

**Gen Taşıyıcı Sistem Olarak
HDL (Yüksek-Yoğunluklu Lipoprotein)
Mikro-ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması
Yüksek Lisans Tezi**

**Rasim MASIMOV
ESKİŞEHİR 2019**

**Gen Taşıyıcı Sistem Olarak
HDL (Yüksek-Yoğunluklu Lipoprotein)
Mikro-ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması
Yüksek Lisans Tezi**

Rasim MASIMOV

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Nanoteknoloji Bilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Temmuz 2019**

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No.1801S022)

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Rasim MASİMOV'un "Gen Taşıyıcı Sistem Olarak HDL (Yüksek-Yoğunluk Lipoprotein) Mikro-ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması" başlıklı tezi 31/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü EğitimÖğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

Doç.Dr.
GÜLAY BÜYÜKKÖROĞLU

Üye

Doç.Dr. FAYİM YENİLMEZ

Üye

Dr.Öğr.Üy. U. MERVE GÜVEN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Gen Taşıyıcı Sistem Olarak HDL (Yüksek-Yoğunluk Lipoprotein)
Mikro-ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Rasim MASIMOV

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı,
Nanoteknoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2019

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Günümüzde Nanoteknoloji ve Gen tedavisinin hızla gelişmesi geleneksel ilaçların yerini, bu sistemler ile oluşturulan, yeni terapötiklere bırakmasına neden olmaktadır. Nanoteknoloji yöntemleri kullanılarak oluşturulan taşıyıcı sistemler ile ilaçların daha etkili şekilde istenen organlara hedeflenmesi ve diğer organlara olan yan etkilerinin azaltılması başarılmıştır.

Yüksek-Yoğunluk Lipoprotein (HDL) insan vücuduna özgün bir kompleks yapıdır. HDL partiküllerinin içerdiği apolipoprotein (ApoA-I) moleküllerinin hücre zarında olan SRB1 reseptörleri ile doğal bir etkileşim sağlar. SRB1 reseptörlerinin kanserli hücrelerin yüzeyinde daha fazla bulunması, HDL kullanımıyla, kanserli hücrelere hedefleme yapılabileceğini göstermektedir.

Bcl-2 geninin birçok kanser hücresinde aşırı ekprese olması, hücrelerin apoptoza gitmesini engellemektedir. Dolayısıyla bu genin susturulması kanser hücrelerinin ölümü üzerinde etkindir.

Kitosan, katyonik özellik, biyouyumlu, biyoparçalanır, non-toksik, ucuz ve düşük immünolojik özelliklere sahip olduğu için gen taşıyıcı sistem olarak yaygın kullanılmaktadır.

Bu çalışmada hedeflenen, anti-Bcl-2 siRNA'yı kanserli hücrelere taşıması için yüzeyine HDL bağlanarak aktif hedeflendirilmiş kitosan nanopartiküllerinin geliştirilmesi ve *in vitro* karakterizasyonudur.

Anahtar Kelimeler: Kitosan Nanopartikülleri, HDL, Apo A1, Gen Taşıyıcı Sistem, Bcl-2 siRNA, Aktif hedeflendirme, Kanser, Apoptoz

ABSTRACT

Preparation of HDL (High Density Lipoprotein)
Micro- and Nanoparticles as Gene Delivery System

Rasim MASIMOV

Department of Advanced Technologies,

Programme in Nanotechnology

Anadolu University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, July 2019

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Nowadays, the rapid development of nanotechnology and gene therapy causes the traditional drugs to be replaced by new therapeutics, created by these systems. With drug delivery systems, created using nanotechnology methods, it has been possible to more effectively target drugs to desired organs and to reduce side effects to other organs.

HDL (high density lipoprotein) is a unique complex structure for the human body. Apolipoprotein (ApoA-I) molecules that contained in HDL particles provides a natural interaction with SRB1 receptors in the cell membrane. The higher presence of SRB1 receptors on the surface of cancerous cells suggests that using HDL may target cancerous cells.

Overexpression of the Bcl-2 gene in many cancer cells prevents the cells from apoptosis. Thus, silencing of this gene is effective on cancer cell death.

Chitosan is widely used as a gene delivery system because of its cationic, biocompatible, biodegradable, non-toxic, cheap and low immunogenic properties.

The aim of this study is to develop and *in vitro* characterization of active targeted chitosan nanoparticles by binding HDL to their surface to transport anti-Bcl-2 siRNA to cancer cells.

Keywords: Chitosan Nanoparticles, HDL, Apo A1, Gene Carrier System, Bcl-2 siRNA, Active targeting, Cancer, Apoptosis

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk zamanlardan başlayarak gerekse ders dönemimde gerekse de tez dönemimde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana destek olan, teoriksel ve deneysel bilgi ve becerilerimin gelişmesinde büyük emeği geçen, bunların yanı sıra bu 3 sene boyunca her zaman büyük manevi desteğini gördüğüm saygıdeğer tez danışman hocam Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Bilgi ve deneyimleriyle çalışmalarımda bana her zaman yardımcı olan, yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman sorular sorduğum ve gerek bilimsel gerekse de manevi desteğiyle her zaman yanımda olan değerli hocam Arş. Gör. Behiye ŞENEL'e,

Yüksek lisans eğitimim sırasında zaman-zaman bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım farmasötik teknoloji bölümü hocalarım, Prof. Dr. Yasemin YAZANA, Prof. Dr. Müzeyyen Demirel'e, Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIMLI-OĞLU'na, Arş. Gör. Kemal Can DEMİRKILINÇ'a, Dr. Öğr. Üyesi Alper ÖZTÜRK'e,

Labaratuvara geldiğim ilk günden her zaman bana destekte bulunan, her konuda bana yardım eden, her zaman büyük manevi desteğini gördüğüm çok değerli arkadaşım Serdar ALAGÖZ'e

Yüksek lisansımın bana kazandırdığı çok değerli arkadaşlarım, Müşerref YILMAZ ve Burcu Latife ARSLAN'a

Bölümde ve Labaratuvardaki diğer tüm Yüksek Lisans arkadaşlarıma,

Türkiyede geçen 3 sene boyunca her zaman yanımda olarak bana her konuda destek olan değerli arkadaşım Zulfiyya JAFAROVA'ya

Bana her zaman güvenen, maddi ve manevi destek olarak, Türkiye'ye gelmemi ve eğitim almamı sağlayan sevgili ailem'e

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

Rasim MASIMOV

Temmuz 2019

31.08.2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarda bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.



İmza

Rasim MASIMOV

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜRLER	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nanoteknolojinin Tanım ve Tarihi	3
2.2. Nanoteknolojinin Uygulanma Alanları	3
2.2.1. Tıpta nanoteknoloji	4
2.2.1.1. <i>Nanodiagnostikler ve rejeneratif tıp</i>	4
2.2.1.2. <i>İlaç taşınma ve kontrollü salınım</i>	4
2.3. Gen Tedavisinin Tanımı	5
2.4. Gen tedavi şekilleri	6
2.5. Antisens Teknolojisi	7
2.5.1. Antisens oligonükleotidler (AS-ON)	7
2.5.1.1. <i>Birinci sınıf modifiye AS-ON'ler</i>	8
2.5.1.2. <i>İkinci sınıf modifiye AS-ON'ler</i>	9
2.5.1.3. <i>Üçüncü sınıf modifiye AS-ON'ler</i>	9
2.5.2. Ribozimler	10
2.5.3. RNAi mekanizması	11
2.6. Genetik Materyalin Hücre İçine Taşınması	13
2.6.1. Viral vektörler	13
2.6.1.1. <i>Adenovirüs (Ad) vektörleri</i>	14
2.6.1.2. <i>Adeno-İlişkili Virüs (AAV) vektörleri</i>	14
2.6.1.3. <i>Herpes Simpleks Virüs (HSV) vektörleri</i>	15
2.6.1.4. <i>Retrovirüs vektörleri</i>	15

2.6.2. Non-viral vektörler	16
2.6.2.1. Lipit bazlı vektörler	16
Lipozomlar	16
Katı lipit nanopartiküller (KLN)	19
2.6.2.2. Polimer bazlı vektörler	20
Polietilenimin (PEI)	20
Poli (l-lisin) (PLL)	21
Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	22
Kitosan	22
Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanma yöntemleri	24
İyonik jelleşme	24
Polielektrolit Kompleksi (PEC)	24
Çöktürme	25
Kompleks Koaservasyon	25
Mikroemulsiyon	25
Emulsiyon-çözücü diffüzyonu	25
Kovalent-çapraz bağlama yöntemi	26
2.7. İlaç taşıyıcı sistemlerin hedeflendirilmesi	26
2.7.1. Pasif hedefleme	26
2.7.2. Aktif hedefleme	27
2.8. Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (High Density Lipoprotein, HDL)	28
2.8.1. Genetik materyal taşınmasında HDL	30
2.8.2. HDL'nin kandan izolasyonu	32
2.9. Apoptoz	33
2.9.1. Ekstrinsik yolda apoptoz	33
2.9.2. İntrinsik yolda apoptoz	34
2.10. Bcl-2	35
3. GEREÇLER	37
3.1. Kullanılan Maddeler	37
3.2. Kullanılan Cihazlar	38
4. YÖNTEM	39
4.1. Gönüllülerden Kan Alma	39

4.2. HDL İzolasyonu	39
4.2.1. Kandan Serumun Çıkarılması	39
4.2.2. HDL'nin Serumdan izolasyonu	39
4.2.3. HDL miktar tayini	41
4.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi (<i>Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi</i>)	41
4.4. Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanma Çalışmaları	46
4.4.1. Yüksek yoğunluklu kitosan kullanılarak yapılan formülasyon çalışmalarındaki koşullar	47
4.4.2. Düşük yoğunluklu kitosan kullanılarak yapılan formülasyon çalışmaları	48
4.4.3. Yüzeyine HDL bağlı düşük yoğunluklu kitosan formülasyonların hazırlanması	48
4.5. Genetik Materyalin (DNA ve siRNA) Taşıyıcı Sistemlere Yükleme Çalışmaları	49
4.5.1. Enkapsülasyon Yöntemi	49
4.5.2. Adsorpsiyon Yöntemi	50
4.6. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları	50
4.6.1. Partiküllerin yüzey morfolojisinin incelenmesi	50
4.6.2. Partikül boyutu	50
4.6.3. Zeta potansiyel	50
4.6.4. pH Değeri	51
4.7. Formülasyonların Genetik Materyal Bağlama Yetilerinin Belirlenmesi .	51
4.7.1. Jel retardasyon çalışmaları	51
4.8. Serum İçindeki Kararlılık	52
4.9. Hücre Kültürü	52
4.9.1. Sitotoksikite çalışmaları	52
4.9.2. Transfeksiyon çalışmaları	54
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	56
5.1. HDL'nin Serumdan İzolasyon Çalışmaları	56
5.2. SDS-PAGE Çalışması	56
5.3. Kitosan Nanopartiküllerinin Formülasyon Çalışmaları	59

