μ L)
1	Tam kültür ortamı-1	2,06	117,94	4,2
2	Tam Kültür ortamı-2	2,05	111,63	4,5
3	GapmeR-NK oligonükleotit-1	2,07	131,33	3,8
4	GapmeR-NK oligonükleotit-2	2,06	105,09	4,8
5	GapmeR ST-1 oligonükleotit-1	2,05	156,41	3,2
6	GapmeR ST-1 oligonükleotit-2	2,05	146,16	3,4
7	GapmeR ST-2 oligonükleotit-1	2,09	138,11	3,6
8	GapmeR ST-2 oligonükleotit-2	2,05	149,54	3,3
9	GapmeR ST-3 oligonükleotit-1	2,01	130,62	3,8
10	GapmeR ST-3 oligonükleotit-2	2,03	133,82	3,7

Calu-3 hücrelerinde, GapmeR’lerin transfeksiyon ajanı aracılığıyla transfeksiyon çalışması sonucunda GAPDH ve Beta Aktin (ACTB)’e göre ayrı ayrı normalize edilerek elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri Tablo 4-20’de verilmiş ve Şekil 4-34’te gösterilmiştir.

Tablo 4-20: Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi

Normalizasyon Geni	Uygulama	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ Değeri (lncRNA-UCA1 Seviyesi)
GAPDH	Tam kültür ortamı (kontrol)	$1,02 \pm 0,27$
	GapmeR-NK oligonükleotit	$1,73 \pm 0,68$
	GapmeR ST-1 oligonükleotit	$2,74 \pm 0,87$
	GapmeR ST-2 oligonükleotit	$2,67 \pm 0,28$
	GapmeR ST-3 oligonükleotit	$4,18 \pm 0,60$
ACTB	Tam kültür ortamı (Kontrol)	$1,04 \pm 0,40$
	GapmeR-NK oligonükleotit	$1,24 \pm 0,81$
	GapmeR ST-1 oligonükleotit	$1,33 \pm 0,43$
	GapmeR ST-2 oligonükleotit	$1,52 \pm 0,19$
	GapmeR ST-3 oligonükleotit	$2,60 \pm 0,26$



Şekil 4-34: Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması – lncRNA-UCA1 Seviyesi

Beklenilenin aksine, GapmeR uygulamaları sonrası GAPDH'e ve ACTB'e göre normalize edilen lncRNA-UCA1 seviyesinde artış görülmüştür.

4.10.3.3. Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışmasına Ait Bulgular

Bekletme süresinin sonunda, A260/280 oranları, hücrelerden izole edilen toplam RNA konsantrasyonları ve 500 ng RNA için alınması gerekli hacimler, Tablo 4-21'de verilmiştir.

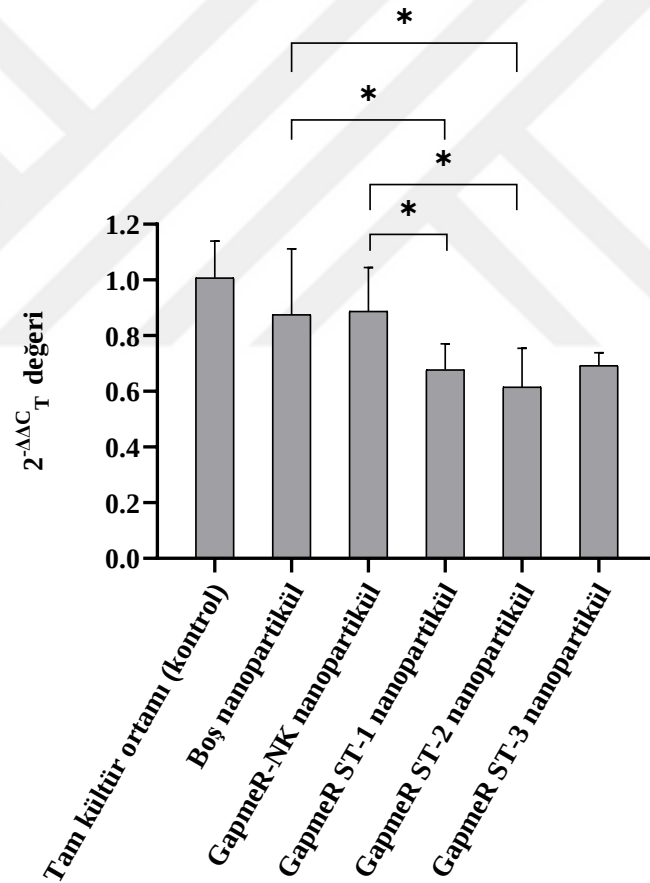
Tablo 4-21: Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu

No	Numune Adı	A260/A280 oranı	RNA konsantrasyonu (ng/ μ L)	500 ng RNA için gerekli hacim (μ L)
1	Tam kültür ortamı-1	2,09	88,10	5,7
2	Tam kültür ortamı-2	2,13	85,30	5,9
3	Boş nanopartikül-1	2,11	80,20	6,2
4	Boş nanopartikül-2	2,17	81,30	6,1
5	GapmeR-NK nanopartikül-1	2,12	87,80	5,7
6	GapmeR-NK nanopartikül-2	2,10	70,20	7,1
7	GapmeR ST-1 nanopartikül-1	2,10	78,60	6,4
8	GapmeR ST-1 nanopartikül-2	2,08	76,20	6,6
9	GapmeR ST-2 nanopartikül-1	2,18	60,80	8,2
10	GapmeR ST-2 nanopartikül-2	2,09	81,60	6,1
11	GapmeR ST-3 nanopartikül-1	2,07	78,70	6,4
12	GapmeR ST-3 nanopartikül-2	2,08	92,30	5,4

Calu-3 hücrelerinde, GapmeR'lerin geliştirilen nanopartiküller aracılığıyla transfeksiyonu çalışması sonucunda GAPDH'e göre normalize edilerek elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri Tablo 4-22'de verilmiş ve Şekil 4-35'te gösterilmiştir.

Tablo 4-22: Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi

No	Uygulama	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ Değeri (lncRNA-UCA1 Seviyesi)
1	Tam kültür ortamı (kontrol)	$1,01 \pm 0,13$
2	Boş nanopartiküller	$0,87 \pm 0,24$
3	GapmeR-NK nanopartikül	$0,89 \pm 0,16$
4	GapmeR ST-1 nanopartikül	$0,68 \pm 0,09$
5	GapmeR ST-2 nanopartikül	$0,62 \pm 0,14$
6	GapmeR ST-3 nanopartikül	$0,69 \pm 0,05$



Şekil 4-35: Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışması — lncRNA-UCA1 Seviyesi

İstatiksel analiz sonucunda kontrol grubuna göre lncRNA-UCA1 seviyesinde, GapmeR ST-1 nanopartikül ve GapmeR ST-2 nanopartiküllerin, anlamlı derecede ($p <$

0,05) düşüş sağladığı, boş nanopartikül, GapmeR-NK nanopartikül ve GapmeR ST-3 nanopartiküllerin ise anlamlı bir düşüş meydana getirmediği görülmüştür ($p > 0,05$).

GapmeR standartlarını içeren nanopartiküller birbirleriyle karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Bununla birlikte lncRNA-UCA1 seviyesini en fazla baskılayan formülasyonun, GapmeR ST-2 içeren nanopartikül formülasyonu olduğu görülmüştür.

4.10.3.4. GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik, 48 Saatlik ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışmasına Ait Bulgular

Bekletme süresinin sonunda, A260/280 oranları, hücrelerden izole edilen toplam RNA konsantrasyonları ve 500 ng RNA için alınması gerekli hacimler 24 saatlik, 48 saatlik ve 72 saatlik çalışmalar için sırasıyla Tablo 4-23, Tablo 4-24 ve Tablo 4-25'te verilmiştir.

Tablo 4-23: GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu

No	Numune Adı	A260/A280 oranı	RNA konsantrasyonu (ng/ μ L)	500 ng RNA için gerekli hacim (μ L)
1	Tam kültür ortamı-1	2,03	164,46	3,0
2	Tam kültür ortamı-2	2,03	131,65	3,8
3	Boş nanopartikül-1	2,03	74,29	6,7
4	Boş nanopartikül-2	2,06	45,87	10,9
5	GapmeR-NK nanopartikül-1	2,04	93,21	5,4
6	GapmeR-NK nanopartikül-2	2,05	113,96	4,4
7	GapmeR-NK oligonükleotit-1	2,06	195,95	2,6
8	GapmeR-NK oligonükleotit-2	2,06	138,99	3,6
9	GapmeR ST-2 nanopartikül-1	2,03	126,33	4,0
10	GapmeR ST-2 nanopartikül-2	2,02	167,60	3,0
11	GapmeR ST-2 oligonükleotit-1	2,06	134,44	3,7
12	GapmeR ST-2 oligonükleotit-2	2,05	133,54	3,7

Tablo 4-24: GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 48 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu

No	Numune Adı	A260/A280 oranı	RNA konsantrasyonu (ng/ µL)	500 ng RNA için gerekli hacim (µL)
1	Tam kültür ortamı-1	2,11	122,70	4,1
2	Tam kültür ortamı-2	2,13	95,30	5,2
3	Tam kültür ortamı-3	2,20	94,30	5,3
4	Boş nanopartikül-1	2,16	91,90	5,4
5	Boş nanopartikül-2	2,13	91,20	5,5
6	Boş nanopartikül-2	2,13	92,60	5,4
7	GapmeR-NK nanopartikül-1	2,22	66,40	7,5
8	GapmeR-NK nanopartikül-2	2,19	78,10	6,4
9	GapmeR-NK nanopartikül-3	2,17	96,10	5,2
10	GapmeR ST-2 nanopartikül-1	2,17	79,70	6,3
11	GapmeR ST-2 nanopartikül-2	2,18	72,30	6,9
12	GapmeR ST-2 nanopartikül-3	2,17	88,8	5,6
13	GapmeR ST-2 oligonükleotit-1	2,14	113,80	4,4
14	GapmeR ST-2 oligonükleotit-2	2,13	114,50	4,4

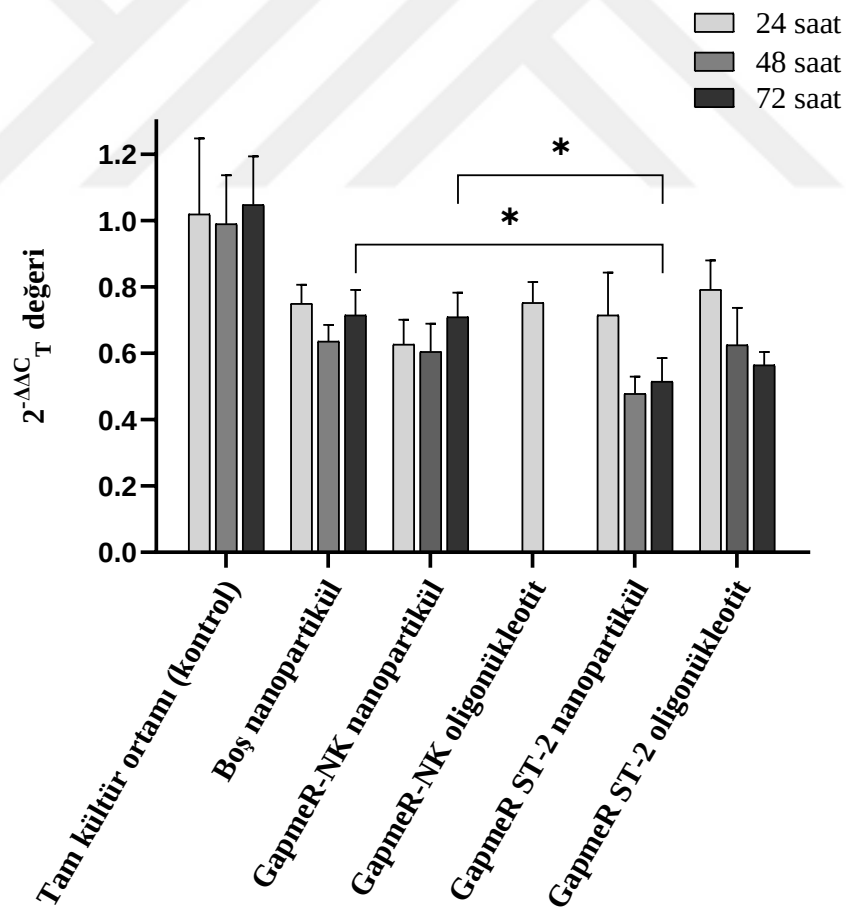
Tablo 4-25: GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - Toplam RNA Kantitasyonu

No	Numune Adı	A260/A280 oranı	RNA konsantrasyonu (ng/ μ L)	500 ng RNA için gerekli hacim (μ L)
1	Tam kültür ortamı-1	2,12	132,70	3,8
2	Tam kültür ortamı-2	2,12	130,30	3,8
3	Tam kültür ortamı-3	2,14	140,70	3,6
4	Boş nanopartikül-1	2,16	146,0	3,4
5	Boş nanopartikül-2	2,09	140,6	3,6
6	Boş nanopartikül-2	2,09	127,0	3,9
7	GapmeR-NK nanopartikül-1	2,14	164,4	3,0
8	GapmeR-NK nanopartikül-2	2,12	108,6	4,6
9	GapmeR-NK nanopartikül-3	2,09	133,8	3,7
10	GapmeR ST-2 nanopartikül-1	2,09	112,2	4,5
11	GapmeR ST-2 nanopartikül-2	2,08	102,2	4,9
12	GapmeR ST-2 nanopartikül-3	2,09	122,9	4,0
13	GapmeR ST-2 oligonükleotit-1	2,14	127,0	3,9
14	GapmeR ST-2 oligonükleotit-2	2,11	124,7	4,0

Calu-3 hücrelerinde, GapmeR ST-2'nin geliştirilen nanopartiküller aracılığıyla ve oligonükleotit halinde transfeksiyonu sonucunda GAPDH'e göre normalize edilerek elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri Tablo 4-26'da verilmiş ve Şekil 4-36'da gösterilmiştir.

Tablo 4-26: GapmeR ST-2'in Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24, 48 ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi

No	Uygulama	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ Değeri (lncRNA-UCA1 Seviyesi)		
		24 saat	48 saat	72 saat
1	Tam kültür ortamı (kontrol)	1,02 ± 0,23	0,99 ± 0,15	1,05 ± 0,14
2	Boş nanopartikül	0,75 ± 0,05	0,63 ± 0,05	0,72 ± 0,07
3	GapmeR-NK nanopartikül	0,63 ± 0,07	0,61 ± 0,08	0,71 ± 0,07
4	GapmeR-NK oligonükleotit	0,75 ± 0,09	-	-
5	GapmeR ST-2 nanopartikül	0,71 ± 0,13	0,48 ± 0,05	0,51 ± 0,07
6	GapmeR ST-2 oligonükleotit	0,79 ± 0,09	0,62 ± 0,11	0,57 ± 0,04



Şekil 4-36: GapmeR ST-2'in Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik, 48 Saatlik ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışması - lncRNA-UCA1 Seviyesi

24 saat verilerine göre, tüm uygulamalar lncRNA-UCA1 seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma meydana getirmiştir ($p < 0,05$). Uygulamaların birbirleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

48 saatlik verilere bakıldığında, 24 saatlik verilerle paralel sonuçların elde edildiği, tüm uygulamaların kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturduğu ($p < 0,05$), fakat gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

72 saatlik veriler analiz edildiğinde ise, 24 ve 48 saatlik verilerden farklı olarak, GapmeR ST-2 nanopartikül uygulamasının, boş nanopartikül ve GapmeR-NK nanopartikül uygulamalarına göre lncRNA-UCA1 seviyesinde anlamlı bir düşüş sağladığı görülmüştür ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Kanser, sık görülmesi ve ölümcül olması nedeniyle hem dünyada hem de ülkemizde görülen, en önemli toplumsal sağlık problemlerinden biridir. Dünyada ölüm nedenleri arasında, kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan kanserin, 2030 yılına kadar hızla artarak, birinci sıraya yerleşeceği öngörülmektedir [1]. Dünyada altı ölümden, Türkiye’de ise beş ölümden birine, kanser sebep olmaktadır. [17,19].

Akciğer kanseri dünyada, en yüksek mortaliteye sahip kanser türüdür ve kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %20’sini oluşturmaktadır. 2020 yılında dünyada akciğer kanseri kaynaklı 2,2 milyondan fazla yeni vaka görülmüş, aynı yıl yaklaşık 1,8 milyon hasta, bu kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir [2].

Genel olarak kanserin sık görülen ve dünyada ölüme en çok sebebiyet veren ikinci hastalık olmasının yanı sıra; kanser türleri içinde de, akciğer kanserinin en yüksek mortaliteye sahip ve en sık görülen türlerinden biri olması nedenleriyle, bu tez çalışmasında, akciğer kanserinin tedavisine yönelik olarak çalışılmaya karar verilmiştir.