5.3.1. Partikül boyutu ve dağılımı	59
5.3.2. Zeta potansiyel değeri	61
5.4. HDL ile Yapılan Formülasyon Çalışmaları	63
5.4.1. Partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel bulguları	64
5.4.2. Formülasyonların pH değeri	65
5.4.3. Formülasyonun morfolojisi	65
5.5. HDL'nin formülasyonlara bağlanmasının belirlenmesi	67
5.6. Formülasyonlara DNA/siRNA yüklenmesi	68
5.6.1. K3-H4 formülasyonuna DNA enkapsülasyonu	68
5.6.2. Formülasyonlara siRNA adsorbsiyonu	70
5.7. Serum kararlılık çalışması	72
5.8. Formülasyonların Sitotoksitesisi	74
5.9. Formülasyonların Transfeksiyonu	84
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKÇA	91
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Fosfodiester Oligonükleotit.....	7
Şekil 2.2. Fosforotioat Oligonükleotit (PS).....	8
Şekil 2.3. İkinci sınıf modifiye AS-ON'ler.....	9
Şekil 2.4. Üçüncü sınıf modifiye AS-ON'ler.....	10
Şekil 2.5. Ribozimlerin ve Oligonükleotidlerin etki mekanizmaları	11
Şekil 2.6. RNAi, siRNA ve miRNA yolakları (Lam vd., 2015)	13
Şekil 2.7. Lipozom.....	17
Şekil 2.8. Dotap örneğinin lipit yapısı.....	17
Şekil 2.9. Katı lipit nanopartiküllerin yapısı.....	19
Şekil 2.10. Kitosanın Kimyasal Yapısı.....	23
Şekil 2.11. Aktif ve Pasif hedeflenme.....	28
Şekil 2.12. HDL metabolizması.....	30
Şekil 2.13. Apoptoz yolakları.....	35
Şekil 4.1. SDS-PAGE jel elektroforezi.....	42
Şekil 4.2. İyonik jelasyon yöntemiyle kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması.....	47
Şekil 5.1. Proteinlerin molekül ağırlığını belirlemek için kullanılan işaretleyici....	57
Şekil 5.2. HDL'nin SDS-PAGE görüntüsü.....	58
Şekil 5.3. Apo A1 proteininin izolasyonu sonrası SDS-PAGE görüntüsü.....	58
Şekil 5.4. K3-H4 formülasyonunun SEM görüntüsü (11,03K X büyütme).....	66
Şekil 5.5. K3-H4 formülasyonunun SEM görüntüsü (18,74K X büyütme).....	66
Şekil 5.6. K3-H4 formülasyonunun SEM görüntüsü (112,03K X büyütme).....	67
Şekil 5.7. HDL, HDL bağlı Formülasyonların ve K3 Formülasyonunun agaroz jel görüntüsü.....	68
Şekil 5.8. DNA yüklü K3-H4-DNA Formülasyonunun agaroz jel görüntüsü.....	69
Şekil 5.9. Formülasyon hazırlama koşullarının DNA'ya etkisi.....	70
Şekil 5.10. siRNA adsorbe formülasyonların agaroz jel görüntüsü.....	71
Şekil 5.11. siRNA adsorbe formülasyonların agaroz jel görüntüsü.....	72
Şekil 5.12. Formülasyonların serum kararlılık çalışmasının agaroz jel görüntüsü..	73
Şekil 5.13. Formülasyonların serum kararlılık çalışmasının agaroz jel görüntüsü..	73
Şekil 5.14. K3 formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi.	75

Şekil 5.15.	K3 formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi.	75
Şekil 5.16.	K3 formülasyonu'nun L929 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi....	76
Şekil 5.17.	K3 formülasyonu'nun L929 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi....	76
Şekil 5.18.	K3-H4 formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi.....	77
Şekil 5.19.	K3-H4 formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi.....	77
Şekil 5.20.	K3-H4 formülasyonu'nun L929 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi.....	78
Şekil 5.21.	K3-H4 formülasyonu'nun L929 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi.....	78
Şekil 5.22.	K3-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi.....	79
Şekil 5.23.	K3-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi.....	79
Şekil 5.24.	K3-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi.....	80
Şekil 5.25.	K3-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi.....	80
Şekil 5.26.	K3-H4-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi.....	81
Şekil 5.27.	K3-H4-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi.....	81
Şekil 5.28.	K3-H4-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi.....	82
Şekil 5.29.	K3-H4-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi.....	82
Şekil 5.30.	Formülasyonlar'ın HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi.....	83
Şekil 5.31.	Formülasyonlar'ın L929 hücrelerinde 48. saatteki sitotoksitesi.....	84
Şekil 5.32.	K3-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında transfeksiyon görüntüleri.....	83
Şekil 5.33.	K3-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında transfeksiyon görüntüleri.....	86

Şekil 5.34.	K3-H4-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında transfeksiyon görüntüleri.....	87
Şekil 5.35.	K3-H4-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında transfeksiyon görüntüleri.....	88

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler.....	42
Tablo 4.2. Yüksek yoğunluklu kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların adlandırılması, formülasyon bileşimi, hazırlama koşulları.....	48
Tablo 4.3. Düşük yoğunluklu kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların adlandırılması, formülasyon bileşimi, hazırlama koşulları.....	48
Tablo 4.4. HDL ve düşük yoğunluklu kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların adlandırılması, formülasyon bileşimi, hazırlama koşulları.....	49
Tablo 5.1. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel değerleri.....	60
Tablo 5.2. Düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak yapılan çalışmaların partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel değerleri.....	60
Tablo 5.3. HDL bağlı formülasyonların partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel değerleri	64
Tablo 5.4. Şekil 5.10.'da gösterilen kuyucuklara yüklenmiş, siRNA'nın ve siRNA adsorbsiyonu için kullanılmış olan K3, K3-H4 formülasyonlarının miktarları.....	71
Tablo 5.5. Sitotoksikite testi için kullanılan K3 ve K3H4 formülasyonlarının miktarları.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Å	: Angström
A549	: Akciğer kanseri hücrelerinde
AAV	: Adeno-İlişkili Virüs
ABCA1	: ATP-bağlayıcı kaset A 1
A-BLL	: Akut B lenfoblastik lösemi
Ad	: Adenovirüs
Ago2	: Argonaute proteini
Apo A1	: Apolipoprotein A1
Apo B100	: Apolipoprotein B 100
Apo E	: Apolipoprotein E
APS	: Amonyum persülfat
AS-ON	: Antisens oligonükleotid
BCEC	: Beyin Kılcal Endotel Hücresi,
Bcl-2	: B-hücre lenfoma 2 (apoptoz düzenleyici gen)
BH	: Bcl-2 homologisi
CETP	: Kolesterol Ester Transfer Proteini
Chol-siRNA	: Kolesterol konjugeli siRNA
CNT	: Karbon Nanotüpü
DISC	: Death-Inducing Signaling Complex (Ölüme neden olan sinyal kompleksi)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNase I	: Deoksiribonükleaz I
DOTAP	: <i>N</i> -[1-(2,3-dioleiloksi) propil]- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> -trimetil amonyum
dsRNA	: Çift iplikli RNA
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
EPR	: Enhanced Permeability and Retention
FBS	: Fetal Bovin serum
FITC	: Floressein izotiyosiyanat
GFP	: Green Floresan Protein
HCl	: Hidroklorik asit
HDL	: High Density Lipoprotein (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein)
HDLR	: HDL reseptörü

HepG2	: Karaciğer Kanseri Hücreleri
HSV	: Herpes simpleks virüsü
ICAM-1	: Adhezyon Molekül 1
kb	: Kilobaz
kDA	: Kilo Dalton
KLN	: Katı lipit nanoparçacık
LCAT	: Lesitin Kolesterol Asiltransferaz
LNA	: Kilitli Nükleik Asit
mA	: Miliamper
MCF7	: Meme kanseri hücreleri
MF	: Morpholino Fosforoamidat
miRNA	: MicroRNA
mL	: Mililitre
MNP	: Manyetik Nanopartikül
mRNA	: Mesajcı RNA
MTT	: 3-(4, 5-Dimetil-2-tiyazolil-2, 5-difenil -2H tetrazolyum bromür
mV	: Milivolt
N/P	: Amin / fosfat oranı
NaOH	: Sodyum hidroksit
Nm	: Nanometre
OAT3	: Organik Anyon Taşıyıcı 3
OME	: 2'-O-metil
PDI	: Polidisperslik indisi
pDNA	: Plazmit DNA
PEC	: Polielektrolit Kompleksi
PEG	: Polietilen glikol
PEI	: Polietilenimin
PLGA	: Polilaktik ko-glikolik asit
PNA	: Peptid Nükleik Asit
Pol II	: Polimeraz II
Pol III	: Polimeraz III
pre-miRNA	: Precursor miRNA
pri-miRNA	: Primer miRNA

PS	: Fosforotioat Oligonükleotit
QDs	: Quantum dots (Kuantum noktaları)
RISC	: RNA -Induced Silencing Complex
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
RSV	: Rous sarcoma virüsü
SDS	: Sodyum dodesil sülfat (Sodyum lauril sülfat)
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
SH	: Standart hata
siRNA	: Small interfering RNA (Küçük susturucu RNA)
SRB1	: Scavenger receptor class B type 1 (Çöpçü reseptörü sınıf B tip 1)
TAE	: Tris-asetik asit EDTA
TBE	: Tris-borik asit EDTA
TEM	: Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TPP	: Tripolifosfat pentabazik
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
Tris-HCl	: Hidroklorik asit ile pH değeri ayarlanmış Tris çözeltisi
UV	: Ultraviyole
Mg	: Mikrogram
μ L	: Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi sonucunda üretilen farklı nanopartiküler sistemler ilaç/genetik materyalin hedef hücrelere taşınmasına olanak sağlamaktadır. Diğer yandan moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler beraberinde gen tedavisinin de gelişimine yardımcı olmaktadır.

Yapılan son çalışmalarda çeşitli nanopartiküller sayesinde hücre içerisine girişi kolaylaştırılan siRNA molekülleri ile hastalıkların tedavisinin, geleneksel ilaçlardan daha etkin ve zararsız şekilde yapılabilirdiği belirtilmiştir. siRNA'nın tedavi amaçlı kullanımı, genellikle, istenmeyen etkiye sebep olan proteini kodlayan mRNA'nın siRNA kullanılarak susturulmasına dayanmaktadır. Bu mekanizma Antisens Teknolojisi olarak bilinmektedir.

Bu çalışmada susturulması hedeflenen gen olarak, birçok kanser hücresinde aşırı eksprese olan ve apoptotik süreçte önemli etkisi olan Bcl-2 geni seçilmiştir. Bir anti-apoptotik gen olan Bcl-2 geninin kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonu sonucunda kanser hücrelerinin apoptozu engellenmekte, bu durumda hücrelerin sürekli bölünmesine ve kanserleşmeye neden olmaktadır. Bu sebeple bu genin susturulması yoluyla kanser hücrelerinin apoptoza yönelmesinin sağlanması kanser tedavisi için büyük önem taşımaktadır.

Etkili bir gen tedavisinin gerçekleştirilmesi için genetik materyalin hedef bölgeye taşınması çok önemli bir konudur. Bu amaçla kullanılan polimerik yapılar, kolay sentezleri ve esnek özellikleri nedeniyle gen materyallerini taşımada umut vaat eden adaylar olarak ortaya çıkmıştır. Bu polimerler arasında yer alan doğal katyonik özelliğe sahip kitosan gibi polimerler ise fizyolojik pH'da elektrostatik çekim yoluyla genetik materyal ile rahatlıkla konjoge olabilmekte ve böylece gen iletimini kolaylaştırmaktadır. Bunun dışında diğer önemli bir nokta da hazırlanan sistemin normal dokulara zarar vermeden sadece hedeflenen bölgeye gidebilmesidir. Bu sebeple de nanopartiküler sistemlere çeşitli hedefleme molekülleri eklenebilmektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda genetik materyali taşımak için kitosan nanopartiküller hazırlanması ve nanopartiküllerin aktif olarak hedeflemek için de insan vücudunda bulunan iyi kolesterol olarak bilinen HDL partiküllerinin kullanılması amaçlanmıştır. HDL'yi tercih etmemizin nedeni, HDL'ye özgün reseptörün (SRB1) karaciğer kanser hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese olmasıdır.