Bu doğrultuda, bir tür kodlamayan RNA olan lncRNA-UCA1’in baskılanması hedeflenmiştir. İlk olarak insan mesane karsinomunda tespit edilmiş olan, lncRNA-UCA1’in akciğer kanserinde yüksek oranda eksprese olduğu ve malign tümörlerin ortaya çıkması ve gelişmesinde önemli bir rol oynadığı keşfedilmiştir [10,11]. lncRNA-UCA1 seviyesinin baskılanmasının ise, akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücre çoğalması ve göçünü engellediği bildirilmiştir [12–14]. Bu nedenle bu tez çalışmasında lncRNA-UCA1 seviyesinin düşürülmesi hedeflenerek, akciğer kanseri tedavisinde literatüre katkı sunulması amaçlanmıştır.

Hedef molekül olan lncRNA-UCA1’in baskılanması için ise, gen tedavi yaklaşımlarından biri olan antisens teknolojisiinden yararlanılmıştır. Antisens teknolojisi kapsamında, bir tür yenilikçi antisens oligonükleotitler kullanılmıştır. Antisens LNA GapmeR ismiyle pazarlanan ve tezde kısaca GapmeR olarak bahsedilen bu antisens oligonükleotitler, 16 nükleotit uzunluğundaki nükleotit dizileridir.

Genel olarak gen tedavi ürünlerinde olduğu gibi, GapmeR’lerin intravenöz veya subkutan olarak uygulanacağı varsayılırsa, ilk karşılaşılan bariyerler doku ve kan dolaşımı kaynaklı olacaktır. Bunların başlıcaları, nükleazlar, immun sistem aktivasyonu ve bağ doku, epitel doku gibi bariyerlerdir. GapmeR’ler, bu bariyerlerden kaçarak hücre

zarına ulaşmalıdır. Bu noktada negatif yüklü olarak değerlendirilen hücre zarı, yine negatif yüklü olan GapmeR'ler için bir diğer önemli biyolojik engel olacaktır. En son bu engeli de çeşitli yaklaşımlarla aşabilen ve hücre içine alınan oligonükleotit, hücre içinde endozomal yıkımdan ve endonükleazlardan da kaçabilmelidir [8,96]. Bu tez çalışmasında GapmeR'lerin bahsedilen bu biyolojik engellere karşı korunup, hücrelere taşınmasını sağlamak için, viral olmayan taşıyıcı bir sistem olarak nanopartiküller geliştirilmiştir.

Nanopartiküllerin intravenöz enjeksiyon sonrası vücuttaki dağılımı, biyolojik çevreyle etkileşimlerden oldukça etkilenir. Biyolojik çevreyle etkileşim ise partikül boyutu, yüzey yükü gibi fizikokimyasal özelliklere bağlıdır [151]. Nanopartiküllerin mikron altı boyutları, mikropartiküllere göre belirgin bir dizi avantaj sunmaktadır. Nanopartiküller, mikropartiküllere kıyasla genel olarak daha yüksek hücre içi alımına sahiptir [152,153]. Bu nedenle partikül boyutu, gen transferinde çok önemlidir. Prabha vd. [154] tarafından gerçekleştirilen çalışmada poli laktik-ko-glikolik asit nanopartiküllerinin farklı boyut fraksiyonlarının gen transfeksiyon seviyeleri araştırılmıştır. Bu çalışmada, daha küçük nanopartiküllerin, daha büyük olanlara göre, COS-7 (maymun böbrek epiteli) hücre hattında 27 kat ve HEK293 (insan embriyonik böbrek epiteli) hücre hattında 4 kat daha yüksek transfeksiyon sağladığı gösterilmiştir. Nanopartiküllerinin hücre alımı transfeksiyon sürecindeki hız sınırlayıcı basamaklardan biridir ve partikül boyutundan etkilenmektedir [155].

Nanopartiküllerin hazırlanmasında biyoparçalanabilir ve biyouyumlu olması, düşük toksisiteye sahip olması nedenleriyle kitozan polimeri [99,100] tercih edilmiştir. Ayrıca, kitozan pozitif yükü sayesinde [15], tez çalışmasında kullanılan ve negatif yüke sahip GapmeR'lerle kolayca etkileşime girmiştir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen nanopartiküllerin vücuda verilmeleri durumunda, nanopartiküllerin partikül boyutu ve kanser dokusundaki artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi sebebiyle pasif hedefleme yaklaşımı [105] geçerli olacaktır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla, akciğer kanseri tedavisi için lncRNA-UCA1 seviyesinin düşürülmesine yönelik olarak GapmeR oligonükleotitlerini taşıyan kitozan nanopartiküller geliştirilmiştir. Geliştirilen taşıyıcı sistemin optimizasyonu sağlanmış, karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve akciğer kanseri hücrelerinde lncRNA-UCA1'in seviyesine olan etkisi üzerine *in-vitro* etkinlik testleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar aşağıda ayrı başlıklar halinde değerlendirilmiştir.

5.1. Boş Nanopartiküllere Ait Optimizasyon Çalışmasının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında, iyonik jelasyon yoluyla elde edilen nanopartiküllerin optimizasyonu amacıyla, kitozan ve TPP çözeltileri farklı koşullarda bir araya getirilmiştir. Bu koşulların nanopartikül oluşumuna, nanopartiküllerin boyutuna ve zeta potansiyeline etkisi incelenmiştir. Mevzu bahis bu koşullar; **i.** kitozan/TPP kütle oranı, **ii.** kitozan çözeltisinin pH'sı, **iii.** iki çözeltinin birleştirilmesi esnasındaki karıştırma hızıdır.

5.1.1. Boş Nanopartikül Eldesinde Kitozan/TPP kütle Oranının Değerlendirilmesi

Kitozanın katyonik bir polielektrolit olduğu göz önüne alındığında, bu tez çalışmasında nanopartikül hazırlığı, kitozan ve karşıt iyonu olan TPP arasındaki etkileşimin kontrol edilerek jelleşmesine dayanmaktadır. Bu anlamda, bu jelleşme sürecinin, belirli miktarlarda kitozana karşılık, belirli miktarlarda TPP ile mümkün olduğu bilinmektedir [122]. Bu sebeple, öncelikle [3.0:1], [3.5:1], [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1], [6.0:1] olmak üzere farklı kitozan/TPP kütle oranlarıyla çalışılmıştır.

Kitozan/TPP kütle oranı [3.0:1] ve [3.5:1] olan formülasyonlarda çökme gözlemlendiğinden (Şekil 4-1), bu oranlar ile çalışılmaya devam edilmemiştir. Çökmenin sebebi olarak literatürde iki argüman mevcuttur. İlki, kullanılan kitozan çözeltisinin konsantrasyonuyla ilgilidir. Asidik koşullar altında, kitozan konsantrasyonu ancak belirli bir sınırın altında olduğu zaman, elektrostatik itme ve zincirler arası hidrojen bağı etkileşimlerinin dengede olduğu bildirilmiştir. Bu sınırın üzerinde, kitozandaki $-NH_3^+$ grupları yüzey korumasına neden olma eğilimindedir. Bu durum, çapraz bağlama işlemi sırasında, moleküller arası hidrojen bağının baskınlığıyla sonuçlanır. Böylece tek bir partikülün çapraz bağlanmasında çok sayıda kitozan molekülü bir araya gelmiş olur ve büyük partiküller oluşur. Partiküller arasındaki elektrostatik itme, bu büyük partiküllerin stabilitesini korumada yeterli olmadığından, çökmelerine sebep olur [156]. Çökmenin sebebi olarak ifade edilen diğer argüman, düşük kitozan/TPP kütle oranına bağlı olarak, aşırı anyonik yük varlığı sebebiyle, kitozanın pozitif yükünün nötralize olmasıdır. Bu durumda çökme, partiküller arasındaki itme kuvvetinin azalması veya tamamen kaybolmasından ötürü gerçekleşir. Tam ters olarak, kitozan/TPP kütle oranı çok yükseldiğinde partikül oluşmaması da, kitozanın amino gruplarını nötralize etmek için yeterli sayıda anyonik yükün olmayışına bağlanmaktadır [157]. Tez çalışmasında, kitozan/TPP kütle oranı [3.0:1] ve [3.5:1] olan formülasyonlarda görülen çökmenin,

ikinci argüman olan, aşırı anyonik yük sebebiyle itme kuvvetlerinin azalmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Zira kullanılan kitozan çözeltisinin konsantrasyonu, çökme görülmeyen diğer kitozan/TPP kütle oranlarında da çöken formülasyonlardakiyle aynı olup, 1 mg/ml'dir. Bu nedenle bu çalışmada meydana gelen çökme, ilk argümanda bahsedilen yüksek kitozan konsantrasyonuna değil, düşük kitozan/TPP kütle oranına bağlı aşırı anyonik yük varlığına bağlanmaktadır. Kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlarda ise anyonik yük aşırı olmadığından çökme gözlenmeksizin nanopartikül oluşumu sağlanmıştır.

Kitozan-TPP nanopartiküllerde kitozan/TPP kütle oranına bağlı bir özellik olarak olarak, son karışımda elde edilen kitozan ve TPP konsantrasyonlarının nanopartikül oluşumuna etkisi değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasında nanopartiküllerin oluşturulabildiği, kitozan/TPP kütle oranları [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için son karışımdaki konsantrasyonlar, kitozan için 0.80 - 0.86 mg/ml ve TPP için ise 0.20 - 0.14 mg/ml aralığındadır. Literatürdeki çalışmalara göre kitozan-TPP nanopartiküllerin oluşumu bazı spesifik kitozan ve TPP konsantrasyonları için mümkündür [122,126,128,156]. Farklı konsantrasyonlarda kitozan ve TPP içeren karışımlar, görsel olarak incelenerek, berrak çözelti, opalesan süspansiyon ve agregatlar şeklinde üç sistem tanımlanmıştır. Opalesan süspansiyon bölgesiyle ifade edilen, elde edilmesi istenen nanopartiküllerin oluşum bölgesidir. Bu bölge için kitozan ve TPP'nin son karışımdaki konsantrasyonları açısından limitler bildirilmiştir. [122,128,156]. Tez çalışmasında son karışımda kitozan ve TPP'ye ait yukarıda verilen konsantrasyonlar, literatürdeki çalışmaların bildirdiği üst limitlerin oldukça altında olup, bu açıdan literatürlerle uyumludur. Aynı kitozan/TPP kütle oranlarında, literatürdeki çalışmalardan elde edilenlere kıyasla [122,130], daha küçük nanopartiküller elde edilmesi, muhtemelen tez çalışmasında daha düşük konsantrasyonda çözeltiler kullanılmasına bağlıdır. Hazırlanan bu formülasyonlar, nanopartiküllerin oluşuğunu gösteren opalesan bir süspansiyon görüntüsüne de sahiptir (Şekil 4-1). Son karışımdaki konsantrasyonlar, kitozan için 0.78 mg/ml ve TPP için 0.22 mg/ml olduğunda ise (kitozan/TPP kütle oranının [3.5:1] olduğu formülasyonda), çökme görüldüğünden, artık süspansiyon bölgesinden çıkıldığı ve agregat bölgesine geçiş yapıldığı anlaşılmaktadır (Şekil 4-1).

Tez kapsamında çökme görülmezsizin nanopartikül oluşumunun sağlandığı kitozan/TPP kütle oranları, [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan

formülasyonlarla ilk etapta ortalama $176,20 \pm 2,16$ nm ile $225,00 \pm 3,61$ nm aralığında boyutlara sahip partiküller elde edilebilmiştir (Tablo 4-1). Tümör dokularının kılcal damarlarında ortaya çıkan açıklıkların 200-2000 nm arasında değiştiği göz önüne alındığında, 200 nm dolaylarında ve daha küçük nanopartiküllerin, tümör dokularına pasif olarak hedefleneceği ve bu hücreler tarafından alınacağı öngörülmektedir [108]. Bu açıdan ilk çalışmada hazırlanan nanopartiküllerin, boyut açısından istenen değerlerde olduğu söylenebilir. Partikül boyut dağılımının ifadesi olan polidispersite indeksi (PDI) değerleri de $0,23 \pm 0,01$ ile $0,29 \pm 0,04$ arasında olduğundan (Tablo 4-1), sistemlerin uygun bir boyut dağılımına sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Tez çalışmasında kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1]'den [5.5:1]'e arttıkça, partikül boyutunun bir miktar azaldığı, [6.0:1] oranında ise tekrar bir miktar arttığı görülmüştür. Yani en küçük partiküller [5.5:1] oranında elde edilmiştir. Zhang vd. [126] de, aynı kitozan/TPP kütle oranlarıyla çalışmış olup, en küçük partiküllerin [5.0:1] oranında elde edildiğini, daha yüksek veya daha düşük oranlarda, partikül boyutunun arttığını bildirmiştir. [5.0:1] oranındaki kitozan-TPP birleşiminin, muhtemelen amino gruplarının en verimli şekilde çapraz bağlanmasını sağlayarak, en kompakt partikül yapısının oluşumuna öncülük ettiği rapor edilmiştir [126]. Tez çalışması ile literatür çalışması arasında, en küçük partiküllerin oluşumunu sağlayan kitozan/TPP kütle oranındaki bu ufak farklılık, kullanılan kitozan tiplerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Tez çalışması ve Zhang vd. [126]'nin yaptığı çalışmanın aksine, kitozan/TPP kütle oranları arttığında partikül boyutunun arttığını bildiren çalışmalar da mevcuttur [133,156,158].

Tez çalışmasında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutlarının yanı sıra zeta potansiyelleri de ölçülmüştür. Elde edilen tüm nanopartikül formülasyonları pozitif zeta potansiyel değerlerine sahiptir. Bu durum kitozan-TPP partiküllerinin tipik özelliğidir ve partikül oluşum mekanizmasıyla açıklanabilmektedir. Kitozandaki pozitif yüklü amin grupları, TPP moleküllerindeki negatif yükler ile etkileşerek nötralize edilir [118,122]. Pozitif yükten sorumlu olan ise nötralize edilmeyen, artık amino gruplarıdır [159]. Bir kolloidal sistemin zeta potansiyel değerinin büyüklüğü, sistemin potansiyel stabilitesi hakkında bilgi verir. Bir kolloit içindeki partiküller negatif veya pozitif, yüksek zeta potansiyele sahip olduğunda birbirlerini itme eğilimi gösterirler ve topaklaşma meyli görülmez. Eğer partiküller düşük zeta potansiyel değerine sahipse, o zaman partiküllerin bir araya gelip topaklaşmasını önleyecek bir kuvvet yoktur. Kararlı

ve kararsız kolloitler arasındaki genel ayrım çoğunlukla +30 mV veya -30 mV'ta yapılır. +30 mV'tan daha pozitif veya -30 mV'tan daha negatif zeta potansiyele sahip sistemler, genellikle kararlı olarak değerlendirilir [135]. İlk çalışmada hazırlanan kitozan/TPP kütle oranları [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri $+29,10 \pm 1,49$ mV ile $34,20 \pm 2,71$ mV aralığında (Tablo 4-1) bulunmuştur. Partiküllerin bu şekilde 30 mV dolaylarında net pozitif yüke sahip olması, partikül agregasyonunun önlenmesi ve hücre zarının negatif yüküyle elektrostatik etkileşimin teşvik edilmesi açısından istenilen bir özelliktir [160]. Tez çalışmasında kitozan/TPP kütle oranı arttıkça zeta potansiyel değerlerinde de bir miktar artış olmuştur (Tablo 4-1). Literatürdeki pekçok çalışmayla da, tezin bu bulgusu desteklenmiş, kitozan/TPP kütle oranı arttıkça zeta potansiyel değerlerinde artış olduğu bildirilmiştir. Bu durum kitozan nanopartiküllerin yüzeyinde serbest amino gruplarının arttığını göstermektedir [126,130,133,156,158].

5.1.2. Boş Nanopartikül Eldesinde Kitozan Çözelti pH'sının Değerlendirilmesi

Kitozan-TPP nanopartiküllerinin optimizasyonunda incelenen diğer değişken, kullanılan kitozan çözeltisinin pH'sıdır. Kitozan zayıf bir baz polisakkarittir, nötr ve alkali pH değerlerinde çözünmez. Asidik ortam, kitozandaki daha fazla amin grubunun protonlanmasına yol açarak moleküle daha fazla pozitif yük sağlarken, TPP'nin ise negatif yük sayısının azalmasına sebep olur. Dolayısıyla TPP'nin ve kitozanın yük sayısı, esas olarak çözelti pH'sıyla kontrol edilir ve kitozan-TPP nanopartiküllerinin oluşumunu sağlayan iyonik çapraz bağlama işlemi, pH'ya duyarlıdır [126,130,158,161]. Çözelti pH'sı arttığında, (özellikle kitozanın 6.3 olan pKa'sına yaklaşıldığında) kitozanın amin gruplarının iyonizasyon derecesi büyük ölçüde azalır [126,161].