Sonuç olarak bu çalışmadaki amacımız karaciğer kanser hücrelerini apoptoza götürebilecek yüzeyi HDL modifiyeli, siRNA-Bcl-2 yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlamak ve *in vitro* değerdendirmelerini yapmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknolojinin Tanım ve Tarihi

Atom ve moleküler düzeyde gerçekleşen olaylar bilim insanları için her zaman heyecan verici bir konu olmuştur. Yapılan araştırmalar sonucunda toplanan veriler bir bilim dalı olarak nanoteknolojinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Nanoteknoloji bir terim olarak ilk kez 1974 yılında Tokyo Bilim Üniversitesi profesörü Norio Tanaguchi tarafından tanımlanmıştır. Norio Tanguchi'ye göre: Nanoteknoloji, malzemelerin bir atom veya bir molekül tarafından ayrılması, konsolidasyonu ve deformasyonu işlemlerini içermektedir (Taniguchi, Arakawa ve Kobayashi, 1974). Nanoteknolojinin günümüzde kabul gören tanımı, ilk kez Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI) tarafından yayınlanmıştır. Bu tanıma göre nanoteknoloji yaklaşık 1 ila 100 nanometre boyutunda yürütülen bilim, mühendislik ve teknolojidir (National Research Council, 2006).

2.2. Nanoteknolojinin Uygulanma Alanları

Günümüzde dünya genelinde farklı alanlarda çeşitli nanoteknoloji araştırmaları yapılmaktadır. Bu araştırmalar zamanla farklı bilim dallarının birbirine yaklaşmasına ve bir iş birliği yapmasına neden olduğu için, çok branşlı bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Son dönemlerde özellikle başta tıp, gıda bilimi, biyoloji, kimya olmak üzere tekstil endüstrisi, kozmetoloji, suyun temizlenmesi ve elektronik gibi alanlarda çarpıcı gelişmelere olanak sağlayan ve gelişmekte olan bir alandır.

2.2.1. Tıpta nanoteknoloji

Tıp alanında nanoteknolojinin uygulanabilmesi sonucu nanotıp isimli yeni bir tıp dalı ortaya çıkmıştır. Nanotıbbın dünya genelinde herkes tarafından kabul görmüş tek bir tanımı bulunmamakla birlikte farklı kuruluşlar tarafından farklı biçimde sunulan birkaç nanotıp tanımına rastlanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Nanoteknoloji Girişimi (NNI) “*Nanotıbbı, nanoteknolojinin tıba uygulanması*” olarak tanımlarken (Boisseau ve Loubaton, 2011) Avrupa Teknoloji Platformu’nun raporunda “*Nanotıp, nanoteknolojinin sağlık için uygulanmasıdır ve nanometrik ölçekte malzemelerin geliştirilmiş yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini kullanır*” şeklinde tanımlamaktadır. Nanotıbbın hastalıkların önlenmesi, erken ve güvenilir tanısı ve tedavisi üzerinde potansiyel etkisi vardır (Commission européenne, 2005). Avrupa Bilim Vakfı’da bu alanı “*Nanotıp, moleküler araçlar ve insan vücudunun moleküler bilgisini kullanarak, hastalık, travmatik yaralanma, ağrıyı hafifletmenin yanı sıra, insan sağlığını koruma ve iyileştirme için bilim*

ve teknolojinin kullanıldığı bir alandır” ifadesiyle tanımlamıştır (European Science Foundation, 2005).

Nanotıp, nanodiagnostikler, rejeneratif tıp, ilaç taşınma ve kontrollü salınım olmak üzere birbiriyle ilişkili üç alt alanı kapsamaktadır.

2.2.1.1. Nanodiagnostikler ve rejeneratif tıp

Nanodiagnostikler, tek hücre ve moleküler seviyelerde tanıyı mümkün kılarken biyopsi gibi mevcut moleküler teşhis yöntemlerine dahil edilerekte kullanılabilir. Bu amaç için, altın nanopartikülleri, manyetik nanopartiküller ve kuantum noktaları en çok kullanılan nanodiagnostikler arasındadır. Nanopartiküllerin yanısıra nanoteknolojik cihazlar ve nanobiosensörler de teşhis ve görüntüleme amaçlı potansiyel klinik uygulamalar için ümit vaatmektedir (Jain, 2007).

Rejeneratif tıp, doku mühendisliği, moleküler biyoloji, biyomateryaller ve kök hücre biyolojisinden yararlanarak hasarlı veya hastalıklı hücreleri, dokuları veya organları yeniden oluşturmak, onarmak veya değiştirmek için yöntemler geliştirmeyi amaçlamaktadır. İnsan dokuları nano ölçekli bir yapıya sahip olduğu için, nanoteknolojideki ilerleme ile nano ölçekteki insan doku ve organlarının bileşenlerini ve yapısını taklit edilecek malzemeler geliştirilebilmesine katkı sağlamıştır (Yang vd., 2019). Özellikle son yıllarda kök hücre araştırma ve geliştirmesindeki ilerlemelere nanoteknolojinin katkısı çok büyüktür. Örneğin, kök hücrelerin izole edilmesi, görüntülenmesi izlenmesi ya da bu hücrelere gen veya ilaç aktarımı için çeşitli manyetik nanopartiküllerin (MNP), kuantum noktaların (Quantum dots; QDs) karbon nanotüplerin (CNT'ler), kullanımları başarıyla sonuçlanmıştır (Wang, Ruan ve Cui, 2009).

2.2.1.2. İlaç taşınma ve kontrollü salınım

İlaç geliştirmede nanoteknolojinin kullanımı hızla genişleyen bir alandır. Bu alanda ilacı daha az dozda kullanarak gereken etkiye ulaşmak, ilacın hasta organ dışında başka organlara giderek onlara zarar vermesini engellemek, ilacın vücutta salım süresini uzatmak, salım hızını kontrol altına almak gibi önemli konular nanoteknolojinin kullanıldığı başlıca alanlardır.

Nanoteknoloji uygulamaları bu alanlarda aşağıda gösterilen avantajları sunmaktadır (Farokhzad ve Langer, 2009; Duggal, 2011).

- Suda çözünürlüğü az olan ilaçların taşınması
- Sıkı epitelyal ve endotelyal bariyerlerden ilaçların geçişi
- Büyük makromolekül ilaçların hücre içi etki alanlarına ulaştırılması
- Kombinasyon tedavisi ile iki veya daha fazla ilacın birlikte uygulanması
- Terapötik ve görüntüleme ajanlarının birlikte ilaç dağıtım alanlarında görselleştirilmesi
- Terapötik bir maddenin, gerçek zamanlı *in vivo* etkinliğini değerlendirmek.
- Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak ilaçların hedef organ, doku veya hücrelere aktarılması
- İlaç taşıyıcı sistemlerde gerçekleştirilen bazı modifikasyonlar ile immün reaksiyonun engellenmesi
- Biyoyararlanımın artırılması
- Doz orantısı
- Azalmış toksisite
- Daha düşük dozaj formu
- Kararsız ve düşük biyoyararlanıma sahip ilaçların nanopartikül halinde stabil formlarının oluşturulması
- Aktif madde yüzey alanı artışı gibi.

2.3. Gen Tedavisinin Tanımı

Gen tedavisinin ortaya çıkması, moleküler biyoloji ve genetik alanındaki gelişmelere dayanmaktadır. Moleküler biyoloji ve genetik alanında olağanüstü öneme sahip olan insan genom projesi (Human Genome Sequencing Project), insan gen diziliminin ortaya çıkmasını sağlamıştır. İnsan gen dizisinin haritalanması sayesinde hastalıklar moleküler düzeyde incelenebilmiş ve genlerdeki değişikliklerin hangi hastalığa neden olabileceği belirlenebilmiştir.

Birçok hastalığın kökeni hatalı üretilen ya da üretilemeyen genlere dayanmaktadır. Örneğin, hücreler belirli proteinleri aşırı eksprese edebilir veya kontrolsüz hücre bölünmesine yol açan işlevsel olmayan proteinler üretebilmektedir. Gen terapisinin amacı normal gen ürünlerinin üretilmesini sağlamak ya da istenmeyen gen ürünlerini kodlayan genleri susturmaktır (Lasic, 2000). Genel anlamıyla gen tedavi tekniği, “kalıtsal hastalığa neden olan anormal bir geni tedavi etmek için normal ve işlevsel bir genin, bireyin hücrelerine ve dokularına transferine dayanmaktadır (Kelly, 2007).

2.4. Gen tedavi şekilleri

Gen tedavisi, nakil yapılan hücre tipine göre ya da hastaya uygulama yoluna göre farklı şekillerde gerçekleştirilebilmektedir.

Tedavi edilen hücre tipine bağlı olarak, iki farklı tür gen tedavisinden söz edilmektedir. Bunlar;

Somatik gen terapisi: Genetik materyalin, vücudun sperm veya yumurta hücresi üretmeyen herhangi bir hücrelerine aktarılmasıdır. Bu gen terapisinin etkileri hastanın çocuklarına geçmemektedir. Günümüzdeki yasal düzenlemelere göre sadece somatik gen tedavisine izin verilmektedir.

Germline gen terapisi: Bir gen dizisinin yumurta veya sperm üreten hücrelere aktarılması işlemidir. Gen terapisinin etkileri, hastanın çocuklarına ve sonraki nesillere aktarılmaktadır (http-1).

Hastaya uygulama şekli açısından ise gen terapisi iki kategoriye ayrılabilir;

Ex vivo, dış anlamına gelir. Bu tedavi şeklinde, hücreler vücut dışına çıkarılarak, dışarıda modifiye edildikten sonra tekrar vücut içine nakledilmektedir. Bu tedavi şeklinin klinik denemelerinde, hastanın kan veya kemik iliği hücreleri, laboratuvarı çıkartılmakta ve büyütülmektedir. Hücreler, istenen geni taşıyan virüse maruz bırakıldıktan sonra, virüs hücrelere girer ve istenen geni hücrelerin DNA'sına yerleştirir. Daha sonra hedef geni taşıyan bu hücreler laboratuvarı çoğaltılmakta ve damar içine enjeksiyonla hastaya geri aktarılmaktadır.

In vivo, yani iç kısım anlamına gelir. Bu tedavi şeklinde, hücreler vücut dışına çıkartılmaz. Genetik materyal, direk vücut içindeki hücrelere doğrudan bir enjeksiyon ile aktarılmaktadır (http-2).

2.5. Antisens Teknolojisi

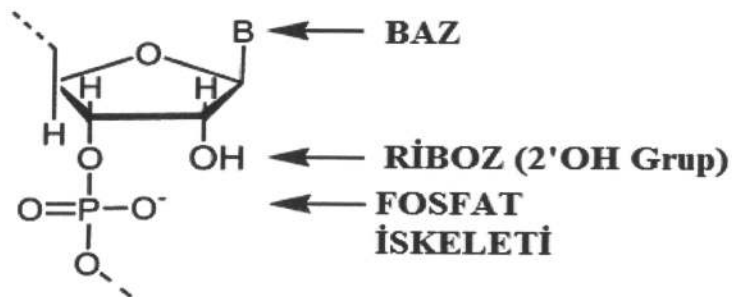
Bazı hastalıklar, belirli bir genin aşırı ekspresyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu yüzden gen ekspresyonunu DNA ve RNA düzeyinde azaltabilecek ilaçlara gereksinim duyulmaktadır. Antisens Teknolojisi, gen ekspresyon seviyesini değiştirmeye yönelik önemli bir yaklaşımdır. Bu teknolojinin gelişimi, Stephenson ve Zamecnik tarafından oligonükleotidlerin, *Rous sarcoma* virüsüyle (RSV) enfekte olmuş fibroblast hücre kültürlerine verildiği zaman, bu virüsün üremesinin inhibe olduğunun gözlemlenmesiyle başlamıştır (Stephenson ve Zamecnik 1978). Antisens bazlı teknolojilerin kullanılmasıyla gen

ekspresyonu düzeyindeki değişiklikler, transkripsiyon sonrası aşamada gerçekleşir. Antisens yaklaşımı, ilgi mRNA'ya veya viral RNA 'ya tamamlayıcı olan oligonükleotitlerin, hücrelere verilmesini içerir. Bu oligonükleotitler hedef RNA'yı bulma ve ona bağlanma özelliklerine sahiptirler. Bu bağlanma veya hibridizasyon, ya mRNA'nın parçalanması ya da translasyon işleminin kritik adımlarının bloke edilerek, protein ekspresyonunun bastırılmasıyla sonuçlanır (Dallas ve Vlassov, 2006). Genlerin genetik mesajlarının bu yollarla kısmen ya da tamamen ortadan kaldırılması “knock-down” veya “knock-out” olarak adlandırılır (“IDTutorial. Antisense Technologies”, 2005).

Üç tip anti-mRNA stratejisi vardır. Bunlardan ilki, tek sarmallı antisens oligonükleotitlerin kullanımıdır. İkincisi, ribozimler olarak adlandırılan katalitik olarak aktif oligonükleotitler yoluyla RNA bölünmesinin tetiklenmesidir. Üçüncü strateji ise, 21-23 nükleotidlik küçük RNA moleküllerinin kullanıldığı interferans stratejisidir. (Kurreck, 2003).

2.5.1. Antisens oligonükleotidler (AS-ON)

AS-ON'ler genellikle hedef mRNA'larına tamamlayıcı olan 13-25 nükleotitten oluşan dizilerdir. AS-ON'lerin doğal (modifiye edilmemiş) ve kimyasal olarak modifiye edilmiş olan iki türü vardır. AS-ON'lerin ilk *in vivo* uygulamaları, modifiye edilmemiş AS-ON'ler kullanılarak yapılmıştır. Bu fosforiboz omurgalı fosfodiester AS-ON'lerin (Şekil 2.1.) kullanımı, hücre içi endonükleazlar ve eksonükleazlar tarafından hızlı bir şekilde bozundukları için sınırlıdır. Bundan başka parçalanma ürünlerinin sitotoksik etkileri olması ve hücre alımlarının düşük olması gibi istenmeyen özelliklere de sahiptirler (Dias ve Stein, 2002). Bu sorunların giderilmesi için AS-ON'lere bazı kimyasal modifikasyonlar yapılmıştır. Özellikle fosfat omurgaları ve riboz halkaları kimyasal modifikasyonların yapılması için kullanılabilir hedef bölgelerdir (DeVos ve Miller, 2013). Bu bölgelerde yapılan modifikasyonlar sonucu 3 tür AS-ON geliştirilmiştir.

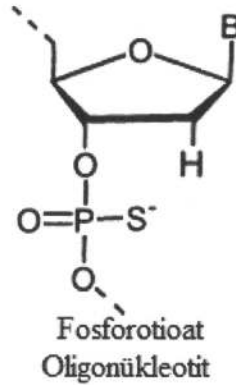


Şekil 2.1. Fosfodiester Oligonükleotit (Şenel, 2012)

2.5.1.1. Birinci sınıf modifiye AS-ON'ler

Bunlar, fosfat omurgasında yer alan oksijen atomlarından birinin, bir sülfür atomu ile değiştirilmesiyle sentezlenen fosforotioatlar ya da bir oksijen atomunun bir metil grubu ile değiştirilmesi suretiyle hazırlanan metilfosfonatlardır (Şekil 2.2.) (Kher, Trehan ve Misra, 2011). Fosforotioatlar, nükleazlara karşı dirençli olması ve sentezlerinin nispeten kolaylığı nedeniyle, en çok çalışılan oligonükleotitlerdir. Yapılan modifikasyonlar sonucu, bu fosforotioat oligonükleotitlerin çözünürlükleri ve nükleazlara karşı stabilitelerinin arttığı görülmüştür (Kurreck, 2003). Modifiye edilmemiş AS-ON'lerin serumdaki yarı ömürleri 1 saattir. Fakat Campbell vd., tarafından yapılan deney sonucunda, fosforotioatların insan serumunda yarı ömürlerinin 9.4 ± 1.2 saate kadar uzamış olduğu gözlemlenmiştir (Campbell, Bacon ve Wickstrom, 1990). Modifikasyon yapılması sonucunda fosforotioatların antisens etkilerinin arttığı da gözlenmiştir. Fosforotioatların antisens etkileri RNaz-H aktivitesine dayanmaktadır. RNaz-H mekanizmasıyla oluşan antisens etki şu şekilde özetlenebilir; oligonükleotitler hedef mRNA'ya bağlandıktan sonra oluşan çift iplik, RNaz-H enzimi için bir substrat olarak kullanılmakta ve bundan sonra RNaz-H, oligonukletidle bağlanmış bölgeden mRNA zincirini kesmektedir. Bu işlem sonucunda hedef mRNA kırıldığı için translasyon aşaması gerçekleşmemektedir (Şekil 2.5.).

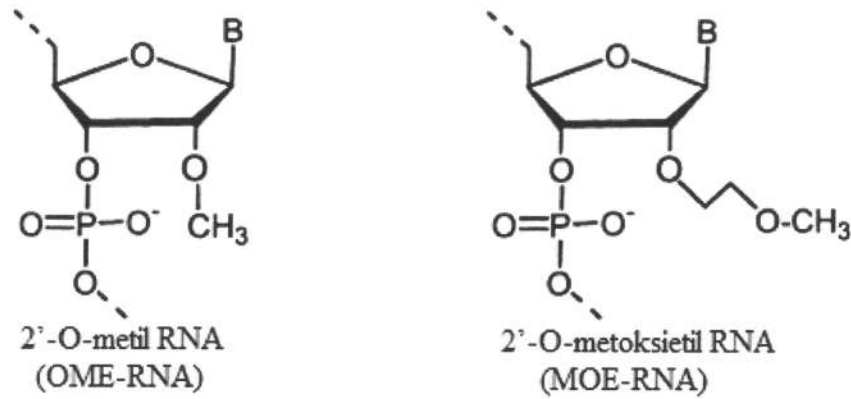
Yukarıda bahsedilen avantajların yanı sıra, fosforotioatların belirli proteinlere spesifik olmayan şekilde bağlanarak yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilerinin olduğu bulunmuştur.



Şekil 2.2. Fosforotioat Oligonükleotit (PS) (Kurreck, 2003)

2.5.1.2. İkinci sınıf modifiye AS-ON'ler

Bu sınıf, riboz şekerinin 2' pozisyonunda 2'-O-metil (OME) ya da 2'-O-metoksietil ile alkil modifikasyonları yapılarak oluşturulan RNA nükleotidleridir. Bu modifikasyonlar sırasıyla 2'-O-metil RNA (OME-RNA) ve 2'-O-metoksietil RNA (MOE-RNA) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.3.). Yapılan bu alkil modifikasyonları sonucu bu oligonukleotidlerde, fosforotiyoat AS-ON'lerde olan, spesifik olmayan proteinlerle bağlanma ve sitotoksiste gibi sorunlar ortadan kaldırılmıştır. İkinci sınıf modifiye AS-ON'ler, nükleazlara karşı fosforotiyoatlardan daha dirençlidir (Crooke, 2004). Bununla birlikte, bu oligonükleotitlerle ilişkili ana dezavantajlar, zayıf eliminasyon özellikleri ve RNAz-bağımsız antisens etki mekanizmasıdır (Kher, Trehan ve Misra, 2011). Bu oligonükleotitlerin etki mekanizmaları Baker vd., tarafından araştırılmıştır. Yaptıkları çalışmada hücreler arası adhezyon molekül 1'in (ICAM-1) gen ifadesini, 5'-cap bölgesine karşı hedeflenmiş bir 2'-O-metoksietil RNA kullanarak etkili bir şekilde susturmayı başarmışlardır. Bu deney sonucu, bu ajanların RNAz bağımsız antisens etki gösterdiğini ve etkilerinin büyük olasılıkla, 80S translasyon başlatma kompleksinin oluşumuna seçici müdahalesi nedeniyle gerçekleştiğini göstermiştir (Kurreck, 2003).



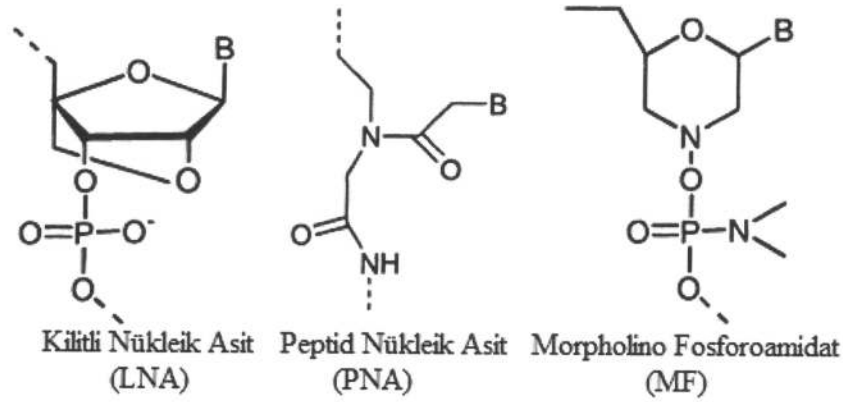
Şekil 2.3. İkinci sınıf modifiye AS-ON'ler (Kurreck, 2003)

2.5.1.3. Üçüncü sınıf modifiye AS-ON'ler

AS-ON'lerin nükleaz stabilitesini, hedef afinitesini ve farmakokinetik profillerini geliştirmek için, modifikasyonlar yapılarak üçüncü sınıf AS-ON'ler geliştirilmiştir. Bu modifikasyonlar AS-ON'lerin furanoz halkalarının, fosfat bağlarının, ribozlarının, nükleotitlerinin kimyasal modifikasyonlarını içerir. Peptid Nükleik Asit (PNA), Kilitli Nükleik Asit (LNA) ve Morpholino Fosforoamidatlar (MF), en yaygın kullanılan üçüncü sınıf AS-ON'lerdir (Şekil 2.4.) (Mansoor ve Melendez, 2008). Bunlardan üzerinde en çok çalışılan

PNA'lardır. PNA'lar ilk kez Nielsen vd., tarafından sentezlenmiştir. Bu oligonukleotidlerde, şeker fosfat omurgası, tekrarlayan N-(2-aminoetil) glisin birimlerini içeren poliamid bağları ile tamamen değiştirilmiştir. Bu poliamid bağları, metilen karbonil bağlayıcıları ile nükleobazlara bağlanmıştır (Nielsen vd., 1991).