Tez çalışmasında nanopartikülleri oluşturmak için pH'sı 4.0, 4.5 ve 5.0 olmak üzere üç farklı kitozan çözeltisi kullanılmıştır. Her bir pH çalışması, [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olmak üzere üç farklı kitozan/TPP kütle oranı için yürütülmüştür. Ayrıca iki farklı karıştırma hızı da kullanıldığından, aynı karıştırma hızına sahip olan formülasyonlar kendi içlerinde değerlendirilmiştir. Karıştırma hızı 300 rpm olan formülasyonlarda pH arttıkça elde edilen partiküllerin boyutu azalmıştır. Ancak azalma miktarları, farklı kitozan/TPP kütle oranları için aynı olmamıştır. Kitozan/TPP kütle oranı [5.0:1] olan formül için partikül boyutunda sadece 5 nm'lik bir azalma söz konusuysa, kitozan/TPP

kütle oranı [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için 30-35 nm'lik, azalmalar olmuştur. Gan vd. [158] tarafından, bu tez çalışmasındakine benzer kitozan/TPP kütle oranlarında ([4.0:1] ve [7.0:1] aralığında) ve benzer pH'daki (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 ve 6.0) kitozan çözeltisiyle hazırlanan nanopartiküllerde, tez çalışmasında olduğu gibi, pH değeri arttıkça partikül boyutu azalmıştır. Bunun aksine, Katas ve Alpar [130] tarafından yapılan çalışmada, pH 6.0'dan pH 4.5'e düşürüldüğünde partikül boyutunda da bir azalma gözlenmiştir. Bu durumun, protonlanmış amin gruplarının artmasına bağlı olarak, TPP iyonlarıyla verimli bir şekilde etkileşmeden kaynaklandığı bildirilmiştir [130]. Çalışmalar arasındaki farklılık, kullanılan kitozanın tipinden (deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, tuz yapısı vs), çözelti konsantrasyonundan veya kitozan/TPP kütle oranlarının farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Tez çalışmasında karıştırma hızı olarak 600 rpm seçildiğinde ise, tüm kitozan/TPP kütle oranları için, pH'sı 4.5 olan kitozan çözeltisi kullanıldığında, pH'sı 4.0 ve 5.0 olana göre, 15-20 nm daha büyük partiküller elde edilmiştir. 300 rpm karıştırma hızıyla elde formülasyonlarda, pH arttıkça elde edilen partikül boyutu azalırken, 600 rpm'de daha farklı bir durum görülmesi, partikül boyutlarının hem pH'dan hem de karıştırma hızından etkilendiğini göstermektedir.

Tez çalışmasında üç farklı pH'daki kitozan çözeltisiyle elde edilen zeta potansiyel değerleri incelendiğinde ise, pH azaldıkça zeta potansiyelin arttığı görülmüştür (Tablo 4-2, Tablo 4-3 ve Tablo 4-4). Bunun nedeni, daha asidik ortamda kitozan molekülündeki -NH₂ gruplarının daha fazla sayıda -NH₃⁺ olarak protonize olmasıdır. Dolayısıyla düşük pH'da meydana gelen net pozitif yük artışı, beklenen bir sonuçtur. Tez çalışmasında en düşük zeta potansiyel, pH 5.0'te görülmüştür. En yüksek zeta potansiyel değeri ise, pH 4.0'te elde edilmiştir. Dolayısıyla, daha stabil formülasyonların hazırlanabilmesi için pH'sı 4.0 olan kitozan çözeltisiyle çalışmaya karar verilmiştir. Gan vd. [158]'nin yaptığı çalışmada ise, pH 5.5'teki kitozan çözeltisiyle en yüksek zeta potansiyele sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Bununla beraber pH 4.0, pH 4.5 ve pH 5.5'taki çözeltiyle elde edilen zeta potansiyel değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Fakat pH 5.0'te, tez çalışmasında olduğu gibi önemli bir düşüş söz konusu olmuştur.

5.1.3. Boş Nanopartikül Eldesinde Karıştırma Hızının Değerlendirilmesi

Kitozan-TPP nanopartiküllerinin oluşumunda incelenen son değişken, karıştırma hızıdır. Tez çalışmasında, farklı pH'daki kitozan çözeltileriyle hazırlanan, farklı kitozan/TPP kütle oranlarına sahip formülasyonlarda 300 rpm ve 600 rpm olmak üzere iki farklı karıştırma hızının partikül boyutu ve zeta potansiyeli etkileyip etkilemediği incelenmiştir. Karıştırma hızı 300 rpm'den 600 rpm'e çıkarıldığında tüm formülasyonlar için daha küçük partiküllerin elde edildiği görülmüştür (Tablo 4-2, Tablo 4.3 ve Tablo 4-4). Bununla birlikte kitozan çözelti pH'sı 4.0 olan formülasyonlarda, karıştırma hızıyla nanopartikül boyutlarındaki azalma, üç farklı kitozan/TPP kütle oranı için de yaklaşık 30'ar nm olup, kitozan çözelti pH'sı 4.5 ve 5.0 olan formülasyonlara göre (~5-15 nm) daha fazladır. Buradan farklı kitozan çözelti pH'sı ile hazırlanan formülasyonların karıştırma hızından farklı oranda etkileneceği sonucu çıkarılabilir. Zeta potansiyel ise, karıştırma hızından etkilenmemiştir.

Sonuçta tüm formülasyonlar için daha küçük partikül boyutu elde edildiğinden, ileri çalışmalar için karıştırma hızı olarak 600 rpm seçilmiştir. Seçilen bu karıştırma hızında partikül boyutu ve zeta potansiyeller, kitozan/TPP kütle oranları açısından değerlendirildiğinde ise, [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] formülasyonları arasında belirgin farklılıklar olmadığı görülmüştür.

Fàbregas vd. [162] kitozan-TPP nanopartikülleri hazırlarken bazı fiziksel parametrelerin (karıştırma hızı, karıştırma süresi ve TPP'in kitozan üzerine eklenme süresi) partikül boyutu üzerine etkisini incelemiştir. Bu çalışmanın birinci kısmında, 500 rpm ve 700 rpm olarak iki farklı karıştırma hızı kullanılmış ve karıştırma hızı arttıkça partikül boyutu azalmıştır. Zeta potansiyelin ise etkilenmediği bildirilmiştir. Hem tez çalışmasında hem bu literatür çalışmasında karıştırma hızı arttığında partikül boyutu küçüldüğünden, iki çalışmanın bu yönden birbirini desteklediği görülmektedir. Literatürdeki çalışmada incelenen diğer iki parametre (karıştırma süresi ve TPP'in kitozan üzerine eklenme süresi) ise, partikül boyutu ve zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir değişiklik yaratmamıştır. Çalışmanın ikinci kısmında, diğer parametreler sabit tutularak, 500 rpm, 600 rpm, 700 rpm, 800 rpm ve 900 rpm olacak şekilde sadece karıştırma hızları değiştirilmiştir. En küçük partiküller 700 rpm'de elde edilmiş, bundan yavaş ve hızlı karışırmalarda boyut kademeli olarak artmıştır. Buradan çıkan sonuç, seçilecek karıştırma hızının da optimum bir değerde olması gerektiğidir. Zeta

potansiyelin karıştırma hızlarından etkilenmediği tekrar görülmüştür. Tez çalışmasında ise sadece iki farklı karıştırma hızıyla çalışılmıştır. Literatür çalışmasında elde edilen nanopartiküllerin morfolojisi, çalışılan fiziksel parametrelerden önemli ölçüde etkilenmemiş olup, yüzey şekli tüm koşullar altında esasen aynı kalmıştır [162].

Optimizasyon çalışmalarının sonucunda, pH'sı 4.0 olan kitozan çözeltisiyle ve 600 rpm karıştırma hızında hazırlanan nanopartiküllerle devam edilmeye karar verilmiştir. Kitozan/TPP kütle oranı ise, dispersiyonların stabilite çalışması sonucunda [5.0:1] olarak belirlenmiştir. Zira optimizasyon çalışmaları kapsamında birbirine çok yakın kitozan/TPP kütle oranları kullanıldığından, bu orana bağlı olarak partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri açısından belirgin farklılıklar gözlenmemiştir.

5.2. Liyofilizasyon Sonrası Disperse Edilen Boş Nanopartiküllerin Değerlendirilmesi

Liyofilizasyon işlemi öncesi ve sonrasında elde edilen nanopartikül dispersiyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri kıyaslanmıştır (Tablo 4-5). Elde edilen dispersiyonun liyofilizasyon öncesine ait ortalama değerleri, partikül boyutu için $210,10 \pm 4,04$ nm, PDI için $0,29 \pm 0,01$ ve zeta potansiyel için $40,50 \pm 0,74$ mV olarak bulunmuştur. Liyofilize tozun sulandırılması sonrasında ise yeniden dağılma, tam olarak gerçekleşmemiş ve agregasyon nedeniyle liyofilizasyon öncesindeki değerlere göre partikül boyutunda 10 kattan fazla bir artış ve zeta potansiyelde yarı yarıya bir düşüş meydana gelmiştir. Oluşan agregatları dağıtabilmek amacıyla dispersiyon, 1 dakika ve 15 dakika süreyle ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. 1 dakikalık bu işlem sonrası elde edilen partikül değeri, liyofilizasyon öncesi değerin yaklaşık 2 katına kadar inebilmiştir. PDI değeri ise $0,29 \pm 0,01$ 'den $0,51 \pm 0,06$ 'ya yükselmiştir. Bu durum, nanopartiküllerin monodispers dağılımdan uzaklaştığını göstermektedir. Zeta potansiyel değerinin ise, ilk elde edildiği değere yakın bir değer olduğu görülmüştür. 15 dakikalık ultrasonikasyon işleminden sonra elde edilen partikül değeri ise, ilk değerin ancak 1,5 katına kadar inebilmiştir. PDI değeri ise $0,35 \pm 0,04$ 'tür. Zeta potansiyel değerinin yine, ilk elde edildiği değere yakın bir değer olduğu görülmüş olup ultrasonikasyon işleminin zeta potansiyeli etkilemediği söylenebilir. Ultrasonikasyon işlemi, bu işleme rağmen partikül boyutunda liyofilizasyon öncesi değerlere ulaşamamanın yanı sıra, elde edilen nanopartiküllerin yapısını bozma, oligonükleotitlerin parçalanmasına sebep olma ve/veya

nanopartiküllerden oligonükleotit salımına neden olma gibi ihtimallerden dolayı bu tez çalışmasında çok uygun bir yaklaşım olarak görülmemiştir. Bu nedenle liyofilizasyon ve ultrasonikasyon işlemlerinden vazgeçilmesine karar verilmiştir.

Nitekim, Tang vd. [163]'nin kitozan-TPP nanopartiküllerin ultrasonikasyonu üzerine yaptıkları çalışma, bu kararı desteklemektedir. Tang vd. [163], mikroskopik inceleme sonrası, ultrasonikasyon uygulanan nanopartiküllerin kırılmalı ve parçalarına ayrılmış olduğunu ve dahası 3 haftalık bekleme süresinden sonra nanopartiküllerdeki hasarın arttığını, küresel şekillerini kaybettiğini, dallanan kollara sahip düzensiz şekillerin oluştuğunu bildirmiştir. Bu nedenle, ilaç taşıyıcı sistem olarak kitozan nanopartikülleri hazırlanırken veya optimize edilirken, yüksek yoğunluklu ultrasonikasyon kullanımı tavsiye edilmemiştir [163]. Ultrasonikasyonun, kitozanın depolimerizasyonuna neden olduğu, partikül boyutundaki ve polidispersitedeki değişikliklerin, bu durumdan kaynaklandığı ifade edilmiştir. Nanopartiküllerin zeta potansiyeli ise, ultrasonikasyonun ardından önemli ölçüde değişmemiştir. Ultrasonikasyon 8 dakikanın veya 60 genliğin üzerinde gerçekleştirildiğinde, boyut küçültme hızı önemli ölçüde yavaşlamış ve ~300 nm'lik bir sınırlayıcı bir boyuta ulaşılmıştır. Yani ultrasonikasyon etkilerine, büyük nanopartiküllerin küçük nanopartiküllerden daha duyarlı olduğu görülmüştür [163]. Bu tez çalışmasında da bu bulguyu destekler nitelikte, ilk 1 dakikalık ultrasonikasyon sonucunda partikül boyutunda oldukça büyük bir azalma ($2771,00 \pm 767,90$ nm'den $419,50 \pm 9,36$ nm'ye) görülmüştür. Ardından 14 dakika daha ultrasonikasyon uygulanmasına rağmen, partikül boyutundaki azalma ($419,50 \pm 9,36$ nm'den $316,70 \pm 7,84$ nm'ye), işlem süresinin artışına oranla oldukça düşük kalmıştır. Diğer yandan Gvili vd. [164] de, çıplak DNA'nın 1-4 dakika sonikasyon sonrası parçalandığını, enkapsüle olan DNA söz konusu olduğunda ise, sonikasyon süresi kısaltıldığında daha iyi enkapsülasyon verimi elde edildiğini ve daha az parçalanma görüldüğünü bildirmiştir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasına konu olan ve DNA gibi oligonükleotit yapısındaki GapmeR'ler ile nanopartikül üretimi söz konusu olduğunda sonikasyon işleminden uzak durulmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.

Lee vd. [159] de modifiye edilmemiş kitozan-TPP nanopartiküllerin, güçlü molekül-içi ve moleküller-arası hidrojen bağları nedeniyle liyofilizasyon sonrasında agrege olduğunu ve agregatların sonikasyon ile yeterince parçalanamadığını bildirmiştir.

Literatürde, tez çalışmasında olduğu gibi, kitozan-TPP nanopartiküllerin liyofilizasyon işlemi sonrası yeniden dağılımlarında problem olduğunu ve agregasyon sorununun kriyoprotektan ilavesi olmadan giderilemediğini bildiren birçok çalışma mevcuttur [165–168].

Nanopartiküllerin liyofilizasyon esnasında kriyoprotektanlar sayesinde stabilizasyonuna dair teoriler şu şekildedir: Partiküllerle hidrojen bağları oluşturan ve partikülün çözeltideki stabilitesine katkıda bulunan su molekülleri, liyofilizasyon işlemiyle süblime edilir. Sıvı haldeyken suyla olan etkileşimlerin yerini, kuru haldeyken molekül içi hidrojen etkileşimleri, alır [169]. Partiküller yeniden sulandırıldığında, molekül içi bağlar, sadece kısmen kırılır. Böylece dispersiyondaki ortalama partikül boyutu artar [170]. Kriyoprotektan olarak şeker molekülleri eklendiğinde ise, molekül içi hidrojen etkileşimlerinin yerini şeker molekülleriyle olan etkileşimler alır ve partiküllerin agregasyonu önlenir. Partiküller yeniden sulandırıldığında, bu kez şeker ve nanopartiküller arası bağlar, su molekülleri tarafından tamamen kırılır. Böylece partikül, önceki şeklini ve boyutunu yeniden kazanır. Kriyoprotektanlar genel olarak, nanopartikülleri hareketsiz hale getirip agregasyonu önler. Nanopartikülleri, çeşitli mekanik streslerden (dondurma sırasında oluşan buz kristallerinden veya kurutma, rehidrasyon işlemlerinden kaynaklı) koruyan camsı bir matris oluşturabilir [171,172].

Tez çalışmasında geliştirilen kitozan nanopartiküllerin kriyoprotektan varlığında liyofilizasyon denemeleri ve liyofilizasyon işlem parametrelerinin optimizasyonu, tez kapsamına alınmamış, bu denemelerin tez sonrası çalışmalarla gerçekleştirilmesi planlanmıştır.

5.3. Boş Nanopartiküllerin Dispersiyon Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Kitozan/TPP kütle oranı, [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1] ve [5.5:1] olan formülasyonların öncelikle 5 saatlik dispersiyon stabiliteleri incelenmiştir (Tablo 4-6 ve Şekil 4-5). Kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1], [4.5:1] ve [5.0:1] olan dispersiyonların partikül boyutları 5 saat boyunca korunmuştur. Kitozan/TPP kütle oranı [5.5:1] olan dispersiyonda ise diğerlerinden farklı olarak partikül boyutunda, ilk 2 saat, saat başına yaklaşık 10’ar nm artış gözlenmiştir. 3 saatte yaklaşık 7 nm’lik bir düşüş görülse de, bu düşme trendi 4. ve 5. saatlerde devam etmemiştir. Sonuç olarak partiküller 5 saat sonunda ilk hallerinden yaklaşık 15 nm daha büyük hale gelmiştir. Ayrıca bu formülde başlangıçta ölçülen zeta

potansiyel, diğer ölçüm zamanlarına göre yarı yarıya düşüktür. Bunun nedeninin o anlık bir ölçüm hatasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Zira hem takip eden saatlerde hem de optimizasyon çalışmaları kapsamında üretilen diğer aynı oranlı formülasyonlarda zeta potansiyel değerleri birbirleriyle tutarlıdır.

Saatlik dispersiyon stabilitesi bulgularına göre 5 saat için, Kitozan/TPP kütle oranı [4.5:1], [4.5:1] ve [5.0:1] olan formülasyonların, kitozan/TPP kütle oranı [5.5:1] olan formülasyona kıyasla daha stabil olduğu söylenebilmektedir.