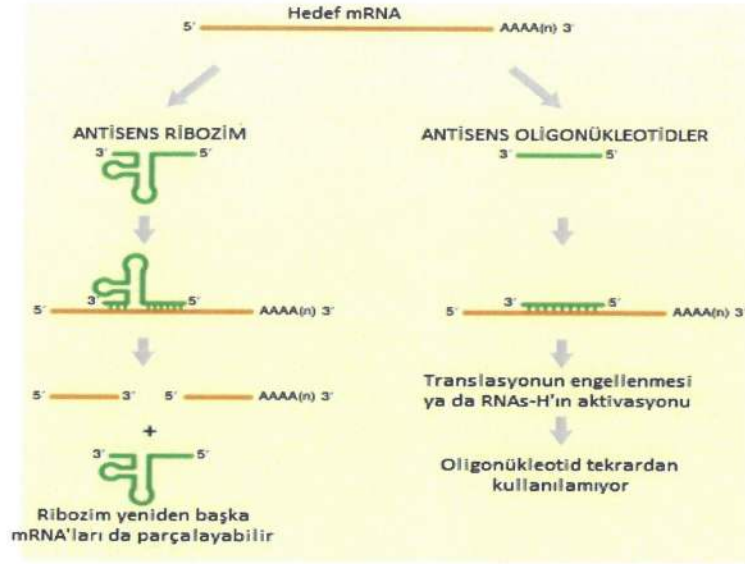
Üçüncü nesil AS-ON'ler, biyolojik sıvılarda nükleazlar ve peptidazlar tarafından parçalanmaya karşı daha dirençli olduklarından daha yüksek stabiliteye sahiptir. Ayrıca, mRNA ile güçlü bir hibridizasyon afinitesi sergilerler. Elektrostatik olarak nötr omurgalarından dolayı, polianyonları bağlayan serum proteinlerine bağlanmazlar fakat bu yüksüz omurgaları onların çözünürlüklerini ve hücre alımını zorlaştırır. Üçüncü sınıf modifiye AS-ON'ler, RNAz'dan bağımsız etki gösterirler. Antisens etkilerini, genellikle sterik engelleme araçlı yaparlar ve hem RNA hem de transkripsiyon faktörlerine bağlanabilirler (Mansoor ve Melendez, 2008).



Şekil 2.4. Üçüncü sınıf modifiye AS-ON'ler (Kurreck, 2003)

2.5.2. Ribozimler

Ribozimler, katalitik aktiviteye sahip RNA molekülleridir. Diğer bir deyişle bir çeşit enzimlerdir. Ribozimler, hedef mRNA ile aynı ortama koyulduklarında, hedef ile baz çifti oluşturur ve hedef mRNA'yı iki parçaya bölerler. Hedef mRNA'nın bu iki yarısı diğer enzimler tarafından daha küçük parçalara bölünür ve böylece hedef mRNA'nın translasyonu durdurulur (Şekil 2.5.). AS-ON'lerin tersine ribozimler, mRNA'yı parçaladıktan sonra kendilerini parçalamazlar ve antisens özelliklerini korurlar (Clark ve Pazdernik, 2016).



Şekil 2.5. Ribozimlerin ve Oligonükleotidlerin etki mekanizmaları (Clark ve Pazdernik, 2016)

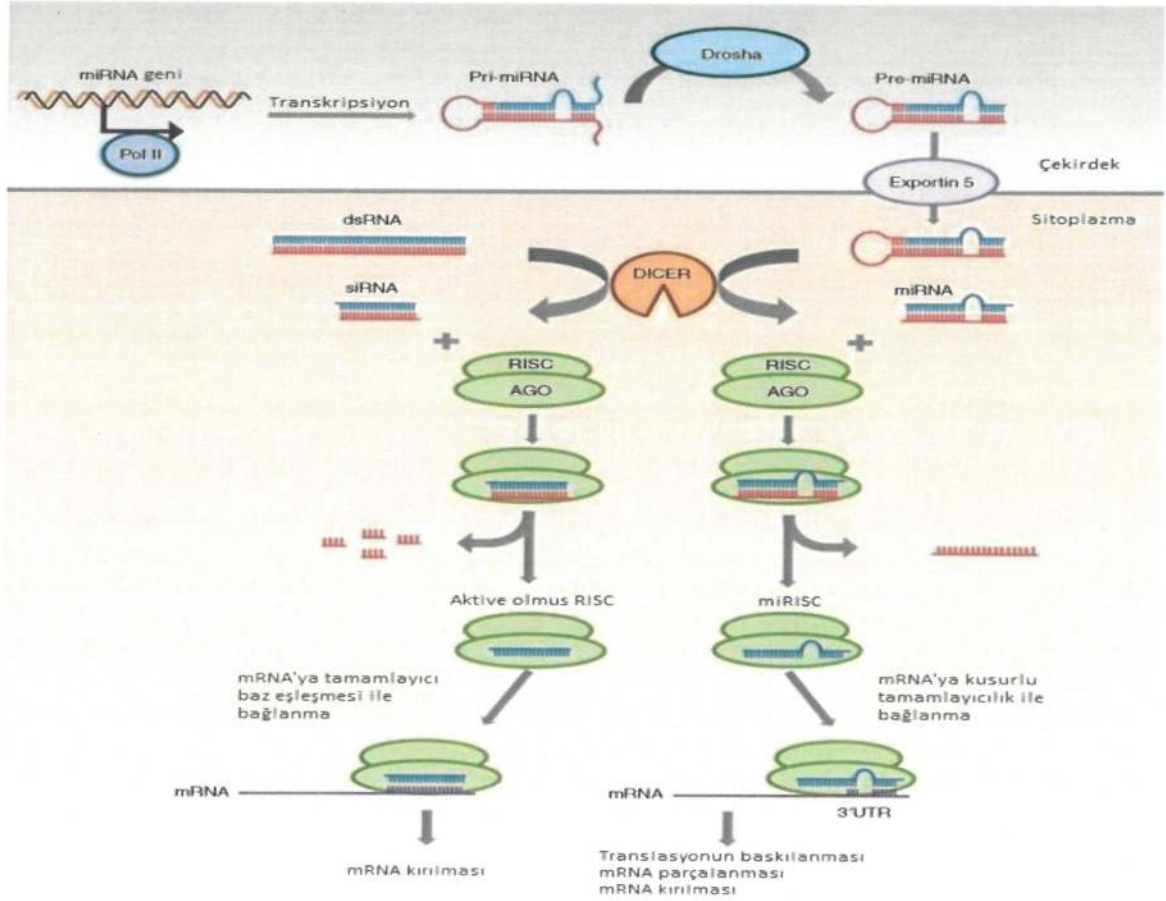
2.5.3. RNAi mekanizması

RNA interferans (RNAi), gen ifadesini susturmak için hücrelerde bulunan doğal bir mekanizmadır. Bu eski hücrel antiviral tepki, AIDS ve hepatit gibi hastalıklara neden olan genler dahil olmak üzere, seçilen herhangi bir hedef genin fonksiyonunun, spesifik bir şekilde inhibe edilmesi için kullanabilmektedir (Downward, 2004). RNAi fenomeni ilk kez Andrew Fire, Craige Mello vd., tarafından 1998 yılında nematod solucanında (*Caenorhabditis elegans*) keşfedilmiştir. *Caenorhabditis elegans*'a çift iplikli RNA (dsRNA) enjekte edildiği zaman, bu çift iplikli RNA sekansına komplementer olan genin ekspresyonunun susturulduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma sonucunda RNAi mekanizması tam olarak açıklanamamıştır, fakat organizmaların, bu mekanizmayı gen susturması için kullanabilecekleri düşüncesi ortaya atılmıştır (Fire vd., 1998). Bu alanda daha sonra yapılan çalışmalar sayesinde RNAi mekanizmasıyla genin nasıl susturulduğu ortaya çıkarılmıştır.

RNAi mekanizmasının siRNA ve miRNA olarak iki önemli molekül bulunmaktadır. siRNA'lar ve miRNA'lar birbirine benzer moleküllerdir, örneğin her ikisi de, mRNA'yı hedefleyerek transkripsiyon sonrası seviyede gen susturma etkileri sergileyen kısa çift iplikli RNA molekülleridir, ancak etki mekanizmaları ve klinik uygulamalar farklıdır. siRNA'lar ve miRNA'lar arasındaki en büyük fark, birincisinin sadece bir mRNA hedefi ile oldukça spesifik olmasıdır, ikincisi ise çoklu hedeflere sahiptir. Bu nedenle siRNA'ların ve miRNA'ların terapötik yaklaşımları çok farklıdır (Şekil 2.6.) (Lam vd., 2015).

RNAi'nin siRNA yolağıyla gerçekleşmesi, iki aşamadan oluşur. Birinci aşamada, hücreye girmiş viral genlerden, transgenlerden ya da hücrenin kendi genlerinden üretilen dsRNA'lar, RNase III enzimi Dicer tarafından, küçük engelleyici RNA (small interfering RNA, siRNA)'lara parçalanır. Oluşan bu siRNA'lar, 21-23 nükleotid uzunluğunda, ipliklerinin 3'-hidroksil uçlarında 2-3 nükleotidlik çıkıntı bulunan, çift iplikli yapılardır. siRNA'lar, ikinci aşamada, RNA tarafından uyarılan sessizleştirme kompleksi (RNA-induced silencing complex: RISC) ile etkileşirler. RISC kompleksine bağlanmış çift iplikli siRNA, RISC'nin temel bileşeni olan Argonaute proteini (Ago2) tarafından bir ipliği çıkarılarak tek iplikli siRNA'ya dönüştürülür. Bu tek iplikli siRNA, RISC'in içinde rehber görevi yaparak, komplementer olduğu mRNA'ya, RISC'nin bağlanmasını sağlamaktadır. mRNA'ya bağlanan RISC kompleksi, mRNA'yı birkaç bölgeden keser ve sonuç olarak genin ifadesi susturulmuş olur (Fire vd., 1998; Novina ve Sharp, 2004; Hannon, 2002; Tan, Yang ve Ji, 2009; Kim ve Rossi, 2007; Clark ve Pazdernik, 2016).

RNAi'nin ikinci yolağı miRNA yolağıdır. miRNA'lar 20-30 nükleotid uzunluğunda olan yapılardır. miRNA, hücre çekirdeğinde RNA polimeraz II ya da III (Pol II, Pol III) tarafından transkribe olur. Bu transkripsiyon sonucunda, yaklaşık 85 nükleotid uzunluğunda olan iplik ortaya çıkar ve bu iplik katlanarak, kendi nükleotidleri arasında oluşan baz çiftleşmesi sonucu, primer miRNA (pri-miRNA) oluşur. Bu pri-miRNA'ların baz çiftleşmesi kusurludur, şöyle ki bazı bazlar tamamlanamaz ve bazlar pri-miRNA yapısında halka şeklindeki çıkıntılar oluşur. Sonra bu pri-miRNA'ların kuyruk kısımları, RNaz III enzimi Drosha, tarafından kesilir ve yaklaşık 65-70 nükleotid uzunluğunda precursor miRNA (pri-miRNA)'lar oluşur. Çekirdekdeki bu pre-miRNA'lar, Exportin-5 tarafından sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada Dicer enzimi pre-miRNA çift ipliğinin uç kısmındaki halkayı keser ve bundan sonra miRNA, RISC kompleksine bağlanır. RISC kompleksinin içinde olan Ago2 tarafından, miRNA çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya dönüştürülür. Bu tek iplikli miRNA, RISC kompleksini ilgili mRNA'ya hedefler. Hedef mRNA ile miRNA arasındaki tamamlayıcı bağlanma, miRNA ve hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesinde gerçekleşir. Böylece protein translasyonu engellenmiş olur. (Novina ve Sharp, 2004; Tan, Yang ve Ji, 2009; Kim ve Rossi, 2007; Clark ve Pazdernik, 2016; Wilson ve Doudna, 2013).



Şekil 2.6. RNAi, siRNA ve miRNA yolları (Lam vd., 2015).

2.6. Genetik Materyalin Hücre İçine Taşınması

Genetik materyallerin hücre içine taşınmasında kullanılan taşıyıcılara vektör adı verilir. Genetik materyaller vektörler olmadan, çıplak olarak uygulandığı zaman parçalandıkları için, etkinlikleri düşüktür. Bu yüzden genetik materyal taşınmasında vektörlerin kullanımı tercih edilmektedir. Genetik materyal taşıyan vektörler viral ve non-viral olarak ikiye ayrılmaktadır (Nayerossadat, Maedeh ve Ali, 2012).

2.6.1. Viral vektörler

Viral vektörler, genel olarak genomlarının, konakçıya aktarmak için gereken yapısal özelliklerinin korunması ve gerekli olmayan genlerinin çıkarılmasıyla oluşturulur (Huang vd., 2011). Viral vektör genomlarının bazı bölgelerinin çıkarılarak modifiye edilmesi, onların replikasyonlarını engeller ve onları daha güvenli hale getirir. Viral vektörler, istenen uygulamaya göre modifiye edilebildikleri için, hücrelere hedefleme ve verimli bir şekilde hücrelere girmeleri açısından avantajlıdır (Misra, 2010).

Adenovirüsler (Ad), Adeno-İlişkili Virüsler (AAV), Herpes virüs (HSV) ve Retro-virüsler güvenlik ve biyolojik fonksiyonlarından dolayı, gen terapisi ürünlerinin taşınmasında en yaygın kullanılan vektörlerdir (Misra, 2010).

2.6.1.1. Adenovirüs (Ad) vektörleri

Adenovirüs genomu, yaklaşık 36 kb'lik doğrusal, çift sarmallı DNA'dan oluşur. Gen terapisinde kullanılmak üzere Adenovirüs tip 2 ve 5 (sırasıyla Ad 2 ve Ad 5) geliştirilmiştir. Early 1 (E1, *Erken* 1) geni, adenoviral replikasyon için gerekli bir gen bölgesidir. Adenoviral genomun, E1 kodlayan bölgesinin çıkarılmasıyla yapılan modifikasyon, gen eklemeleri için yeterli alan sağlamakta ve replikasyonu bozuk olan bir vektör oluşturmaktadır (Hao, Mata ve Fink, 2007).

Shen ve ekibi p53 gen ekspresyonunu susturmak için adenovirüs vektörlerini siRNA taşıyıcısı olarak kullanarak, bu genin meme kanseri (MCF7) ve akciğer kanseri hücrelerinde (A549) etkili bir biçimde susturulmasını başarmıştır (Shen vd., 2003). Adenovirüs vektörleri yabancı DNA'yı hedef hücrelere sokmak için oldukça etkili oldukları ve özünde konakçı bağışıklık tepkilerini indükledikleri için yaygın olarak aşılarda taşınmasında kullanılmaktadır. Ayrıca kanser tedavisi için de umut verici viral vektörlerdir (Chen, Keiser, ve Davidson, 2018).

2.6.1.2. Adeno-İlişkili Virüs (AAV) vektörleri

Adeno-ilişkili virus, 4,8 kb genomlu tek sarmallı bir DNA virüsüdür. AAV vektörleri en aktif olarak araştırılan gen terapi araçlarından biridir (Naso vd., 2017). AAV vektörlerinin özellikleri adenoviral vektörler gibidir fakat replikasyonları ve patojenikleri açısından, adenoviral vektörlerden daha güvenlidir. İnsanda, AAV'ler herhangi bir patojenik etkiye neden olmamaktadır. AAV vektörleri, uzun süreli ekspresyon sağlama özelliğine sahiptirler. Bu vektörlerin en büyük dezavantajları, karmaşık vektör üretimi süreci ve sınırlı transgen kapasitesidir (Nayerossadat, Maedeh ve Ali, 2012).

Tomar vd., AAV bazlı vektörleri siRNA taşınması için kullanmıştır ve HeLa S3 hücrelerinde p53 ve kaspaz 8 genlerinin ekspresyonunun azaltılması başarılmıştır (Tomar, Matta ve Chaudhary, 2003).

2.6.1.3. Herpes Simpleks Virüs (HSV) vektörleri

Herpes simpleks virüsü (HSV), 152 kilobaz (kb)'lık çift sarmallı DNA içeren genomu sahip bir virüstür (Hermens ve Verhaagen, 1998). HSV vektörleri, genetik materyalin hücrelere aktarılması için verimli araçlardır. Onları avantajlı kılan özellikler arasında genetik materyal taşıma kapasitelerinin büyük olması, geniş bir konak hücre aralığına sahip olmaları, oldukça bulaşıcı olmaları ve bölünmeyen hücreleri enfekte ederek, onlarda gen verimli ekspresyonunu sağlamalarıdır (Burton, Fink ve Glorioso, 2002).

Sabbioni vd., memeli hücrelerine siRNA iletimi için Herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1) bazlı amplikon vektörünü kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda, amplikon vektörünün kullanılması siRNA moleküllerinin iletiminde oldukça etkili olduğu, amplikon vektörlerin BKV T-Ag ekspresyonunu ve BKV ile transforme edilmiş hücrelerin tümörjenitesini inhibe ettiği görülmüştür (Sabbioni vd., 2007).

2.6.1.4. Retrovirüs vektörleri

Retrovirüs vektörünün genomu her biri 7-10 kb tek iplikli olan iki özdeş kopya RNA'dan oluşur (McTaggart ve Al-Rubeai, 2002). Konakçı hücrelere entegre olduktan sonra, hücredeki ters transkriptaz enzimlerini kullanarak kendi RNA'sını DNA'ya dönüştürürler. Bu DNA daha sonra konakçı hücrenin genomuna bir entegraz enzimi aracılığıyla dahil edilir ve konakçı hücrenin DNA'sının bir parçası olarak çoğalır. Bu yüzden kullanımları uzun süreli gen ekspresyonu sağlamaktadır (Misra, 2010). Bu vektörler gen terapisi uygulamaları için bir avantaj olan geniş bir konakçı hücre aralığına sahiptir (McTaggart ve Al-Rubeai, 2002).

Braton vd., tarafından geliştirilen retrovirüs vektörleri siRNA taşınmasında kullanılmıştır ve hücrelerde hedeflenen gen başarıyla susturulmuştur (Barton ve Medzhitov, 2002). Devroe vd., insan Nükleer Dbf2-İlişkili (NDR) kinazını hedeflemek için bir retrovirus vektörü kullanmıştır. Bu Anti-NDR siRNA virüsü ile enfekte olan hücrelerde, NDR ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı, oysa kontrol virüslerinin toplam NDR üzerinde etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Devroe ve Silver, 2002).

Retroviral vektörlerin ana sınırlamaları, *in vivo* düşük etkinlikleri, immünojenik problemleri, bölünmeyen hücrelerin transdüksiyonunun yapılamaması ve onkojen aktivasyonuna veya tümör baskılayıcı gen inaktivasyonuna neden olabileme riskleridir (Nayyar, Maedeh ve Ali, 2012).

2.6.2. Non-viral vektörler

Gen terapisi alanında viral vektörlerin kullanımı, her ne kadar avantajlar sağlasada, kullanımlarında immünojeniklik, toksisite, sınırlı DNA paketleme kapasitesi, dolaşımdan hızla temizlenmeleri ve vektör üretiminin zorluğu gibi bazı sınırlamaları vardır. Bunların yanı sıra viral vektörler, mutajenez ve karsinogenez tetikleyebilmektedir. Viral DNA'nın kromozoma entegrasyonu ise tümör baskılama geninin ekspresyonunu bozabilir veya hücrelerin malign transformasyonuna yol açan onkogenin aktive olmasına yol açabilmektedir (Yin vd., 2014; Ramamoorth ve Narvekar, 2015; Liu ve Huang, 2002).

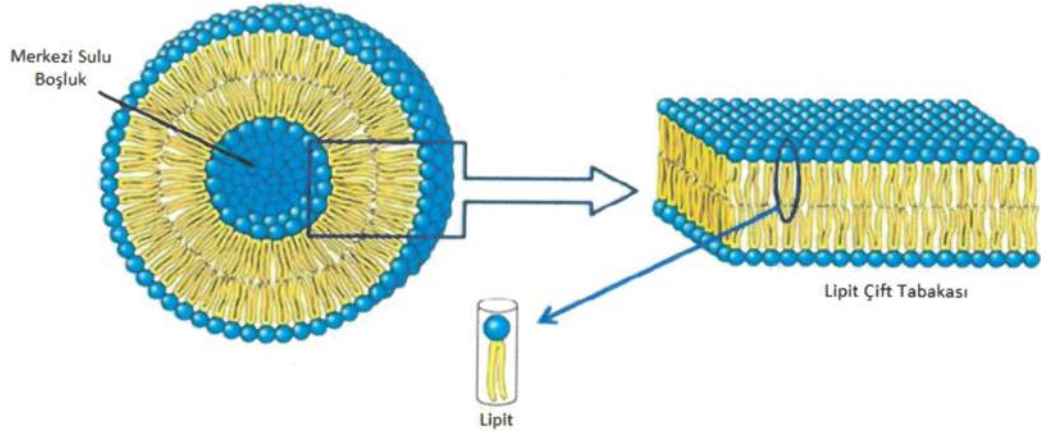
Viral vektörler kullanıldığında görülebilen bu dezavantajlar, non-viral vektörlerin kullanımında gözlemlenmediği için, non-viral vektörlerin kullanımı daha çok tercih edilmektedir. Bununla birlikte non-viral vektörler, düşük maliyet, üretim kolaylığı, fazla miktarda genetik materyal taşıyabilmeleri, toksik etkilerinin az olması (ya da hiç olmaması), immün yanıtlarının az olması (ya da hiç olmaması), gibi avantajlara da sahiptir. Spesifik bir immün tepkisi ortaya çıkarmamaları ve bu nedenle tekrar tekrar uygulanabilir olmaları da non-viral vektörlerin sağladığı diğer avantajlar arasındadır (Yin vd., 2014; Ramamoorth ve Narvekar, 2015; Schmidt-Wolf ve Schmidt-Wolf, 2003).

Günümüzde genetik materyal taşınması için çeşitli non-viral taşıyıcı sistemler geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. Bunlar arasında en geniş kullanılanlar lipidik ve polimerik taşıyıcı sistemlerdir (Thomas ve Klibanov, 2003).

2.6.2.1. Lipit bazlı vektörler

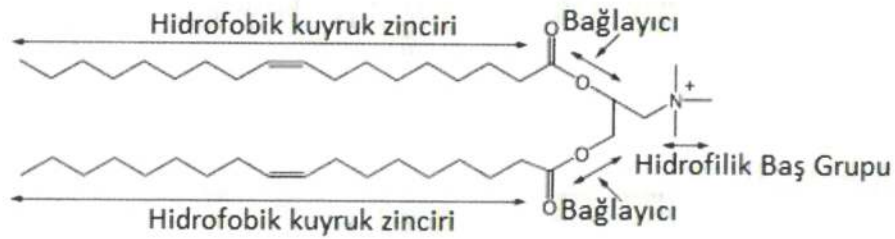
Lipozomlar

Lipozomlar, en kapsamlı araştırılan non-viral vektörlerdir. Kemoterapi ilaçları, oligonükleotidler, DNA, siRNA, antijenler ve proteinler dahil olmak üzere çeşitli molekülleri taşıyabilme kabiliyetleri, lipozomları, terapötik ajanların taşınmasında, en popüler sistemler haline getirmiştir (Ozpolat, Sood ve Lopez-Berestein, 2014). Lipozomlar, merkezinde bulunan sulu bölmelerinin, fosfolipit çift tabakası ile çevrelenmesinden oluşan küresel veziküllerdir (Şekil 2.7.) (Clark ve Pazdernik, 2016). Lipozomları oluşturan lipitler, hidrofilik baş ve hidrofobik kuyruk kısımlarından oluşurlar. Genetik materyal taşınmasında kullanılan lipozomların hazırlanması için katyonik ve nötr lipitler kullanılmaktadır.