İlk etaptaki 5 saatlik incelemenin yanı sıra dispersiyon stabilitesi, daha uzun süreli olarak ve farklı sıcaklıklarda da incelenmiştir. Kitozan/TPP kütle oranı, [4.0:1], [4.5:1], [5.0:1], [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar için nanopartikül dispersiyonlarının stabilitesi, $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ olmak üzere 3 farklı sıcaklıkta, haftalık olarak takip edilmiştir (Tablo 4-7, Tablo 4-8 ve Tablo 4-9). En uygun saklama koşulunun $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ olduğu görülmüştür.

$5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ saklama koşulunda 2 haftalık veriler incelendiğinde (Tablo 4-7 ve Şekil 4-6), kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1] olan formülasyonda ilk haftadaki artış daha fazla olmak üzere toplamda yaklaşık 15 nm'lik bir artış olmuştur. Kitozan/TPP kütle oranı [4.5:1] olan formülasyonda ise ilk hafta yaklaşık 10 nm'lik bir artış olmuş, 2. hafta ise bir artış olmamıştır. Kitozan/TPP kütle oranı [5.0:1] olan formülasyonda hafta başına yaklaşık 10'ar nm olmak üzere 2 haftada toplam 20 nm'lik bir artış olmuştur. Kitozan/TPP kütle oranı [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlarda, 2 hafta boyunca partikül boyutu korunmuştur. Özetle, $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 2 hafta bekletilen numunelerin, tüm kitozan/TPP kütle oranları için, bazılarında bir miktar artış olsa da, ilk zaman noktasındakine yakın partikül boyutlarına sahip olduğu görülmüştür. PDI değerleri ve zeta potansiyellerinin ise, tüm kitozan/TPP kütle oranları için 2 hafta boyunca korunduğu söylenebilir. Görünüşlerinde de 3 hafta boyunca belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4-7, Şekil 4-8, Şekil 4-9). Bununla birlikte kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1] olan formülasyonun görünüşü diğerlerine göre daha az opalesan niteliktedir. Sonuç olarak, $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ saklama koşulu için ilk ve son noktadaki değerler incelendiğinde kitozan/TPP kütle oranı [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonların en stabil formülasyonlar olduğu görülmüştür.

$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ saklama koşulunda 1 haftalık veriler incelendiğinde (Tablo 4-8 ve Şekil 4-10), kitozan/TPP kütle oranları [4.0:1] ve [4.5:1] olan formülasyonların partikül

boyutları yaklaşık olarak 150'şer nm artarak, ilk zaman noktasına göre neredeyse 2 katına çıkmıştır. PDI değerlerinde de 2 kattan fazla artış olmuştur. Zeta potansiyelleri ve homojen görüntüleri (Şekil 4-11) ise korunmuştur. Kitozan/TPP kütle oranı [5.0:1] olan formülasyonda, 1 hafta sonundaki partikül boyutu artışı ise sadece 14 nm olup, PDI ve zeta potansiyel değerleri, homojen görüntüsü korunmuştur (Şekil 4-11). Kitozan/TPP kütle oranları [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlarda ise, pipetajla kolayca dağılan agregasyonlar gözlenmiştir (Şekil 4-11). Bu agregasyonların, sadece kitozan içeren çözeltisinin oda koşullarında bekletilmesiyle oluşan agregasyonlara (görsel sunulmadı) benzediği gözlenmiştir. Ayrıca bu gözlemler paralel olarak, kitozan/TPP kütle oranları [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar, diğerlerine nispeten daha büyük kitozan/TPP kütle oranlarına sahip olduğundan bu formülasyonlarda görülen agregasyonun, ortamdaki kitozanla etkileşime girecek yeterli TPP olmamasına bağlı olarak, serbest halde kalan kitozan moleküllerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Yani 1 hafta sonunda gözlenen agregasyonun, kitozan-TPP nanopartiküllerinden değil de, serbest kitozandan kaynaklı olduğu öngörülmüştür. [6.0:1] oranında görülen agregasyonun, [5.5:1]'de görüldenden daha fazla olması da, bu öngörüğü doğrular niteliktedir (Şekil 4-11). Ölçümler, agregasyon yapıları pipetajla dağıtıldıktan sonra alındığı için, ilk zaman noktasındaki göre partikül boyutu artışı, sadece 5-10 nm fazla bulunmuştur. Zeta potansiyellerinde ise, agregasyondan kaynaklandığı düşünülen 4-8 mV'luk bir düşüş saptanmıştır. $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ saklama koşulu için en stabil formülün (ilk hafta için) kitozan/TPP kütle oranı [5.0:1] olan formülasyon olduğu görülmüştür.

$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ saklama koşulunda 2. haftadan itibaren ise, tüm kitozan/TPP kütle oranları için kolayca dağılmayan daha farklı karakterde agregasyonlar gözlenmiş (Şekil 4-12, Şekil 4-13, Şekil 4-14) ve ölçüm alınamamıştır. Bu agregasyonların bu kez, daha farklı görünüme sahip olmaları dolayısıyla, serbest kitozandan değil de, kitozan-TPP nanopartiküllerinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ saklama koşulunda 2 haftalık veriler incelendiğinde (Tablo 4-9 ve Şekil 4-15), kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1] olan formülasyonda ilk hafta yaklaşık 445 nm'lik, 2. hafta ise buna ilaveten yaklaşık 650 nm'lik bir artış olmuş, böylece partikül boyutu, ilk zaman noktasındaki 8 katına çıkmıştır. PDI değeri, 2 haftada 2 katına çıkmış, zeta potansiyel değeri ise korunmuştur. Kitozan/TPP kütle oranı [4.5:1] olan formülde ise ilk hafta yaklaşık 170 nm'lik, 2. hafta ise buna ilaveten yaklaşık 75 nm'lik

bir artış olmuş, böylece partikül boyutu, ilk zaman noktasındakinin 2,5 katına çıkmıştır. PDI değeri, 2 haftada 2 katına çıkmış, zeta potansiyelde ise yaklaşık 5 mV'luk bir azalma gözlenmiştir. Kitozan/TPP kütle oranı [5.0:1] olan formülasyonda, 1. hafta sadece 10 nm'lik, 2. hafta ise yaklaşık 130 nm'lik artış olmuş, böylece partikül boyutu, ilk zaman noktasındakinin 1,7 katına çıkmıştır. PDI değeri, 2 haftada yaklaşık 1,5 katına çıkmıştır. Zeta potansiyel korunmuştur. Kitozan/TPP kütle oranı [5.5:1] olan formülasyonda 1. hafta 10 nm'lik artış olmuş, 2. hafta ise partikül boyutu korunmuştur. PDI ve zeta potansiyel değerleri ise 2 hafta boyunca korunmuştur. Kitozan/TPP kütle oranı [6.0:1] olan formülasyonda ise partikül boyutunun 2. hafta boyunca korunduğu söylenebilir. PDI değerleri ve zeta potansiyel de 2 hafta boyunca korunmuştur. $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan numunelerin görünüşleri 4 haftalık süre boyunca haftalık olarak incelendiğinde, kitozan/TPP kütle oranı [4.0:1] ve [4.5:1] olan formülasyonlarda partikül çökmeleri gözlenmiştir (Şekil 4-16, Şekil 4-17, Şekil 4-18, Şekil 4-19). Nitekim en fazla partikül boyutu artışları da bu kitozan/TPP kütle oranına sahip formülasyonlarda görülmüştür. $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ saklama koşulu için en stabil formülasyonların Kitozan/TPP kütle oranı [5.5:1] ve [6.0:1] olan formülasyonlar olduğu görülmüştür.

Tang vd. [163], hazırladıkları kitozan-TPP nanopartikül dispersiyonlarını 3 hafta ortam koşullarında sakladıklarında, başlangıçta yarı saydam görünüşlü olan dispersiyonun, bulanık bir sıvıya dönüştüğünü gözlemlemişlerdir. TEM mikrografları, bulanıklığı, partikül boyutundaki büyümeyle ilişkilendirmiştir. Boyuttaki büyümenin, muhtemelen TPP'nin varlığından dolayı ozmoz yoluyla nanopartiküllere su girişi olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Bu durum, nanopartikülün genişlemesine ve polimer matrisinin parçalanmasına neden olmuştur [163]. Tez çalışmasında da $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ saklama koşulunda, benzer sonuçlar elde edildiğinden bu durumun aynı mekanizma üzerinden gerçekleştiği düşünülmüştür.

López-León vd. [173], hazırladıkları kitozan-TPP nanopartikülleri -10°C , 5°C ve oda sıcaklığında ($\sim 22^{\circ}\text{C}$) 1 ay boyunca bekletmiştir. -10°C 'de bekletme, donma ve erime basamakları sebebiyle sistemi tamamen kararsız hale getirmiş ve bu numuneyle çalışmaya devam edilmemiştir. Diğer iki sıcaklık için ise, buzdolabında (5°C) saklanan numunenin oda sıcaklığındaki numuneden daha stabil olduğu görülmüştür [173]. Tez çalışmasında da $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ koşulunda saklanan nanopartiküller, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ koşulunda saklananlardan, daha stabil bulunduğundan, literatür çalışmasıyla bu yönden uyum söz

konusudur. López-León vd. [173]'nin yaptıkları bu çalışmada zamana karşı elektroforetik hareketlilik de ölçülmüştür. Buna göre, kararlı bir elektriksel çift tabaka oluşumunun hemen meydana gelmediği, bir dinlenme zamanının mevcut olduğu görülmüştür. Bu dinlenme zamanı, elektrolit iyonlarının partikül çekirdeğine doğru nüfuz etmesi için geçen süreye karşılık gelmektedir ve bu çalışmada zamanla artarak 25 dakikada stabil değerlere ulaşılmıştır. Bu nedenle kitozan partikül çözeltisinin elektroforetik hareketlilik ölçümlerine başlanmadan önce her zaman 30 dakika beklenmiştir [173]. Tez çalışmasında da nanopartikül dispersiyonları hazırlandıktan sonra, ölçümler alınmadan 30 dakika beklenmiştir.

Dispersiyon stabilitesi çalışmalarından çıkarılan sonuçlar şu şekildedir: **i.** Literatürle uyumlu olarak kitozan-TPP nanopartikül dispersiyonları için en uygun saklama koşulu $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'dir ve bu koşullarda dispersiyonlar en az 2 hafta boyunca stabildir. **ii.** $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ koşullarından çıkarılan sonuçla, en verimli kitozan-TPP birleşimi (bu tez çalışmasında kullanılan kitozan ile), [5.0:1] kitozan/TPP kütle oranında gerçekleşmektedir. **iii.** Kitozan-TPP nanopartiküllerin saklama süresinin arttırılması için, liyoprotektanlar varlığında optimize edilmiş bir liyofilizasyon işlemi gereklidir.

5.4. Boş Nanopartikül ve Kitozan HCl Hammadesinin FT-IR Spektrumlarının Değerlendirilmesi

FT-IR spektrum analizi temel olarak, numunenin fonksiyonel grubuyla ilişkili fonksiyonel özellikleri ve yapısı hakkında bilgi sağlar. Bundan yararlanarak kitozan ve TPP arasındaki iyonik bağı doğrulamak için FT-IR ölçümleri yapılmıştır. Kitozan HCl hammaddesi ve hazırlanan boş nanopartikül numunesine ait bantlar kıyaslanmış, bant farklılıkları nanopartikül oluşumu açısından yorumlanmıştır (Şekil 4-20 ve Tablo 4-10).

$-\text{NH}_2$ ve $-\text{OH}$ gruplarına atfedilen ve Kitozan HCl hammaddesinde $3342,98\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen absorpsiyon bandı, boş nanopartiküllerde daha düşük dalga boyuna ($3265,54\text{ cm}^{-1}$) kaymış ve aynı zamanda daha keskin hale gelmiştir. Bu farklılık boş nanopartikül örneğinde kitozan ve TPP maddeleri arasındaki çapraz bağlanmanın gerçekleştiğini ve fosfat gruplarına bağlı olarak hidrojen bağlarının arttığını göstermektedir [174,175].

Kitozan HCl hammaddesinde $1624,17\text{ cm}^{-1}$ ve $1519,58\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen karakteristik bantlar sırasıyla CONH_2 ve NH_2 gruplarına atfedilir. Kitozanın amino

(NH₃⁺) grupları ve TPP'nin fosfat (PO₄³⁻) grupları arasındaki etkileşim nedeniyle bu bantlar, boş nanopartikülde 1631,02 cm⁻¹ ve 1529,07 cm⁻¹'ye kaymıştır. Nanopartiküldeki bu bant yoğunluklarının, hammaddede karşılık gelen bant yoğunluklarına göre önemli ölçüde azalmış olması, kitozan ve TPP arasındaki etkileşimin varlığını desteklemektedir [175,176].

Boş nanopartikülün spektrumunda 1031,62 cm⁻¹'de görünen bant, fosfat gruplarından kaynaklı karakteristik P=O gerilmesini ifade etmektedir [176]. Elde edilen spektrumların literatürdekilerle uyumlu olduğu görülmüştür.

Ayrıca hammadde spektrumunda 1519,58 cm⁻¹'de gözlenen bandın, 1624,17 cm⁻¹'de gözlenen banttı daha keskin olması, kitozanın yüksek derecede deasetilasyonunu ifade etmektedir [175]. Kullanılan kitozan hammaddesinin analiz sertifikasında deasetilasyon derecesinin %80-95 olduğu göz önüne alındığında, FT-IR spektrumunun bu noktada da uyumlu olduğu söylenebilir.

5.5. Boş Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskopi Analizinin Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin oluştuğunu görsel olarak doğrulayabilmek, görünüşü hakkında bilgi sahibi olmak ve partikül boyutlarını, DLS yöntemiyle elde edilen partikül boyutu verileriyle kıyaslayabilmek için hazırlanan boş nanopartiküllerin SEM görüntüleri incelenmiştir. Daha önce bildirilen bazı çalışmalardan [123,177] farklı olarak, nanometrik ölçekte küresel yapıların yerine polihedronların (çok yüzlü geometrik şekillerin) oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4-21). Gan vd. [158]'nin yaptığı nanopartikül çalışmasında da aynı şekilde polihedron yapıları görülmüştür. Bu durum, partikül oluşumu ve büyümesi sırasında yarı kristalleşme mekanizmasının bir göstergesidir. Düzenli şekilli polihedronların oluşumu, düzenli moleküler diziliş sayesinde kompakt bir yapıya sahip nanopartiküllerin oluştuğuna işaret etmektedir [158].

Bu tez kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin genel olarak tekli yapılar halinde gözlenebilmesi, taze hazırlanan dispersiyonda agregasyonun düşük olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte özellikle Şekil 4-23 ve 4-24'de az sayıda da olsa gözlenen, ve birkaç tane tekli yapının bir araya gelmesiyle oluşan çubuksu yapılar nedeniyle, agregasyonun hiç görülmediği de söylenememektedir.

Nanopartiküllere ait SEM analizinde 120 nm, 150 nm, 170 nm civarlarında partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin olduğu (Şekil 4-24) ve bu değerlerin DLS yöntemi ile elde edilen ortalama partikül boyutu değerlerine (Tablo 4-2) yakın olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, SEM analizi sonucunda elde edilen boyut değerleri, DLS analizi sonucuna göre bir miktar daha küçüktür. Bu durumun SEM analizinde, DLS yönteminden farklı olarak, numune hazırlamada nanopartiküllerin kurutulması sonucu suyunu kaybetmesi ve dolayısıyla hacimce küçülmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Genel anlamda, iki yöntem verilerinin birbirini doğruladığı sonucuna varılmıştır.

5.6. Saflaştırma Öncesi ve Sonrasında Boş Nanopartiküllerin Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerin saflaştırılması için öncelikle santrifüj işlemi denenmiş, ancak bu yöntemden vazgeçilmiştir. Bunun nedeni, santrifüjle çöktürülen nanopartikül pelletlerinin, ultrasonikasyon işlemine rağmen, kolayca dağıtılamamasıdır. İlk üretildikleri boyuttan yaklaşık 100 nm daha büyük partiküller olarak elde edilebilmişlerdir (Tablo 4-11). Bunun yanı sıra, ultrasonikasyon işleminden de, nanopartiküllerin yapısını bozabilme [163], oligonükleotit yapısını parçalayabilme [164] ihtimalleri sebebiyle, uzak durulmak istenmiştir. Bu nedenlerle nanopartikülleri saflaştırmak için, santrifügal filtrasyon yapmayı sağlayan Vivaspin®2 tüplerinden faydalanılmıştır. Bu şekilde, nanopartiküller çöküp pellet oluşturmadığından yeniden dağıtma basamağı da söz konusu olmamıştır. Tüp membranının üstünde konsantrte halde saf nanopartikül dispersiyonu elde edilmiş, kirlilikler filtrat kısmıyla uzaklaştırılmıştır. Elde edilen saf konsantrat ilk hacmine seyreltilmiştir. Saflaştırma öncesi dispersiyonda, saflaştırma sonrası konsantratta ve ilk hacmine seyreltilmiş konsantratta birbirine oldukça yakın partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri (Tablo 4-12) elde edildiğinden bu yöntemin uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.7. GapmeR İçeren Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Optimizasyon ve dispersiyon stabilite çalışmaları sonucunda nihai nanopartikül formülasyonunun, pH'sı 4.0 olan kitozan çözeltisiyle, kitozan/TPP kütle oranı [5.0:1] olacak şekilde ve 600 rpm karıştırma hızıyla hazırlanan formülasyon olmasına karar

verilmiştir. Bu nedenle GapmeR moleküllerini içeren formülasyonlar, bu parametrelerle Bölüm 3.14'te belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Boş nanopartiküllere göre ($164,90 \pm 2,51$ nm), GapmeR içeren nanopartiküllerin boyutlarında ($149,00 \pm 0,36$ nm ile $154,20 \pm 2,61$ nm arası), yaklaşık 10-15 nm'lik bir azalma olmuştur (Tablo 4-13). Boş nanopartiküllere kıyasla biraz daha küçük boyut elde edilmesinin, GapmeR moleküllerinin negatif yüklü olmasından dolayı pozitif yüklü kitozanla bir araya geldiklerinde, daha fazla elektrostatik etkileşimin oluşması sonucu daha kompakt yapıların meydana gelmiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. siRNA oligonükleotitleri ve kitozan-TPP nanopartikülleriyle yapılan literatür çalışmalarında da tez çalışmasındaki gibi, oligonükleotit içeren nanopartiküllerin boyutlarının, boş nanopartiküllere göre bir miktar daha küçük olduğu rapor edilmiştir [130,133].

Tez çalışmasında GapmeR içeren nanopartiküllerin zeta potansiyellerinde ($+31,90 \pm 0,72$ mV ile $+35,20 \pm 0,27$ mV arası), boş nanopartiküllere ($+39,60 \pm 0,81$ mV) göre 5-10 mV'lik bir düşüş görülmüştür (Tablo 4-13). Bu durum, ortama negatif yüklü GapmeR moleküllerinin girmesiyle kitozandan kaynaklı artık pozitif yükün azalmasına bağlı olarak beklenen bir sonuçtur. Literatürde, kitozan-TPP nanopartiküllere siRNA eklendikten sonra zeta potansiyelde görülen azalmanın, siRNA'nın nanopartiküller ile başarılı olarak birleştiğine işaret ettiği bildirilmiştir. siRNA'da var olan fosfat grupları, kitozandaki $-NH_3^+$ gruplarını nötralize etmiş ve böylece katyonik kitozanın pozitif yükleri azalmıştır [133]. Tez çalışmasında da aynı şekilde GapmeR oligonükleotitlerindeki fosfat gruplarından ötürü aynı mekanizmanın söz konusu olduğu düşünülmüştür.

5.8. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Oranının Değerlendirilmesi

Gerçekleştirilen ekspresyon çalışmaları sonucunda seçilen GapmeR standardını (GapmeR ST-2) içeren nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği saptanmıştır. Kullanılan miktar tayini kiti aracılığıyla, santrifügal filtrasyon sonrasında filtrattaki serbest oligonükleotitlerin miktarı fluorometrik olarak tayin edilmiştir. Kit içindeki fluorometrik boyanın oligonükleotit yapısına bağlanması sayesinde, çok düşük miktarlardaki serbest oligonükleotitler dahi tespit edilebilir durumdadır.

Bir biyofarmasötigin kitozan nanopartiküllerine enkapsülleme etkinliği, kitozanın moleküler ağırlığı, biyofarmasötigin yapısı, karıştırma hızı, formülasyon bileşimi, TPP konsantrasyonu ve hacim oranı, kullanılan kitozan türü dahil olmak üzere pek çok

parametreye bağlıdır [178]. Bu tez çalışmasında nanopartikül hazırlığı için kullanılan maddeler ve yöntemle, GapmeR oligonükleotitlerinin çapraz bağlı kitozan nanopartiküllerine enkapsülasyonu neredeyse tamamen (99.42 ± 1.10) sağlanmıştır.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, siRNA'nın kitozan-TPP nanopartiküllere enkapsüle edildiği formülasyonlarda da tez çalışmasında olduğu gibi enkapsülasyon etkinliği %100'e yakın bulunmuştur [130,133,178]. Farklı bir yöntem olarak, siRNA'nın daha öncesinde oluşturulmuş nanopartiküller üzerine adsorbe ettirilmesiyle hazırlanan formülasyonlarda daha düşük enkapsülasyon etkinliği (%59 - %90 arası) rapor edilmiştir [130]. Ayrıca kullanılan kitozan çözeltisinin konsantrasyonu arttığında, enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı bildirmiştir. Bu durumun, daha yüksek kitozan konsantrasyonuna sahip çözeltilerin, siRNA'nın kitozan zinciri etrafındaki hareketini engelleyen ve bu şekilde enkapsülasyon verimini düşüren daha viskoz niteliğinden kaynaklandığı ifade edilmiştir [133].

Nanopartikül dispersiyonu 800 pmol/ml (0,0043 mg/ml) GapmeR içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu oligonükleotit miktarı, kitozan (0,83 mg/ml) ve TPP (0,17 mg/ml) miktarlarına kıyasla çok az olduğundan yükleme oranı % 0,43 olarak bulunmuştur.

5.9. Agaroz Jel Elektroforezi Çalışmasının Değerlendirilmesi

Kitozan nanopartiküller ile GapmeR oligonükleotitlerinin afinitesi hakkında bilgi sahibi olmak adına jel elektroforez çalışması yürütülmüştür. Oligonükleotit, jelde uygulandığı kuyucukta kalıyorsa, yani jelde yol kat etmiyorsa, nanopartikül ile oligonükleotidin etkileştiği, nanopartiküllerden ayrılarak yol kat ediyor ise nanopartikül ile etkileşiminin zayıf olduğu yorumu yapılmaktadır [130].

Jel elektroforez görüntülerine göre (Şekil 4-26), GapmeR oligonükleotitleri, kitozan nanopartiküllerle enkapsüle olarak uygulandığı kuyucukta büyük oranda hareketsiz olarak kalmıştır. Nanopartiküller için kullanılan miktar ile aynı miktarda uygulanan serbest GapmeR oligonükleotitlerinin ise jelde ilerlediği ve oldukça parlak bir bant verdiği görülmüştür. Nanopartikül numunesinde, nanopartiküle bağlı olmayan oligonükleotitler sebebiyle görülen soluk bant izi, GapmeR oligonükleotitlerinin kitozan nanopartiküllerine yüksek derecede bağlandığını göstermektedir.

Literatürde yer alan kitozan-TPP nanopartikül ve siRNA oligonükleotitleriyle yapılan çalışmalarda, kitozan/siRNA oranının önemli olduğu, bu oran büyüdükçe siRNA ve nanopartiküller arasında daha güçlü etkileşimin meydana geldiği bildirilmiştir [130,178,179].

5.10. Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen sitotoksosite, konfokal mikroskopi ve ekspresyon çalışmalarının değerlendirilmesi aşağıda alt başlıklar halinde verilmiştir.

5.10.1. Sitotoksosite Çalışmasının Değerlendirilmesi

Akciğer kanseri hücrelerinde lncRNA-UCA1'in susturulmasının hücre çoğalmasını engellediği bildirilmiştir [11–14]. Bunun ardındaki mekanizma olarak ise, lncRNA-UCA1'in susturulması aracılığıyla apoptozisin tetiklendiği ortaya koyulmuştur [13,14]. Bu tez çalışmasında da amaçlanan, lncRNA-UCA1'in susturulmasını sağlayacak GapmeR oligonükleotitlerinin, geliştirilen nanopartikül sistemi vasıtasıyla hücrelere transfer edilmesidir. Bu yolla kanser hücrelerinin çoğalmasının engellenmesi ve ölüme gitmesi hedeflenmiştir. Bu etkinin taşıyıcı sistemin toksik etkisinden ayırt edilebilmesi ve taşıyıcı sistemin genel olarak hücrelere zarar vermemesi adına, taşıyıcı sistem kaynaklı toksisitenin düşük olması gerekmektedir. Bu nedenle gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmasında öncelikle geliştirilen taşıyıcı sistemin sitotoksitesinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bunun için hücrelere boş nanopartiküller uygulanmış ve bu hücrelerin canlılığındaki azalmalar, negatif kontrole göre kıyaslanmıştır. Negatif kontrol olarak, sadece tam kültür ortamı uygulanan ve canlılığı % 100 kabul edilen hücreler kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak ise SDS çözeltisi uygulanan hücreler kullanılmış ve deney sonunda bu kuyucuklarda yaşayan hücre kalmamıştır.

Boş nanopartiküller hücrelere, tam kültür ortamıyla 4, 16 ve 64 kez seyreltildikten sonra uygulanmıştır. 1/4 seyreltme oranında elde edilen hücre canlılığı değeri $64,61 \pm 0,02$ olup, negatif kontrolden anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$) bulunmuştur. 1/16 ve 1/64 seyreltme oranlarında elde edilen hücre canlılığı değerleri ise sırasıyla $99,47 \pm 0,03$ ve $91,76 \pm 0,07$ olup negatif kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p >$

0,05). Dolayısıyla bu nanopartikül sistemiyle çalışırken, 1/4 seyreltme oranının seçilmemesi, taşıyıcı sistemden kaynaklanan bir toksisitenin önüne geçilmesi açısından önem arz etmektedir. 16 kat ve daha ileri seyreltme oranları ise, bu oranlarda boş nanopartiküller, taşıyıcı sistem olarak toksisite göstermediğinden, uygun olacaktır.

Sitotoksosite çalışması kapsamında, sadece boş nanopartiküllerin değil, aynı zamanda kitozan çözeltisinin de sitotoksitesi incelenmiş, böylece kitozanın çözelti veya nanopartikül halinde verilmesinin sitotoksosite açısından bir fark yaratıp yaratmadığı ortaya koyulmuştur. Kitozan çözeltisi de, boş nanopartiküllerde olduğu gibi tam kültür ortamıyla 4, 16 ve 64 kat seyreltikten sonra hücrelere uygulanmıştır. Bu oranlar için elde edilen hücre canlılığı değerleri sırasıyla $56,50 \pm 0,07$, $94,69 \pm 0,06$ ve $94,11 \pm 0,02$ olarak bulunmuştur. Her bir seyreltme oranı için, kitozan çözeltisi ve boş nanopartiküller için elde edilen canlılık değerleri, birbirleriyle kıyaslandığında arada anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Buradan, kitozanın çözelti veya nanopartikül halinde verilmesinin Calu-3 hücre sitotoksitesi açısından bir fark yaratmadığı sonucu çıkarılmıştır. Florea vd [180]'nin Calu-3 hücre hattında $1,5$ (a/h)'lik kitozan çözeltisi ile yaptıkları sitotoksosite çalışmasında, 3 saat maruziyet sonrasında kitozanın hücre canlılığını yaklaşık olarak % 30 azalttığı bildirilmiştir. Tez çalışmasında çok daha düşük kitozan konsantrasyonları söz konusu olduğundan, daha yüksek canlılık değerleri beklenen bir sonuçtur.

GapmeR ST-2 içeren nanopartiküller de, boş nanopartiküllerde olduğu gibi, tam kültür ortamıyla 4, 16 ve 64 kat seyreltikten sonra hücrelere uygulanmıştır. Bunlara ait elde edilen hücre canlılık değerleri sırasıyla $58,87 \pm 0,04$, $89,10 \pm 0,06$ ve $92,98 \pm 0,05$ olarak bulunmuştur. Bu değerlerin, aynı seyreltme oranındaki boş nanopartiküllere ait değerlerden anlamlı olarak farklı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Yani hücrelere, nanopartiküllere enkapsüle edilmiş GapmeR ST-2 uygulanması, hücrelerde istenen sitotoksik etkiyi sağlayamamıştır. Bu durumun, sitotoksosite testinde maruziyet süresinin 2 saat ile sınırlı tutulmuş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Diğer yandan, hücrelere 50 nM konsantrasyonundaki serbest GapmeR ST-2 oligonükleoti uygulandığında, hücre canlılık değeri $72,56 \pm 0,11$ olarak bulunmuştur. Bu numuneyle aynı konsantrasyonda GapmeR ST-2 içeren nanopartikül numunesi, seyreltme oranı 1/16 olan numune olup, elde edilen hücre canlılık değeri $89,10 \pm 0,06$ 'dır. Bu iki veri göz önüne alındığında, aslında GapmeR ST-2 oligonükleotidinin

serbest haldeyken, sitotoksik etki sağlayabildiği sonucu çıkmaktadır. Zira, serbest GapmeR ST-2 oligonükleotitleriyle elde edilen hücre canlılığı, GapmeR ST-2 içeren nanopartiküllerle elde edilenden anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Bu durumun, sitotoksikite testinde maruziyet süresinin 2 saat ile sınırlı tutulmuş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. 2 saatlik bir süre, nanopartiküllere enkapsüle olmuş GapmeR ST-2 moleküllerinin etkinliğini göstermesi için yeterli gelmemiş olabilir. Diğer yandan serbest oligonükleotitler ise 2 saat içinde istenen etkiyi göstermeye başlayarak, uygulandıkları hücrelerin canlılık değerlerini düşürmüşlerdir.

Kitozan çözeltisi, boş nanopartiküller ve GapmeR ST-2 içeren nanopartiküllerin, kendi içlerinde seyreltme oranlarının (1/4, 1/16 ve 1/64) birbirleriyle kıyası da yapılmıştır. Buna göre, 1/4 seyreltme oranındaki hücre canlılıklarının, 1/16 ile 1/64'tekilere göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Ayrıca, 1/16 ve 1/64 seyreltme oranlarının hücre canlılık değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$).

5.10.2. Konfokal Mikroskopi Çalışmasının Değerlendirilmesi

GapmeR oligonükleotitlerinin hücre içine alımını gözlemleyebilmek için konfokal mikroskopi çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda alınan görüntüler, Şekil 28 ile Şekil 32 arasında verilmiştir.

DAPI boyası, DNA'ya bağlanabildiğinden hücre çekirdekleri bu boyayla maviye boyanarak görünür hale gelmektedir [181]. Şekillerdeki A görüntüleri, DAPI boyasının görüntülenebildiği dalga boyunda alınmıştır ve beklenildiği gibi maviye boyanmış olan hücre çekirdekleri gözlenmiştir. Şekillerdeki B görüntüleri ise, FAM etiketinin görüntülenebildiği dalga boyunda alınmıştır. Dolayısıyla B görüntülerinde FAM-etiketli olan GapmeR-NK oligonükleotidi içeren uygulamaların yapıldığı numunelerde yeşil alanlar görülmesi beklenirken, bu oligonükleotidi içermeyen numunelerin uygulandığı hücrelerde ise karanlık bir alan beklenmektedir. Tam kültür ortamının (Şekil 4-28) ve boş nanopartiküllerin uygulandığı (Şekil 4-30) numunelere ait B görüntülerinde, numunelerin oligonükleotit içermemesi sebebiyle, yeşil renk gözlenmemiştir. GapmeR-NK oligonükleotitleri (Şekil 4-29) ve GapmeR-NK nanopartiküllerinin (Şekil 4-31) uygulandığı numunelere ait B görüntülerinde ise oligonükleotitlerin FAM-etiketinden kaynaklanan yeşil renk gözlenmiştir. Bu iki numunenin A ve B görüntülerinin

çakıştırılmasıyla elde edilen C görüntüleri incelendiğinde, oligonükleotitlerin hücre çekirdeklerinin etrafında toplandıkları, yani hücre içine alımın gerçekleştiği görülmektedir.

5.10.3. Ekspresyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Belirlenen süreler boyunca yapılan uygulamaların ardından, Bölüm 3.17.3.5'te belirtildiği şekilde hücrelerden toplam RNA izolasyonu sağlanmış ve elde edilen RNA numunelerinin kantitasyonu Bölüm 3.17.3.6'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Kantitasyon sonucunda A260/A280 oranları incelendiğinde (Tablo 4-16, Tablo 4-19, Tablo 4-21, Tablo 4-23, Tablo 4-24 ve Tablo 4-25), bu oranların dört ekspresyon çalışması için de, 1.9-2.1 aralığına yakın olduğu görülmüştür. Bu durum, RNA'nın saf olarak izole edilebildiğini göstermiştir [144]. Her numune için alınan 500 ng RNA'dan Bölüm 3.17.3.7'de belirtildiği şekilde ters transkripsiyonla cDNA'lar oluşturulmuş ve lncRNA-UCA1 seviyesinin belirlenmesi için Bölüm 3.17.3.8'de belirtildiği şekilde qPCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen dört farklı ekspresyon çalışmasına bulguların değerlendirilmesi aşağıda alt başlıklar halinde sunulmuştur.