Şekil 2.7. Lipozom (Roy ve Sahoo, 2015)

Kasyonik lipidler amfifilik moleküllerdir. Kasyonik lipidlerin hidrofilik baş (amin) kısmı pozitif yüke sahiptir. Hidrofobik kuyruk kısımları genellikle çift hidrokarbon zincirinden veya bir kolesterol türevinden oluşur ve bu iki bölge birbirine bir bağlayıcı aracılığıyla bağlanır (Şekil 2.8.) (Wasungu ve Hoekstra, 2006). Nükleik asitler negatif yüklü moleküller olduğu için, kasyonik lipidlerin pozitif yüklü baş kısmıyla elektrostatik etkileşime girerek lipozomun içine hapsolür. Kasyonik lipidlerin polar ve hidrofobik kısımları, hem transfeksiyon hem de toksisite seviyeleri üzerinde önemli etkilere sahiptir (Lv vd., 2006).



Şekil 2.8. Dotap örneğinin lipid yapısı (Lv vd., 2006)

İlk kez 1987'de, Felgner vd., tarafından genetik materyal taşınması için doğal olmayan, dieter bağlı kasyonik lipid, N- [1- (2,3-dioleyiloksi) propil] -N, N, N-trimetilamoniyum klorür (DOTMA) kullanılarak lipozomlar geliştirilmiştir. DOTMA içeren lipozomlar, DNA'nın %100 tutulmasıyla lipid-DNA kompleksleri oluşturmak için kendiliğinden DNA ile etkileşime girerler. DOTMA, kompleksin doku kültür hücrelerinin plazma

membranı ile füzyonunu kolaylaştırır ve DNA'nın hem alımı hem de ekspresyonunu sağlar (Felgner vd., 1987). DOTMA'nın kullanımından sonra [1,2-bis (oleoiloksi)-3-(trimetilamonyum) propan] (DOTAP), 3β [N- (N', N'-dimetilaminoetan)-karbamoil] kolesterol (DCChol), dioktadeslamidoglisilpermin (DOGS) gibi tek değerli ve 2,3-dioleyoksi-N- [2 (sperminkarboksamido) etil]-N, N-dimetil-1-propanaminyum trifloroasetat (DOSPA), Di-oktadesil-amido-glisil-spermin (DOGS) gibi çok değerli katyonik lipid bileşikleri de formülasyonların hazırlanmasında kullanılmıştır (Balazs ve Godbey, 2011). Genel olarak katyonik lipidler arasında en çok kullanılan DOTMA ve DOTAP'dır (Clark ve Pazdernik, 2016).

Genetik materyal taşınması için %100 DOTAP kullanımı, lipozom yüzeyindeki pozitif yüklerin yoğunluğundan dolayı verimsizdir. DOTAP, pH 7.4'te tamamen protonlanır (diğer tüm katyonik lipidler için geçerli değildir), bu nedenle DNA'yı lipopleksten ayırmak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulur ve dolayısıyla transfeksiyon zorlaşır. Bu nedenle, DOTAP'ın genetik materyal taşınmasında daha etkili olması için, çoğu katyonik lipid formülasyonunda olduğu gibi, bir yardımcı lipid ile birleştirilmesine gerek duyulur (Balazs ve Godbey, 2011).

Gen aktarımı için kullanılan lipozomal formülasyonların çoğu, yüklü lipidler ve nötr (yardımcı) lipidlerin kombinasyonlarından oluşur. Yardımcı lipid olarak genellikle en yaygın kullanılanı, dioleoilfosfatidil-etanolamin (DOPE)'dir. Dioleoilfosfatidilkolin (DOPC) de yardımcı lipid olarak lipozomların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi, yardımcı lipidlerin kullanımı transfeksiyonu kolaylaştırır. Örneğin; yardımcı lipid olarak DOPE'nin kullanımı, füzyon ara yapılarının oluşumunu kolaylaştırarak, membran füzyonunu uyarır. Lipozom formülasyonlarında DOPE'nin kullanımı genetik materyali endozomal kaçışını da sağlamaktadır. DOPE, ayrıca pozitif yüklü lipid baş grubundan karşı iyon salınımını kolaylaştırır. Böylece genetik materyal bağlamak için gereken enerji azaltılmış olur (Balazs ve Godbey, 2011; Li ve Szoka, 2007; Kim vd., 2015; Dabkowska, 2011).

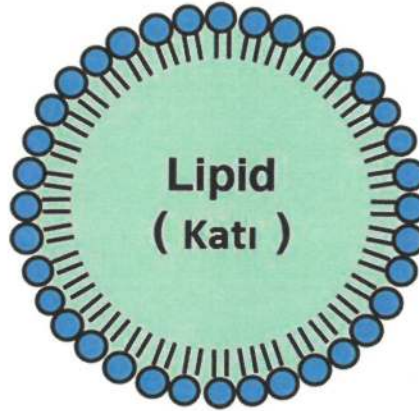
Lipozomlar siRNA taşınması için birçok avantaj sunmaktadır. Lipozomların kullanılmasıyla, siRNA bozulması önlenabilir, yüksek miktarlarda siRNA taşınabilir, pasif hedeflendirilerek tümörlü bölgelerde genetik materyal birikmesi sağlanabilir, aktif hedeflendirilerek genetik materyal gerekli bölgeye taşınabilir veya lipid içeriğine bağlı olarak

hayvanlarda ve insanlarda güvenli ve etkili sistemik taşıma sağlanabilmektedir (Ozpolat, Sood ve Lopez-Berestein, 2014).

Katı lipid nanopartiküller (KLN)

KLN'ler, terapötik ajanların taşınması için, lipozomlara ve polimerik partiküllere alternatif olarak geliştirilmiş, oda ve vücut sıcaklıklarında katı olan, nispeten sert, biyoyumlu ve biyobozunur hidrofobik lipid matrisinden oluşan kolloidal parçacıklardır.

Fosfolipitin hidrofobik kuyruk bölgeleri, çekirdek matrisine gömülü olduğu için, çekirdek hidrofobik özelliktedir (Şekil 2.9.). Bu yapılar lipozomlara kıyasla daha karardır. KLN'nin boyutu, diğer nano-taşıyıcı sistemler gibi 50 ila 1000 nm arasında değişmektedir (Carrillo vd., 2013; Ramamoorth ve Narvekar, 2015; Ekambaram, Sathali ve Priyanka, 2012).



Şekil 2.9. Katı lipid nanopartiküllerin yapısı (Kakadia ve Conway, 2014).

KLN'ler kullanılan lipitlere göre, hem negatif hem de pozitif yüklü olabilirler. Genetik materyal taşınmasında genellikle katyonik KLN'ler kullanılmaktadır. Bu parçacıklar, yüzeyinde katyonik lipidleri taşıyan bir lipid çekirdeğinden oluşur. Genetik materyalin negatif yükleri ve lipidlerin pozitif yükleri arasında elektrostatik etkileşim olması, pozitif yüklü KLN'lerin genetik materyalle kompleks oluşturmasını sağlamaktadır. Oluşan bu kompleks yapı, genetik materyalin korumasını ve hücrelere taşınmasını sağlamaktadır (Ramamoorth v Narvekar, 2015; Dolatabadi, Valizadeh ve Hamishehkar, 2015). Yapılan çalışmalarda genetik materyal taşınması için KLN'lerin, önemli avantajlar sağladığı görülmektedir. Ortotopik U-87MG ksenograft tümör modelinde, C-Met siRNA-PEG/SLN kompleksinin intravenöz uygulaması, tümör dokusunda c-Met ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği ve farelerde herhangi bir sistemik toksisite göstermeden, tümör büyü-

mesini engellediği gözlemlenmiştir (Jin vd., 2011). Bir diğer çalışmada KLN'lerin kullanımı ile siRNA salınımlarında 10-13 günlük uzamanın görüldüğü saptanmıştır. İn vitro hücre çalışmaları, bu süre boyunca salınan siRNA'nın aktivitesini koruduğunu göstermiştir (Lobovkina vd., 2011). Yapılan çalışmada hücreleri apoptoza götüren Bcl2 siRNA yüklü KLN'ler, insan rahim ağzı kanseri hücre dizilerinde düşük dozlarda toksik etki göstermiştir. Bu çalışma sonucu, KLN'ler kullanılarak siRNA'nın vajinal olarak uygulanabileceğini göstermektedir (Büyükköroğlu vd., 2016). Sonuç olarak KLN'ler günümüzde, taşınan genetik materyalin stabilitesini koruyabilmesi, yüksek miktarda genetik materyal taşıyabilmesi, kan beyin bariyerini aşarak genetik materyali beyine ulaştırabilmesi, genetik materyalle beraber ilaç etkin maddelerini taşınmasını sağlaması vb. gibi avantajlar sunduğundan genetik materyalin taşınması için büyük ilgi çekmektedir.

2.6.2.2. Polimer bazlı vektörler

Katyonik polimerler fizyolojik pH'da, DNA ile etkileşerek kompleks oluşturabilen moleküllerdir. Oluşan bu komplekslere poliplex denilir ve hedef hücrelere gen transferi için kullanılmaktadır. Katyonik polimerler ve katyonik lipidler arasındaki en belirgin fark, katyonik polimerlerin hidrofobik bir kısım içermemeleri ve suda tamamen çözünür olmalarıdır. Katyonik lipozomlara kıyasla, daha küçük partikül boyutuna sahiptirler. Partikül boyutunun küçük olması transfeksiyon verimliliğini artırmak için büyük önem taşır. Bu polimerlerde moleküler ağırlık, geometri (doğrusal ve dallanmış) ve ligandların eklenmesi gibi modifikasyonlar kolayca yapılabilmektedir (Lv vd., 2006).

Polimerler, doğal ve sentetik polimerler olarak ikiye ayrılır. Doğal polimerlerden, kitosan polisakariti, sentetik polimerlerden ise Polietilenimin (PEI), Poli (l-lisin) (PLL), Poli (DL-Lactide-co-glikolik) (PLGA), Polietilen Glikol (PEG) daha çok kullanılan polimerik yapılar arasındadır (Ramamoorth v Narvekar, 2015; Şenel 2012).

Polietilenimin (PEI)

PEI, üstün transfeksiyon etkinliği ve birçok farklı hücre tipinde etkili transfeksiyon yapabilme özelliği nedeniyle, genetik materyal taşınması için kullanılan en popüler katyonik polimerdir. PEI'nin, yapısında primer (%25), sekonder (%50) ve üçüncül aminler (%25) vardır ve bunların üçte ikisi fizyolojik ortamda protonlanma özelliğine sahiptir. Farklı pKa değerlerine sahip olan protonlanmamış aminler, geniş bir pH aralığında tamponlama etkisi sağlamaktadır. Tamponlama özelliği, PEI'ye endozomdan (proton sünger etkisi) kaçma fırsatı verir ve bu DNA'yı bozulmaya karşı korumaktadır. PEI'nin doğrusal

(LPEI) ve dallanmış (BPEI) yapılarda olan formları bulunmaktadır. PEI'nin transfeksiyon etkinliği ve sitotoksitesi; moleküler ağırlığa, doğrusal ve dallanmış yapısal özelliklerine bağlıdır. Doğrusal PEI'ler ile yapılan çalışmalar, dallanmış PEI'lere kıyasla daha yüksek transfeksiyon verimliliği ve düşük sitotoksite göstermiştir. PEI'nin en büyük dezavantajı biyobozunur olmamasıdır (Park, Jeong ve Kim, 2006), (Yin vd., 2014).