5.10.3.1. Hücre Hattı Seçim Çalışmasının Değerlendirilmesi

Ekspresyon deneylerinin ilki, hücre hattı seçimi için gerçekleştirilmiştir. Akciğer kanseri hücre hatlarından, olan Calu-3 (insan bronş epitel hücresi) ve A549 (insan alveol epitel hücresi) hücre hatlarında, bu tez çalışmasında baskılanması hedeflenen lncRNA-UCA1'in ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışma sonunda Calu-3 hücre hattındaki ekspresyon seviyesinin, A549 hücre hattındakinden anlamlı derece ($p < 0,05$) yüksek olduğu görülmüştür. Bu sebeple, hücre kültürü deneyleri ve diğer ekspresyon çalışmalarına Calu-3 hücre hattı ile devam edilmiştir

Diğer yandan Calu-3 ve A549 hücre hatlarına boş nanopartiküller uygulanmış ve boş nanopartiküllerin lncRNA-UCA1 seviyesine etki edip etmediği incelenmiştir. Bu noktada beklenen sonuç, boş nanopartiküllerin lncRNA-UCA1 seviyesinde bir değişikliğe yol açmamasıdır. Aksi taktirde, antisens oligonükleotitler çalışmaya dahil edildiğinde, hedef RNA molekülünün seviyesinde meydana gelecek değişikliğin, antisens

oligonükleotitlerden mi yoksa nanopartikül yapısının kendisinden mi kaynaklandığı çok net anlaşılamayacaktır. Çalışma sonucunda boş nanopartikül uygulamasının her iki hücre hattında da, lncRNA-UCA1 seviyesinde anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Bu anlamda bu çalışma, antisens oligonükleotit uygulamalarının yapıldığı numunelerde, meydana gelen lncRNA-UCA1 seviyesi değişikliğinin antisens molekülünden kaynaklandığını doğrulayacak nitelikte olacaktır.

Bununla birlikte, istatistiksel olarak anlamsız olsa da, boş nanopartikül uygulaması lncRNA-UCA1 seviyesinde Calu-3 hücre hattında bir miktar artışa, A549 hücre hattında ise bir miktar azalışa sebep olmuştur. Yani taşıyıcı sistemin kendisi de lncRNA-UCA1 seviyesini bir dereceye kadar etkilemiş görünmektedir. Literatürde yapılan bazı çalışmalarda, tez çalışmasındaki kitozan nanopartiküllerde olduğu gibi, katyonik ve polimer yapıda olan dendrimerik taşıyıcı sistemlerin, transfeksiyon ajanı olma niteliklerinden ayrı olarak, birçok endojen genin ekspresyonunu değiştirebilecekleri gösterilmiştir. Bu nedenle, taşıyıcı sistemde kullanılan polimerin neden olduğu gen değişikliklerinin etkisi ve sonuçları üzerine yapılacak bir çalışmanın faydalı olacağı bildirilmiştir [182].

5.10.3.2. Transfeksiyon Ajanı Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışmasının Değerlendirilmesi

lncRNA-UCA1 seviyesinin baskılanması amacıyla, GapmeR standartları (ST-1, ST-2, ST-3) ve GapmeR negatif kontrol (NK) oligonükleotitleri, Lipofectamine® RNAiMAX transfeksiyon ajanıyla beraber hücrelere uygulanmıştır. Bu şekilde en çok baskılamayı sağlayan GapmeR standardının hangi standart olduğuna dair bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda elde edilen sonuçların, nanopartiküllerle gerçekleştirilecek transfeksiyon sonuçlarıyla da karşılaştırılması, böylece geliştirilen nanopartiküllerin transfeksiyon etkinliği açısından, ticari bir transfeksiyon ajanıyla kıyaslanması planlanmıştır. Fakat beklenilenin tam aksine, GapmeR uygulamaları sonrası, GAPDH'e göre normalize edilen lncRNA-UCA1 seviyesinde artış görülmüştür (Tablo 4-20 ve Şekil 4-34). Ham veriler incelendiğinde ise, aslında beklenildiği gibi lncRNA-UCA1 seviyesinin azaldığını ifade eden C_T değerlerinin arttığı, fakat GAPDH'e ait C_T değerleri de sabit kalmak yerine arttığından, bu durumun verilere lncRNA-UCA1 seviyesinde artış olarak yansıdığı görülmüştür. Halbuki, tez çalışmasında kullanılan GAPDH gibi bir

normalizasyon geninden beklenen, seviyesinin farklı uygulamalar arasında sabit kalmasıdır. Bunun üzerine, sıklıkla kullanılan başka bir kontrol geni olan Beta Aktin (ACTB) ile de normalizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. GAPDH kadar dalgalanma olmasa da, ACTB geninin de seviyesi sabit kalmamış, bu durum lncRNA-UCA1 seviyelerine, tekrardan artış olarak yansımıştır. Fakat yine ham verilerden C_T değerleri incelendiğinde lncRNA-UCA1'nin baskılandığı görülmektedir.

Normalizasyon genlerindeki bu dalgalanmaya transfeksiyon ajanının yol açmış olabileceği düşünülmüştür. Çünkü transfeksiyon ajanının aksine nanopartiküllerle gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmalarında böyle bir durum yaşanmamış, normalizasyon geni GAPDH'in seviyesi uygulamalar arasında sabit kalmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda da, gen ekspresyonu değişikliklerinin istemsiz bir şekilde, katyonik lipid yapısına sahip transfeksiyon ajanlarının (Lipofectin®, Oligofectamine®, Lipofectamine®2000) kendisi tarafından indüklenebileceği gösterilmiştir. Bu nedenle katyonik lipid yapısındaki transfeksiyon ajanlarının kullanıldığı deneylerde, istemsiz meydana gelebilecek gen ekspresyonu değişikliklerinin, gen tedavisi veya gen susturmada potansiyel olarak istenen genotip ve/veya fenotip uç noktalarını maskeleyebilecekleri veya bunlarla etkileşime girebilecekleri dikkate alınmalıdır [183,184]. Tez çalışmasında da transfeksiyon ajanı olarak, oldukça yaygın kullanılan katyonik lipid formülasyonlarından biri olan Lipofectamine® RNAiMAX kullanılmıştır. Dolayısıyla, transfeksiyon ajanının kullanıldığı deneylerde, GAPDH veya ACTB seviyesinde meydana gelen hedef dışı seviye değişikliğinin Lipofectamine® RNAiMAX'in kendisinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak normalize edilmiş verilere göre her ne kadar lncRNA-UCA1 seviyesinde artış olmuş gibi görünse de, ham verilere göre lncRNA-UCA1 seviyesinin azaldığını ifade eden C_T değerlerinin arttığı görülmüştür. GapmeR ST-1 ve GapmeR ST-2'nin, GapmeR ST-3'e göre lncRNA-UCA1 seviyesinde daha fazla düşüş sağladığı görülmüştür.

5.10.3.3. Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla Transfeksiyon Çalışmasının Değerlendirilmesi

Sitotoksikite çalışmasıyla, geliştirilen boş nanopartikül formülasyonunun 1/16 seyreltme oranından itibaren hücrelere toksik olmadığı, gösterilmiştir. Bu nedenle

ekspresiyon çalışmaları için, Bölüm 3.14'te belirtildiği şekilde hazırlanan GapmeR içeren nanopartiküller, tam kültür ortamıyla 16 kat seyreltikten sonra hücrelere uygulanmıştır. Nanopartikül formülasyonuna eklenecek GapmeR miktarları 16 kat seyreltme sonrası, 50 nM olacak şekilde ayarlanmıştır.

Elde edilen verilere göre (Tablo 4-22 ve Şekil 4-35), nanopartiküllerle verilen GapmeR ST-1 ve GapmeR ST-2 numunelerinin, lncRNA-UCA1 seviyesini kontrol grubuna (tam kültür ortamı) göre, anlamlı düzeyde baskıladığı görülmüştür ($p < 0,05$). Boş nanopartikül, GapmeR-NK nanopartikül ve GapmeR ST-3 nanopartikül numunelerinin, lncRNA-UCA1 seviyesinde meydana getirdiği azalmalar ise, kontrol grubuna (tam kültür ortamı) göre anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). GapmeR standartlarını içeren nanopartiküller kendi arasında karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Bununla birlikte lncRNA-UCA1 seviyesini en fazla baskılayan formülasyonun, GapmeR ST-2 içeren nanopartikül formülasyonu olduğu görülmüştür. Bu sebeple, GapmeR standartları arasından GapmeR ST-2'nin en uygun GapmeR olduğuna karar verilmiştir.

Yapılan literatür araştırmasına göre, kitozan-TPP nanopartiküller aracılı olarak ve antisens oligonükleotitler kullanılarak lncRNA-UCA1 seviyesinin baskılanması, ilk defa bu tez çalışmasıyla denenmiştir.

5.10.3.4. GapmeR ST-2'nin Geliştirilen Nanopartiküller Aracılığıyla 24 Saatlik, 48 Saatlik ve 72 Saatlik Transfeksiyon Çalışmasının Değerlendirilmesi

Geliştirilen nanopartiküller aracılığıyla gerçekleştirilen transfeksiyon çalışmasında, lncRNA-UCA1 seviyesi en fazla GapmeR ST-2 ile baskılandığından, bu GapmeR standardını içeren nanopartiküller aracılığıyla gerçekleştirilen transfeksiyon çalışması, 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere üç farklı süre için denenmiştir.

Formülasyon grupları her saat için ayrı ayrı kıyaslanmıştır.

24 saat verilerine göre, tüm uygulamalar lncRNA-UCA1 seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma meydana getirmiştir ($p < 0,05$). Halbuki, boş nanopartikül, GapmeR-NK nanopartikül ve GapmeR-NK oligonükleotit uygulamaları GapmeR standardı içermediklerinden, bunların kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş meydana getirmesi beklenmiyordu. Bu sonuç, GapmeR standartlarından bağımsız olarak,

boş nanopartiküllerin ve GapmeR-NK oligonükleotitlerinin de lncRNA-UCA1 seviyesinde değişikliğe sebep olduğunu göstermiştir. 24 saat için, uygulamaların birbirleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Yani GapmeR ST-2 uygulaması oligonükleotit olarak serbest halde veya nanopartiküllerle verildiğinde, lncRNA-UCA1 seviyesinin baskılanması için boş nanopartiküllere ve GapmeR-NK uygulamalarına göre anlamlı bir katkı sunmamıştır.

48 saatlik verilere bakıldığında, 24 saatlik verilerle paralel sonuçların elde edildiği, tüm uygulamaların kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturduğu ($p < 0,05$), fakat gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

72 saatlik veriler analiz edildiğinde ise, 24 ve 48 saatlik verilerden farklı olarak, GapmeR ST-2 nanopartikül uygulamasının, boş nanopartikül ve GapmeR-NK nanopartikül uygulamalarına göre lncRNA-UCA1 seviyesinde anlamlı bir düşüş sağladığı görülmüştür. Buradan çıkarılan sonuç, GapmeR ST-2 nanopartikül uygulamalarının etkisini anlamlı olarak gösterebilmesi için belli bir süreye ihtiyaç duyulduğudur. Bu süre gereksinimi, kitozan-TPP nanopartiküllere enkapsüle olan GapmeR ST-2 oligonükleotitlerinin, nanopartiküllerden ayrışabilmesi için belli bir zaman gerektirmesinden kaynaklı olabilir.

Sonuç olarak;

- Bu tez çalışmasında taşıyıcı sistem olarak iyonik jelasyon yöntemiyle oluşturulan kitozan-TPP nanopartiküller çalışılmıştır.
- Kitozan-TPP nanopartiküllerin oluşumunun kitozan/TPP kütle oranı, kitozan çözelti pH'sı ile kitozan ve TPP çözeltilerinin birleştirilmesi esnasındaki karıştırma hızından etkilendiği görülmüştür. Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında bu parametrelerde değişiklik yapılarak formülasyonun, partikül boyutu ve zeta potansiyeli açısından optimizasyonu sağlanmıştır.
- Geliştirilen kitozan-TPP nanopartiküllerin dispersiyon stabiliteleri farklı koşullarda incelenerek, en uygun saklama sıcaklığı belirlenmiştir.
- Elde edilen nanopartikül dispersiyonu kriyoprotektan olmadan liyofilize edildiğinde, yeniden sulandırma sonrasında ilk boyutlar elde edilememiştir. Bu

nanopartiküllerin uzun süreli saklanması için uygun bir kriyoprotektan varlığında, optimize edilmiş bir liyofilizasyon işlemine gerek duyulmaktadır.

- Literatürde kitozan-TPP nanopartiküllerin oligonükleotit taşıyıcı sistem olarak kullanılmalarına dair, başta siRNA'lar olmak üzere çeşitli antisens oligonükleotitlerle yapılan çalışmalar bulunmasına rağmen, bu nanopartiküllere bir tür yenilikçi antisens oligonükleotitler olan GapmeR'lerin enkapsülasyonu bilindiği kadarıyla ilk defa bu tez çalışmasıyla gerçekleştirilmiştir.
- GapmeR oligonükleotidi içeren kitozan-TPP nanopartiküllerinin lncRNA UCA1'in seviyesini baskılama etkinliği de, bilindiği kadarıyla ilk defa bu tez çalışmasıyla incelenmiştir.
- Elde edilen tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, kitozan-TPP nanopartiküllerin biyouyumlu, viral olmayan gen taşıyıcı bir sistem olarak kullanılabileceği görülmüştür.
- İleriki çalışmalarda bu taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon etkinliğinin geliştirilerek ve/veya daha uygun GapmeR dizileri kullanılarak lncRNA-UCA1 seviyesini daha belirgin olarak azaltabilecek formülasyonların geliştirilmesi planlanmaktadır.
- Ayrıca geliştirilen formülasyonlarda saklama süresinin uzatılabilmesi için liyofilizasyon ve/veya püskürterek kurutma gibi yöntemlerin kullanımı ve bu yöntemlerin optimizasyonunun gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- [1] T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kansere Kontrol Programı, 2016.
- [2] The Global Cancer Observatory 2020 - WHO, All cancers, 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.
- [3] National Cancer Institute, What Is Cancer?, (n.d.). <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [4] T. Kutluk, A. Kars, Kansere Konusunda Genel Bilgiler, 1962.
- [5] Ö. Oylar, İ. Tekin, Kansere Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi, Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Derg. 16 (2011) 147–154.
- [6] O. Baykara, Kansere tedavisinde güncel yaklaşımlar, Balıkesir Sağlık Bilim. Derg. 5 (2016) 154–165. <https://doi.org/10.5505/bsbd.2016.93823>.
- [7] K. Greish, Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines, J. Drug Target. 15 (2007) 457–464. <https://doi.org/10.1080/10611860701539584>.
- [8] L. Kuşcu, A.D. Sezer, Gen Tedavisi için Tasarlanan ve Patent Başvurusu Yapılan Farmasötiklerin İncelenmesi ve Değerlendirilmesi, Marmara Pharm. J. 20 (2016) 52–63. <https://doi.org/10.12991/mpj.20162092530>.
- [9] S.T. Crooke, Progress in antisense technology, Annu. Rev. Med. 55 (2004) 61–95. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.55.091902.104408>.
- [10] H.M. Wang, J.H. Lu, W.Y. Chen, A.Q. Gu, Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of lung cancer and is closely related to clinical diagnosis as a predictive biomarker in plasma, Int. J. Clin. Exp. Med. 8 (2015) 11824–11830.
- [11] W. Nie, H. Juan Ge, X. qun Yang, X. Sun, X. Huang, HaiTao, W. sheng Chen, B. Li, H. Huang, X. Tao, W. sheng Chen, B. Li, LncRNA-UCA1 exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer by targeting miR-193a-3p, Cancer Lett. 371 (2016) 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.11.024>.
- [12] H. Wu, C. Zhou, Long non-coding RNA UCA1 promotes lung cancer cell proliferation and migration via microRNA-193a/HMGB1 axis, Biochem. Biophys.

- Res. Commun. 496 (2018) 738–745. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.097>.
- [13] T. Jun, F.S. Zheng, K.M. Ren, H.Y. Zhang, J.G. Zhao, J.Z. Zhao, Long non-coding RNA UCA1 regulates the proliferation, migration and invasion of human lung cancer cells by modulating the expression of microRNA-143, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22 (2018) 8343–8352. https://doi.org/10.26355/eurev_201812_16532.
- [14] T. Jun, F.S. Zheng, K.M. Ren, H.Y. Zhang, J.G. Zhao, J.Z. Zhao, Suppression of long non-coding RNA UCA1 inhibits proliferation and invasion and induces apoptosis in human lung cancer cells, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22 (2018) 7274–7281. <https://doi.org/10.26355/eurev-201811-16263>.
- [15] L.L. Lloyd, J.F. Kennedy, P. Methacanon, M. Paterson, C.J. Knill, Carbohydrate polymers as wound management aids, *Carbohydr. Polym.* 37 (1998) 315–322. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00077-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00077-0).
- [16] E. Atıcı, Tıp tarihinde kanser ve lösemi, 22 (2007) 197–204.
- [17] WHO, 10 facts about cancer, (2017). <https://www.who.int/features/factfiles/cancer/en/>.
- [18] WHO_web page, Cancer-key facts, (n.d.). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [19] TÜİK, Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2019, (2020). <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>.
- [20] WHO, The Global Cancer Observatory 2020 - Turkey - WHO, 2020. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>.
- [21] T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Türkiye kanser istatistikleri 2015, 2018.
- [22] Türk Tıbbi Onkoloji Derneği, Akciğer Kanseri Nedir?, (n.d.). <https://www.kanser.org/saglik/toplum/kanser-turleri-alt-kategori/akciger-kanseri-nedir> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [23] T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı, Akciğer Kanseri Çalıştay Sonuç Raporu, 2016.

- [24] Türk Toraks Derneği, Akciğer Kanseri, (n.d.). <https://www.toraks.org.tr/site/resources/aegrotationes/p/3> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [25] I. Ferry, C.M. Kuzan-fischer, E. Ernoult, J.T. Rutka, Targeting Cell Cycle Proteins in Brain Cancer, 2nd ed., Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812100-9.00019-X>.
- [26] W.S. Klug, C.A. Cummings, Michael R. Spencer, M.A. Palladino, Concepts of Genetics, 10th ed., Pearson Education, San Francisco, 2011.
- [27] The Cancer Council Victoria, Kanser Nedir?, Ocak (2004). https://www.cancervic.org.au/downloads/CISS_factsheets/what_is_cancer.pdf.
- [28] J.B. Lamture, Understanding Cancer at the Subcellular Level, Nova Science Publishers, Inc., 2017.
- [29] B. Yokuş, D.Ü. Çakır, Kanser Biyokimyası, Dicle Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg. 1 (2012) 7–18.
- [30] M.M. Wei, G.B. Zhou, Long Non-coding RNAs and Their Roles in Non-small-cell Lung Cancer, Genomics, Proteomics Bioinforma. 14 (2016) 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.03.007>.
- [31] R.J. Taft, M. Pheasant, J.S. Mattick, The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity, BioEssays. 29 (2007) 288–299. <https://doi.org/10.1002/bies.20544>.
- [32] M. Esteller, Non-coding RNAs in human disease, Nat. Rev. Genet. 12 (2011) 861–874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>.
- [33] E. Guzel, Tumor Suppressor and Oncogenic Role of Long Non-Coding RNAs in Cancer, North. Clin. Istanbul. 7 (2019) 81–86. <https://doi.org/10.14744/nci.2019.46873>.
- [34] F. Güzelgöl, K. Aksoy, Kodlanmayan RNA'ların İşlevi ve Tıpta Kullanım Alanları, Arşiv Kaynak Tarama Derg. 18 (2009) 141–155. <https://doi.org/10.17827/AKTD.86688>.
- [35] K. Tano, N. Akimitsu, Long non-coding RNAs in cancer progression, Front. Genet. 3 (2012) 1–6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00219>.

- [36] E. Deniz, B. Erman, Long noncoding RNA (lincRNA), a new paradigm in gene expression control, *Funct. Integr. Genomics.* 17 (2017) 135–143. <https://doi.org/10.1007/s10142-016-0524-x>.
- [37] D. Turgut Coşan, E. Yağcı, H. Kurt, Epigenetikten Kansere Uzanan Çizgiler: Uzun Kodlamayan RNA'lar, *OSMANGAZİ J. Med.* 40 (2018) 114–121. <https://doi.org/10.20515/otd.440958>.
- [38] J. Carlevaro-Fita, A. Rahim, R. Guigó, L.A. Vardy, R. Johnson, Cytoplasmic long noncoding RNAs are frequently bound to and degraded at ribosomes in human cells, *RNA.* 22 (2016) 867–882. <https://doi.org/10.1261/rna.053561.115>.
- [39] R.A. Gupta, N. Shah, K.C. Wang, J. Kim, H.M. Horlings, D.J. Wong, M. Tsai, T. Hung, P. Argani, J.L. Rinn, Y. Wang, P. Brzoska, B. Kong, R. Li, R.B. West, M.J. Van De Vijver, S. Sukumar, H.Y. Chang, Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis, *Nature.* 464 (2010) 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08975>.
- [40] A. Bhan, S.S. Mandal, LncRNA HOTAIR: a master regulator of chromatin dynamics and cancer, *Biochim. Biophys. Acta.* 1856 (2015) 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.07.001.LncRNA>.
- [41] A. Morillon, Long Non-coding RNA and Cancer, in: *Long Non-Coding RNA-The Dark Side Genome*, ISTE Press Ltd and Elsevier Ltd, 2018: pp. 85–102. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-265-6.50005-8>.
- [42] G. Loewen, J. Jayawickramarajah, Y. Zhuo, B. Shan, Functions of lncRNA HOTAIR in lung cancer, *J. Hematol. Oncol.* 7 (2014) 1–10.
- [43] T. Gutschner, M. Hämmerle, S. Diederichs, MALAT1 — a paradigm for long noncoding RNA function in cancer, *J. Mol. Med.* 91 (2013) 791–801. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1028-y>.
- [44] M.J.G. Bussemakers, A. Van Bokhoven, G.W. Verhaegh, F.P. Smit, H.F.M. Karthaus, J.A. Schalken, F.M.J. Debruyne, N. Ru, W.B. Isaacs, DD3 : A New Prostate-specific Gene , Highly Overexpressed in Prostate Cancer, *Cancer Res.* 59 (1999) 5975–5979.
- [45] FDA, Premarket Approval (PMA), (2012).

- <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfpma/pma.cfm?id=P100033>.
- [46] J.T. Wei, Z. Feng, A.W. Partin, E. Brown, I. Thompson, L. Sokoll, D.W. Chan, Y. Lotan, A.S. Kibel, J.E. Busby, M. Bidair, D.W. Lin, S.S. Taneja, R. Viterbo, A.Y. Joon, J. Dahlgren, J. Kagan, S. Srivastava, M.G. Sanda, Can Urinary PCA3 Supplement PSA in the Early Detection of Prostate Cancer?, *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 4066–4073. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.52.8505>.
 - [47] Y. Shao, M. Ye, X. Jiang, W. Sun, X. Ding, Z. Liu, Gastric Juice Long Noncoding RNA Used as a Tumor Marker for Screening Gastric Cancer, *Cancer*. 120 (2014) 3320–3328. <https://doi.org/10.1002/cncr.28882>.
 - [48] A.L. Brunner, A.H. Beck, B. Edris, R.T. Sweeney, S.X. Zhu, R. Li, K. Montgomery, S. Varma, T. Gilks, X. Guo, J.W. Foley, D.M. Witten, C.P. Giacomini, R.A. Flynn, J.R. Pollack, R. Tibshirani, H.Y. Chang, M. Van De Rijn, R.B. West, Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers, *Genome Biol.* 13 (2012) R75. <http://genomebiology.com/2012/13/8/R75>.
 - [49] X. Yan, Z. Hu, Y. Feng, X. Hu, J. Yuan, S.D. Zhao, Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-Coding RNAs across Human Cancers, *Cancer Cell*. 28 (2016) 529–540. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.006>. Comprehensive.
 - [50] The Global Cancer Observatory 2018 - WHO, All cancers, 2019. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>.
 - [51] X. Liu, Z. Huang, W. Qian, Q. Zhang, J. Sun, Silence of lncRNA UCA1 rescues drug resistance of cisplatin to non-small-cell lung cancer cells, *J. Cell. Biochem.* 120 (2019) 9243–9249. <https://doi.org/10.1002/jcb.28200>.
 - [52] T. Xu, S. Yan, M. Wang, L. Jiang, P. Ma, B. Lu, Q. Chen, C. Wei, Z. Wang, LncRNA UCA1 Induces Acquired Resistance to Gefitinib by Epigenetically Silencing CDKN1A Expression in Non-small-Cell Lung Cancer, *Front. Oncol.* 10 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00656>.
 - [53] X. Chen, Z. Wang, F. Tong, X. Dong, G. Wu, R. Zhang, lncRNA UCA1 Promotes Gefitinib Resistance as a ceRNA to Target FOSL2 by Sponging miR-143 in Non-small Cell Lung Cancer, *Mol. Ther. - Nucleic Acids*. 19 (2020) 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.047>.

- [54] N. Cheng, W. Cai, S. Ren, X. Li, Q. Wang, H. Pan, M. Zhao, J. Li, Y. Zhang, C. Zhao, X. Chen, K. Fei, C. Zhou, F.R. Hirsch, Long non-coding RNA UCA1 induces non-T790M acquired resistance to EGFR-TKIs by activating the AKT/mTOR pathway in EGFR-mutant non-small cell lung cancer, *Oncotarget*. 6 (2015) 23582–23593. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4361>.
- [55] FDA, What is Gene Therapy?, (n.d.). <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/what-gene-therapy#footnote1>.
- [56] A. Günel Özcan, Gen Tedavisi ve Biyogüvenlik, *Türk Hij. ve Deney. Biyol. Derg.* 64 (2007) 35–50.
- [57] H.G. Terheggen, A. Lowenthal, F. Lavinha, J.P. Colombo, S. Rogers, *Unsuccessful Trial of Gene Replacement in Arginase Deficiency*, Springer-Verlag, 1975.
- [58] S. Rogers, A. Lowenthal, H.G. Terheggen, J.P. Columbo, Induction of arginase activity with the Shope papilloma virus in tissue culture cells from an argininemic patient, *J. Exp. Med.* 137 (1973) 1091–1096. <https://doi.org/10.1084/jem.137.4.1091>.
- [59] T. Friedmann, Stanfield Rogers: Insights into virus vectors and failure of an early gene therapy model, *Mol. Ther.* 4 (2001) 285–288. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0454>.
- [60] S. Şanlıoğlu, Gen Tedavisi, in: M. Dündar (Ed.), *Tıbbi Genet. ve Klin. Uygulamaları*, n.d.: pp. 497–522. http://genetherapy.akdeniz.edu.tr/assets/files/TG_GenTedavisi.pdf.
- [61] M. Wenner, Gene therapy: An Interview with an Unfortunate Pioneer, (2009). <https://www.scientificamerican.com/article/gene-therapy-an-interview/>.
- [62] M.L. Edelstein, M.R. Abedi, J. Wixon, Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update, *J. Gene Med.* 9 (2007) 833–842. <https://doi.org/10.1002/jgm.1100>.
- [63] W.W. Zhang, L. Li, D. Li, J. Liu, X. Li, W. Li, X. Xu, M.J. Zhang, L.A. Chandler, H. Lin, A. Hu, W. Xu, D.M.K. Lam, The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic, *Hum. Gene Ther.* 29 (2018)

- 160–179. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>.
- [64] Z. Peng, Current status of gendicine in China: Recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers, *Hum. Gene Ther.* 16 (2005) 1016–1027. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.1016>.
- [65] M. Liang, Oncorine, the World First Oncolytic Virus Medicine and its Update in China, *Curr. Cancer Drug Targets.* 18 (2018) 171–176. <https://doi.org/10.2174/1568009618666171129221503>.
- [66] Glybera Summary of Product Characteristics, (2012). https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/glybera-epar-product-information_en.pdf.
- [67] European Medicines Agency, Public Statement on Glybera: Expiry of the marketing authorisation in the European Union., 2017. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2017/10/WC500237864.pdf.
- [68] K.A. High, M.G. Roncarolo, Gene Therapy, *N. Engl. J. Med.* 381 (2019) 455–464. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1706910>.
- [69] T.M. Belete, The Current Status of Gene Therapy for the Treatment of Cancer, *Biol. Targets Ther.* 15 (2021) 67–77. <https://doi.org/10.2147/BTT.S302095>.
- [70] National Human Genome Research Institute, Talking Glossary of Genetic Terms - Antisense, (n.d.). <https://www.genome.gov/genetics-glossary/antisense> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [71] E. Devor, IDTutorial: Antisense Technologies, (2005). http://www.crchudequebec.ulaval.ca/wp-content/uploads/2015/10/Antisense_technologies.pdf.
- [72] C.C. Cunningham, New Modalities in Oncology: Antisense Oligonucleotides, *Baylor Univ. Med. Cent. Proc.* 15 (2002) 125–128. <https://doi.org/10.1080/08998280.2002.11927826>.
- [73] C.F. Bennett, L.M. Cowser, Application of antisense oligonucleotides for gene functionalization and target validation, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1 (1999) 359–371.
- [74] J. Kurreck, Antisense Technologies: Improvement through Novel Chemical

- Modifications, Eur. J. Biochem. 270 (2003) 1628–1644. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03555.x>.
- [75] T.L.H. Jason, J. Koropatnick, R.W. Berg, Toxicology of antisense therapeutics, Toxicol. Appl. Pharmacol. 201 (2004) 66–83. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.04.017>.
- [76] Y. Tekintaş, D.D. Dora, M. Hoşgör Limoncu, Antisense Oligonucleotids and Antibacterial Use, Türk Mikrobiyoloji Cemiy. Derg. 46 (2016) 51–57. <https://doi.org/10.5222/tmcd.2016.051>.
- [77] S. Wu-Pong, Alternative interpretations of the oligonucleotide transport literature: Insights from nature, Adv. Drug Deliv. Rev. 44 (2000) 59–70. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00084-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00084-3).
- [78] P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson, Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 (1978) 280–284. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.280>.
- [79] I.M. Phillips, C.Y. Zhang, Basic Principles of Using Antisense Oligonucleotides In Vivo, Methods Enzymol. 313 (1999) 46–56.
- [80] J.M. Campbell, T.A. Bacon, E. Wickstrom, Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid, J. Biochem. Biophys. Methods. 20 (1990) 259–267. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(90\)90084-P](https://doi.org/10.1016/0165-022X(90)90084-P).
- [81] J. Kurreck, E. Wyszko, C. Gillen, V.A. Erdmann, Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids, Nucleic Acids Res. 30 (2002) 1911–1918. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.1911>.
- [82] A.A. Levin, A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides, Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr. 1489 (1999) 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(99\)00140-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(99)00140-2).
- [83] D.A. Brown, S.H. Kang, S.M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, M.I. Nerenberg, Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding, J. Biol. Chem. 269 (1994)

- 26801–26805. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47090-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47090-1).
- [84] S.L. Hutcherson, R. Lanz, A Randomized Controlled Clinical Trial of Intravitreal Fomivirsen for Treatment of Newly Diagnosed Peripheral Cytomegalovirus Retinitis in Patients with AIDS, *Am. J. Ophthalmol.* 133 (2002) 467–474. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(02\)01327-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(02)01327-2).
- [85] European Medicines Agency, Public Statement on Vitravene (Fomivirsen), 2002. https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-vitravene-fomivirsen-withdrawal-marketing-authorisation-european-union_en.pdf.
- [86] B.P. Monia, E.A. Lesnik, C. Gonzalez, W.F. Lima, D. McGee, C.J. Guinasso, A.M. Kawasaki, P.D. Cook, S.M. Freier, Evaluation of 2'-Modified Oligonucleotides Containing 2'-Deoxy Gaps as Antisense Inhibitors of Gene Expression, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 14514–14522. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)85268-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)85268-7).
- [87] K.H. Altmann, D. Fabbro, N.M. Dean, T. Geiger, B.P. Monia, M. Müller, P. Nicklin, Second-generation antisense oligonucleotides: Structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors, *Biochem. Soc. Trans.* 24 (1996) 630–637. <https://doi.org/10.1042/bst0240630>.
- [88] R.G. Lee, J. Crosby, B.F. Baker, M.J. Graham, R.M. Crooke, Antisense technology: An emerging platform for cardiovascular disease therapeutics, *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 6 (2013) 969–980. <https://doi.org/10.1007/s12265-013-9495-7>.
- [89] Bio-Synthesis, Gapmer Design, (n.d.). <https://www.biosyn.com/tew/Gapmer-Design.aspx>.
- [90] Eurofins Genomics, Chimeric oligonucleotides, (n.d.). <https://eurofinsgenomics.com/en/products/dnarna-synthesis/ssrna-and-chimerics/>.
- [91] S.T. Crooke, R.S. Geary, Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 76 (2013) 269–276. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04469.x>.

- [92] J. Wengel, LNA (Locked Nucleic Acid), *Antisense Drug Technol.* (2001). <https://doi.org/10.1201/9781420002546.ch13>.
- [93] QIAGEN®, *Antisense LNA® GapmeRs Handbook*, (2017). file:///Users/rachelschafer/Downloads/HB-2446-001_1107952_HB_Antisense_LNA_GapmeRs_1017_WW.pdf.
- [94] T.A. Desai, Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation., *Expert Opin. Biol. Ther.* 2 (2002) 633–46. <https://doi.org/10.1517/14712598.2.6.633>.
- [95] A. Aartsma-Rus, D.R. Corey, The 10th Oligonucleotide Therapy Approved: Golodirsen for Duchenne Muscular Dystrophy, *Nucleic Acid Ther.* 30 (2020) 67–70. <https://doi.org/10.1089/nat.2020.0845>.
- [96] A. Pamukci, H. Portakal, E. Eroğlu, Terapötik Moleküllerin Aktarımında Kullanılan Yeni Nesil Biyomalzemeler, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.* 11 (2018) 524–542. <https://doi.org/10.18185/erzifbed.339405>.
- [97] M. Rocha, N. Chaves, S. Bao, Nanobiotechnology for Breast Cancer Treatment, in: Phuc Van Pham (Ed.), *Breast Cancer - From Biol. to Med.*, IntechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/66989>.
- [98] J.S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L.M. Ensign, PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 99 (2016) 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.
- [99] A.K. Singla, M. Chawla, Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update, *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (2001) 1047–1067. <https://doi.org/10.1211/0022357011776441>.
- [100] H.S. Kaş, Chitosan: Properties, preparations and application to microparticulate systems, *J. Microencapsul.* 14 (1997) 689–711. <https://doi.org/10.3109/02652049709006820>.
- [101] C. Schmitz, L.G. Auza, D. Koberidze, S. Rasche, R. Fischer, L. Bortesi, Conversion of chitin to defined chitosan oligomers: Current status and future prospects, *Mar. Drugs.* 17 (2019) 1–22. <https://doi.org/10.3390/md17080452>.
- [102] H.C. Yang, M.H. Hon, The effect of the degree of deacetylation of chitosan nanoparticles and its characterization and encapsulation efficiency on drug

- delivery, *Polym. - Plast. Technol. Eng.* 49 (2010) 1292–1296.
<https://doi.org/10.1080/03602559.2010.482076>.
- [103] J.B. Dima, C. Sequeiros, N. Zaritzky, Chitosan from Marine Crustaceans: Production, Characterization and Applications, *Biol. Act. Appl. Mar. Polysaccharides*. (2017). <https://doi.org/10.5772/65258>.
- [104] G. Lambert, E. Fattal, P. Couvreur, Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 99–112.
[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00116-2).
- [105] X. Yu, I. Trase, M. Ren, K. Duval, X. Guo, Z. Chen, Design of Nanoparticle-Based Carriers for Targeted Drug Delivery, *J. Nanomater.* 2016 (2016).
<https://doi.org/10.1155/2016/1087250>.
- [106] A. Zırh-Gürsoy, Giriş-Nanofarmasötiklerin Dünü, Bugünü ve Geleceği, in: A. Zırh-Gürsoy (Ed.), *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*, İstanbul, 2014: pp. 1–7.
- [107] I.R. Khalil, A.T.H. Burns, I. Radecka, M. Kowalczyk, T. Khalaf, G. Adamus, B. Johnston, M.P. Khechara, Bacterial-derived polymer poly- γ -glutamic acid (γ -PGA)-based micro/nanoparticles as a delivery system for antimicrobials and other biomedical applications, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1–18.
<https://doi.org/10.3390/ijms18020313>.
- [108] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66 (2014) 2–25.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>.
- [109] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release*. 100 (2004) 5–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010>.
- [110] J. Akbuğa, G. Durmaz, Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide, *Int. J. Pharm.* 111 (1994) 217–222.
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90344-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90344-1).
- [111] K. Nishimura, S. -I Nishimura, H. Seo, N. Nishi, S. Tokura, I. Azuma, Macrophage

- activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin, *J. Biomed. Mater. Res.* 20 (1986) 1359–1372. <https://doi.org/10.1002/jbm.820200910>.
- [112] P. He, S.S. Davis, L. Illum, Chitosan microspheres prepared by spray drying method, *Eur. J. Pharm. Sci.* 4 (1996) S173. [https://doi.org/10.1016/s0928-0987\(97\)86523-2](https://doi.org/10.1016/s0928-0987(97)86523-2).
- [113] H. Tokumitsu, H. Ichikawa, Y. Fukumori, Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron- capture therapy of cancer: Preparation by novel emulsion- droplet coalescence technique and characterization, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1830–1835. <https://doi.org/10.1023/A:1018995124527>.
- [114] A. Polk, B. Amsden, K. De Yao, T. Peng, M.F.A. Goosen, Controlled release of albumin from chitosan—alginate microcapsules, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 178–185. <https://doi.org/10.1002/jps.2600830213>.
- [115] L.S. Liu, S.Q. Liu, S.Y. Ng, M. Froix, T. Ohno, J. Heller, Controlled release of interleukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres, *J. Control. Release.* 43 (1997) 65–74. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01471-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01471-X).
- [116] A. Wang, P. Li, Y. Dai, J. Zhang, A. Wang, Q. Wei, Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine, 4 (2015) 221–228.
- [117] H. Thai, C. Thuy Nguyen, L. Thi Thach, M. Thi Tran, H. Duc Mai, T. Thi Thu Nguyen, G. Duc Le, M. Van Can, L. Dai Tran, G. Long Bach, K. Ramadass, C.I. Sathish, Q. Van Le, Characterization of chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects in vitro and in vivo, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57666-8>.
- [118] R. Bodmeier, K.H. Oh, Y. Pramhar, Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15 (1989) 1475–1494. <https://doi.org/10.3109/03639048909062758>.
- [119] S. Shiraishi, T. Imai, M. Otagiri, Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation, *J. Control. Release.* 25 (1993) 217–225. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(93\)90080-O](https://doi.org/10.1016/0168-3659(93)90080-O).

- [120] A.D. Sezer, J. Akbuğa, Controlled release of piroxicam from chitosan beads, *Int. J. Pharm.* 121 (1995) 113–116. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00413-Y](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00413-Y).
- [121] Z. Aydin, J. Akbuğa, Chitosan beads for the delivery of salmon calcitonin: Preparation and release characteristics, *Int. J. Pharm.* 131 (1996) 101–103. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04300-4](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04300-4).
- [122] P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jata, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1997) 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:13.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:13.0.CO;2-4).
- [123] P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jata, M.J. Alonso, Chitosan and Chitosan/Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymer Nanoparticles as Novel Carriers for Proteins and Vaccines, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1431–1436.
- [124] X.Z. Shu, K.J. Zhu, A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery, *Int. J. Pharm.* 201 (2000) 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00403-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00403-8).
- [125] K.A. Janes, P. Calvo, M.J. Alonso, Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 83–97. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00123-X).
- [126] H. Zhang, M. Oh, C. Allen, E. Kumacheva, Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery, *Biomacromolecules.* 5 (2004) 2461–2468. <https://doi.org/10.1021/bm0496211>.
- [127] R. Fernandez-Urrusuno, P. Cavlo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Enhancement of Nasal Absorption of Insulin Using Chitosan Nanoparticles, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1576–1581. <https://doi.org/10.1023/a:1018908705446>.
- [128] Y. Pan, Y. Li, H. Zhao, J. Zheng, H. Xu, G. Wei, J. Hao, F. Cui, Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 139–147. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00486-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00486-6).
- [129] A. Grenha, B. Seijo, C. Remuñán-López, Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 25 (2005) 427–437.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.04.009>.

- [130] H. Katas, H.O. Alpar, Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery, *J. Control. Release.* 115 (2006) 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.07.021>.
- [131] N. Csaba, M. Köping-Höggård, M.J. Alonso, Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery, *Int. J. Pharm.* 382 (2009) 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.028>.
- [132] M.A.G. Raja, H. Katas, Z.A. Hamid, N.A. Razali, Physicochemical properties and in vitro cytotoxicity studies of chitosan as a potential carrier for dicer-substrate siRNA, *J. Nanomater.* 2013 (2013). <https://doi.org/10.1155/2013/653892>.
- [133] M.A.G. Raja, H. Katas, T.J. Wen, Stability, intracellular delivery, and release of siRNA from chitosan nanoparticles using different cross-linkers, *PLoS One.* 10 (2015) 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128963>.
- [134] R.C. Choudhary, R.V. Kumaraswamy, S. Kumari, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, V. Saharan, Synthesis, Characterization, and Application of Chitosan Nanomaterials Loaded with Zinc and Copper for Plant Growth and Protection, in: R. Prasad, M. Kumar, V. Kumar (Eds.), *Nanotechnol. An Agric. Paradig.*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, 2017: pp. 227–247. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4573-8_15.
- [135] Malvern Instruments, Manual: Zetasizer Nano user manual, Inc Add. -. (2009) 1–308. www.malvern.com.
- [136] Malvern, Dynamic light scattering - common terms defined, (n.d.). <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/Whitepapers/WP111214DLSTermsDefined.html> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [137] Sartorius Stedim Biotech GmbH, Vivaspin 500 µl and 2 ml: technical data and operating instructions, (2018). <https://www.vivaproducts.com/downloads/vivaspin-2-500-operating-instructions.pdf> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).

- [138] Promega Corporation, QuantiFluor® RNA System -Technical Manual, (2019). <https://worldwide.promega.com/products/rna-analysis/dna-and-rna-quantitation/quantifluor-rna-system/?catNum=E3310#protocols> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [139] American Type Culture Collection (ATCC), Calu-3 Product Sheet, (n.d.). <https://www.atcc.org/products/htb-55> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [140] T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [141] A. Grenha, C.I. Grainger, L.A. Dailey, B. Seijo, G.P. Martin, C. Remuñán-López, B. Forbes, Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro, *Eur. J. Pharm. Sci.* 31 (2007) 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.02.008>.
- [142] Invitrogen, Lipofectamine_RNAiMAX, Thermo Fish. Sci. Inc. (2014) 1–2. https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/lipofectamine3000_scaling.pdf.
- [143] Jena Bioscience, Total RNA Purification Kit - Column Kit, (n.d.). <https://www.jenabioscience.com/images/PDF/PP-210.0002.pdf> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [144] Qiagen, Rneasy Mini Kit Handbook, (2019). <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-kits/> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [145] Qiagen, miScript II RT Kit, Qiagen. (2011) 1–4. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=b112855a-7ce0-4b30-b493-a5683ee130fd&lang=en> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [146] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 (1986) 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>.

- [147] PrimerDesign, Custom designed real-time PCR assay handbook, (2016). http://www.primerdesign.co.uk/assets/files/primer_only_handbook.pdf (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [148] Qiagen, QuantiTect® Primer Assay Handbook, (2011) 1–68. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/qpcr-assays-and-instruments/mrna-incrna-qpcr-assays-panels/quantitect-primer-assays/> (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [149] PrimerDesign, Precision® PLUS qPCR Master Mix, (2018). http://www.primerdesign.co.uk/assets/files/PrecisionPLUS_qPCR_Master_Mix_Handbook_1.pdf?timestamp=1636238562 (Son Erişim Tarihi: 9 Şubat 2022).
- [150] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods*. 25 (2001) 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [151] H.J. Jeon, Y. Il Jeong, M.K. Jang, Y.H. Park, J.W. Nah, Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics, *Int. J. Pharm.* 207 (2000) 99–108. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00537-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00537-8).
- [152] M.P. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R.J. Levy, G.L. Amidon, The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1568–1573. <https://doi.org/10.1023/A:1012126301290>.
- [153] M.P. Desai, V. Labhasetwar, G.L. Amidon, R.J. Levy, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1838–1845. <https://doi.org/10.1023/A:1016085108889>.
- [154] S. Prabha, W.Z. Zhou, J. Panyam, V. Labhasetwar, Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: Studies with fractionated nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 244 (2002) 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00315-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00315-0).
- [155] M. Huang, C.W. Fong, E. Khor, L.Y. Lim, Transfection efficiency of chitosan vectors: Effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation, *J. Control. Release*. 106 (2005) 391–406. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.05.004>.

- [156] W. Fan, W. Yan, Z. Xu, H. Ni, Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 90 (2012) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>.
- [157] S. Rodrigues, A.M.R. da Costa, A. Grenha, Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios, *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.010>.
- [158] Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron, Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 44 (2005) 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.001>.
- [159] D.W. Lee, K. Powers, R. Baney, Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Polym.* 58 (2004) 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.06.033>.
- [160] R.M. Schiffelers, M.C. Woodle, P. Scaria, Pharmaceutical Prospects for RNA Interference, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1–7. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000012145.49054.6c>.
- [161] X.Z. Shu, K.J. Zhu, The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54 (2002) 235–243. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00052-8).
- [162] A. Fàbregas, M. Miñarro, E. García-Montoya, P. Pérez-Lozano, C. Carrillo, R. Sarrate, N. Sánchez, J.R. Ticó, J.M. Suñé-Negre, Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 446 (2013) 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.015>.
- [163] E.S.K. Tang, M. Huang, L.Y. Lim, Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 265 (2003) 103–114. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00408-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00408-3).
- [164] K. Gvili, O. Benny, D. Danino, M. Machluf, Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for DNA delivery: waiving preparation complexity and increasing

- efficiency, *Biopolymers*. 85 (2007) 379–391.
- [165] A. Almalik, I. Alradwan, M.A. Kalam, A. Alshamsan, Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating, *Saudi Pharm. J.* 25 (2017) 861–867. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.12.008>.
- [166] R. Fernandez-Urrusuno, D. Romani, P. Calvo, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Development of a freeze-dried formulation of insulin-loaded chitosan nanoparticles intended for nasal administration, *S.T.P. Pharma Sci.* 9 (1999) 429–436. <https://chemport.cas.org/cgi-bin/sdcgi?APP=ftslink&action=reflink&origin=catchword&version=1.0&coi=1:CAS:528:DC%2BD3cXjsF2jsA%3D%3D&md5=68d2ec6712d3e9c9a3dc0541083143aa>.
- [167] M. Cuña, M. Alonso-Sande, C. Remunán-López, J.P. Pivel, J.L. Alonso-Lebrero, M.J. Alonso, Development of phosphorylated glucomannan-coated Chitosan nanoparticles as nanocarriers for protein delivery, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 2887–2895. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.435>.
- [168] J.A. Ataíde, D.C. Geraldes, E.F. Gérios, F.M. Bissaco, L.C. Cefali, L. Oliveira-Nascimento, P.G. Mazzola, Freeze-dried chitosan nanoparticles to stabilize and deliver bromelain, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 61 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102225>.
- [169] J.H. Crowe, L.M. Crowe, J.F. Carpenter, Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis, part 1, *BioPharm.* (1993) 28–34.
- [170] S.D. Allison, A. Dong, J.F. Carpenter, Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying, and rehydration, *Biophys. J.* 71 (1996) 2022–2032. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79400-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79400-6).
- [171] P. Fonte, S. Reis, B. Sarmiento, Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery, *J. Control. Release.* 225 (2016) 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.034>.
- [172] S. Eliyahu, A. Almeida, M.H. Macedo, J. das Neves, B. Sarmiento, H. Bianco-Peled, The effect of freeze-drying on mucoadhesion and transport of acrylated

- chitosan nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 573 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118739>.
- [173] T. López-León, E.L.S. Carvalho, B. Seijo, J.L. Ortega-Vinuesa, D. Bastos-González, Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: Electrokinetic and stability behavior, *J. Colloid Interface Sci.* 283 (2005) 344–351.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.08.186>.
- [174] K. Vijayalakshmi, B. Devi, S. PN, Synthesis, Characterization and Applications of Nanochitosan/Sodium Alginate/Microcrystalline Cellulose Film, *J. Nanomed. Nanotechnol.* 07 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000419>.
- [175] L. Qi, Z. Xu, X. Jiang, C. Hu, X. Zou, Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 2693–2700.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.09.007>.
- [176] C. Lustriane, F.M. Dwivany, V. Suendo, M. Reza, Effect of chitosan and chitosan-nanoparticles on post harvest quality of banana fruits, *J. Plant Biotechnol.* 45 (2018) 36–44. <https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.1.036>.
- [177] Y. Xu, Y. Du, Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 215–226.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00548-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00548-3).
- [178] K. Sharma, S. Somavarapu, A. Colombani, N. Govind, K.M.G. Taylor, Nebulised siRNA encapsulated crosslinked chitosan nanoparticles for pulmonary delivery, *Int. J. Pharm.* 455 (2013) 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.024>.
- [179] M. Malhotra, A. Kulamarva, S. Sebak, A. Paul, J. Bhatena, M. Mirzaei, S. Prakash, Ultrafine chitosan nanoparticles as an efficient nucleic acid delivery system targeting neuronal cells ultrafine nanoparticles siRNA delivery system, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35 (2009) 719–726.
<https://doi.org/10.1080/03639040802526789>.
- [180] B.I. Florea, M. Thanou, H.E. Junginger, G. Borchard, Enhancement of bronchial octreotide absorption by chitosan and N-trimethyl chitosan shows linear in vitro/in vivo correlation, *J. Control. Release.* 110 (2006) 353–361.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.001>.

- [181] Ö. Güleş, Ü. Eren, Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, Y.Y.Ü. Vet. Fakültesi Derg. 2 (2008) 73–78. [http://vfdergi.yyu.edu.tr/archive/2008/19_2/2008_19_\(2\)_73-78.pdf](http://vfdergi.yyu.edu.tr/archive/2008/19_2/2008_19_(2)_73-78.pdf).
- [182] A.J. Hollins, Y. Omid, I.F. Benter, S. Akhtar, Toxicogenomics of drug delivery systems: Exploiting delivery system-induced changes in target gene expression to enhance siRNA activity, J. Drug Target. 15 (2007) 83–88. <https://doi.org/10.1080/10611860601151860>.
- [183] Y. Omid, A.J. Hollins, M. Benboubetra, R. Drayton, I.F. Benter, S. Akhtari, Toxicogenomics of non-viral vectors for gene therapy: A microarray study of lipofectin- and oligofectamine-induced gene expression changes in human epithelial cells, J. Drug Target. 11 (2003) 311–323. <https://doi.org/10.1080/10611860310001636908>.
- [184] A. Fiszer-Kierzkowska, N. Vydra, A. Wysocka-Wycisk, Z. Kronekova, M. Jarzab, K.M. Lisowska, Z. Krawczyk, Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells, BMC Mol. Biol. 12 (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-27>.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNE YÖNELİK GEN MATERYALİ YÜKLÜ NANOTAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONLARI

ORJİNALLIK RAPORU

% 10	% 10	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	tip.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	www.toraks.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	kisi.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

hsgm.saglik.gov.tr