PEI sağladığı avantajlardan dolayı genetik materyal taşınmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Helmschrodt vd., PEI kullanarak kan beyin bariyerini aşarak siRNA'nın beyin hücrelerine taşınmasını başarmıştır (Helmschrodt vd., 2017). PEI aracılığıyla siRNA taşınması çalışmalarında gen ekspresyonunun önemli derecede susturulduğu gözlemlenmiştir (Knight vd., 2011; Urban-Klein vd., 2005).

Poli (l-lisin) (PLL)

PLL, gen transferi için kullanılan ilk katyonik polimerdir. PLL lizin amino asit biriminin tekrarlanmasından oluşan doğrusal polipeptittir. Bu nedenle, biyolojik olarak parçalanabilir bir yapıya sahiptir. Bu özellik onların *in vivo* uygulamaları için çok önemlidir (Lv vd., 2006). PLL'nin yapısındaki lizinin protonlanmış primer amin grupları, elektrosstatik olarak negatif yüklü DNA fosfat grupları ile etkileşime girerek, kompleks oluşturular. Stabil kompleks oluşturmak için genellikle moleküler ağırlığı 3000 Da'dan büyük olan PLL'ler kullanılmaktadır. Her ne kadar yüksek moleküler ağırlıklı PLL'ler bir gen taşıyıcı için uygun bazı özelliklere sahip olsalar da, PLL/DNA kompleksleri nispeten yüksek bir sitotoksite ve iyon kuvvetine bağlı olarak birikme ve çökelme eğilimi gösterirler (Mintzer ve Simanek, 2008). Bunların yanı sıra PLL polipeksleri dolaşım sistemine girdiğinde, plazma proteinlerine, eritrositlere bağlanır ve dolaşımdan çıkarılmaktadır. Bu nedenle düşük transfeksiyon verimi gözlemlenmektedir (Ward, Read ve Seymour, 2001).

Bu sorunların giderilmesi için PLL üzerinde bazı modifikasyonlar yapılmaktadır. Bu modifikasyonlardan biri, farklı polimerlerle blok kopolimer oluşturmaktır. Bu amaçla polietilen glikol (PEG) en sık kullanılan modifikasyon aracıdır. Yapılan çalışmalarda PLL-PEG kopolimerinin, DNA ile oluşturduğu komplekslerin, deoksiribonükleaz I (DNase I)'a karşı çok dirençli olduğu gözlemlenmiştir (Katayose ve Kataoka, 1997). Yapılan bir diğer çalışmada kopolimer ve plazmid DNA ile kompleksler oluşturmuş ve PLL'den çok daha yüksek transfeksiyon verimi gözlemlenmiştir. PEG-g-PLL ayrıca HepG2 hücre hattında, PLL'ye kıyasla çok daha düşük sitotoksite göstermiştir (Park, Jeong ve Kim, 2006).

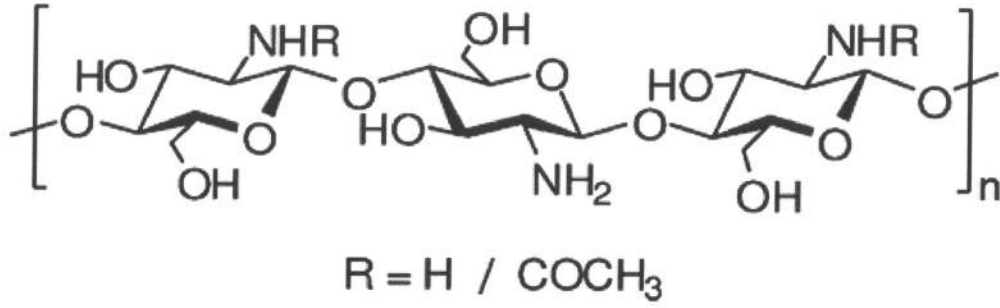
Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) çok kullanılan, biyobozunur ve biyoyoumlu bir polimerdir. PLGA, stabilite, dolaşım yarı-ömrü, biyodağılım ve hapsedilen maddenin kontrollü salınımı açısından diğer polimerik taşıyıcılarla kıyasla, daha çok avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, PLGA'nın oluşturduğu taşıyıcı sistemlerin, biyolojik malzemelerle daha iyi etkileşimi sağlamak için ve belirli dokulara/hücrelere hedeflemek için farklı ajanlarla yüzey modifikasyonları yapılabilmektedir (Danhier vd., 2012; Ramezani, Ebrahimi ve Hashemi, 2017).

PLGA'nın siRNA taşınmasında kullanımı kayda değer başarılarla sonuçlanmıştır. siRNA taşıyıcısı olarak PLGA-Poloksamer nanopartikülleri kullanılarak, pankreas kanserinin gelişiminde önemli rolü olan MBD1 proteininin gen ekspresyonu baskılanmıştır ve bu kanser hücrelerinin apoptozuna neden olmuştur (Luo vd., 2009). PLGA bazlı PLGA-PEI nanopartikülleri, HepG2 hücrelerinde miRNA transfeksiyonu için taşıyıcı vektör olarak kullanılmıştır. HepG2 hücrelerinde PEI/DNA kompleksi ile karşılaştırıldığında daha yüksek transfeksiyon etkinliği ve düşük sitotoksikite göstermiştir (Liang vd., 2011). Yüzeyi PEI ile modifiye edilmiş PLGA nanopartiküllerinin antiapoptotik gen olan BCL-w'nin susturulması için bu gene komplementer siRNA taşınmasında kullanılmıştır. PEI ile modifikasyon PLGA nanopartiküllerinin hücresel alım ve transfeksiyon verimini önemli ölçüde arttırmıştır. Bu kompleksin uygulanması sonucu, insan osteosarkom (U2OS) ve murin makrofaj (J774.1.) hücrelerinde anti-apoptotik onkogen BCL-w'de spesifik azalma gözlemlenmiştir (Andersen vd., 2010).

Kitosan

Kitosan, D-glukozamin ve N-asetil-d-glukozamin alt birimlerinin birbirine (1→4) glikozidik bağ ile bağlanmasından oluşan doğrusal bir katyonik polisakarittir (Şekil 2.10). Kitosan, çoğunlukla kabuklu deniz hayvanlarının dış iskeletinden (karides kabuğu ve diğer kabuklular) elde edilen kitinin, deasetilasyonu ile üretilir. Kitosanlar farklı derecelerde N-asetilasyon (%40–98) ve moleküler ağırlığa (50-2000 kDa) sahiptirler. N-deasetile edilmiş alt birimlerin primer amino grupları pozitif yüke sahiptirler. Bu yüzden, kitosan ve negatif yüklü genetik materyal arasında elektrostatik etkileşim gerçekleşebilmektedir. Bu etkileşim sonucu genetik materyalin kitosana bağlanması, onları nükleazların etkisinden de korumaktadır (Akbuga, Ozbas-Turan ve Ekentok, 2016; Mintzer ve Simanek, 2008; Park, Jeong ve Kim, 2006).



Şekil 2.10: Kitosanın Kimyasal Yapısı (Mintzer ve Simanek, 2008).

Kitosan, katyonik özellikli, biyouyumlu, biyoparçalanır, non-toksik, ucuz ve immünojenikliği düşük olduğu için gen taşıyıcı sistem olarak çok fazla kullanılmaktadır. Kitosan, genetik materyal taşınması için ilk kez Mumper vd., tarafından kullanılmıştır. O zamandan beri kitosan hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak viral olmayan bir gen taşıyıcı sistem olarak başarıyla kullanılmaktadır (Akbuga, Ozbas-Turan ve Ekentok, 2016). Rojanarata vd., tarafından yapılan çalışmada endojen EGFP geninin, kitosan taşıyıcı sistem aracılı siRNA ile susturulması %70-73 verimlilikle gerçekleşmiştir (Rojanarata vd., 2008). Malmo vd., tarafından yapılan çalışmada, tamamen N-deasetillenmiş kitosanlar kullanılarak, düşük siRNA konsantrasyonlarında ve birkaç farklı hücre hattında, minimum sitotoksosite ile hem eksojen hem de endojen hedef genlerin etkili ve uzun vadeli susturulması gerçekleştirilmiştir (Malmo vd., 2012). Kitosan, Alameh ve ekibi tarafından *in vivo* olarak denendiği zaman, nanopartiküllerin farelerin böbreklerinde birikmesi ve protein seviyesinde ~%50 fonksiyonel yıkım gözlemlenmiştir (Alameh vd., 2017).

Tüm bu avantajlarının yanında kitosanın gen aktarım verimliliğini etkileyen bazı etkenler bulunmaktadır. Bu etkenler, kitosan polimerlerinin moleküler ağırlığını, deasetilasyon derecesini, pH'yı, N/P oranını (kitosan azotunun, DNA fosfatına oranı) ve hücre tipini kapsamaktadır (Akbuga, Ozbas-Turan ve Ekentok, 2016; Mintzer ve Simanek, 2008; Liu ve De Yao, 2002). Huang vd, kitosanın pEGFP-C2 plazmid DNA ile oluşturduğu komplekslerin, kitosan moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak A549 akciğer kanseri hücrelerinde, hücreye alım ve transfeksiyon etkinliğini araştırmıştır. Bu araştırma sonucunda, moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesi arttıkça hücresel alım ve transfeksiyon etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir (Huang vd., 2005). Kitosan polilekslerinin optimum transfeksiyon etkinliği pH 6,8 ile 7,0 arasında görülmüştür. pH 7,5'in üzerinde, DNA'nın kompleksten ayrıldığı, böylece hücresel alım ve transfeksiyon veriminin düştüğü gözlemlenmiştir. pH 6.5'in altında, hücresel alım gerçekleşmiş fakat

transfeksiyon etkinliğinin, muhtemelen engellenmiş endozomal salınım nedeniyle düşük olduğu gözlemlenmiştir (Mintzer ve Simanek, 2008).

Kitosan komplekslerinin spesifik hücre tiplerine hedeflendirilmesi, kitosanın çeşitli ligandlar kullanılarak modifiye edilmesiyle sağlanmaktadır. Galaktoz, laktoz veya trisakarit kullanılarak yapılan hepatik hücre hedeflemesi, HepG2 hücrelerine gen transferini arttırmıştır. Galaktozile edilmiş komplekslerin, PEG veya dekstran ile konjuge edilmesiyle komplekslerin stabilitesi daha da artırılabilmiştir. Kitosanın tümör hücrelerine hedeflendirilmesi, kitosanın folat ile konjuge edilmesiyle başarılmıştır (Mintzer ve Simanek, 2008).

Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanma yöntemleri

Kitosan nanopartikülleri, amaca bağlı olarak farklı yöntemlerle hazırlanabilmektedir. Hazırlanma teknikleri, iyonik jelleşme, polielektrolit kompleksi (pec), çöktürme, kompleks koaservasyon, mikroemülsiyon, emülsiyon oluşturma çözücü difüzyonu, kovalent çapraz bağlama gibi yöntemleri içermektedir (Sailaja, Amareshwar ve Chakravarty, 2011; Mohammed vd., 2017; Hembram vd., 2016).

İyonik jelleşme

İyonik jelleşme ile kitosan nanopartiküllerinin hazırlanma mekanizması, kitosanın amin grubu ile tripolifosfat (TPP) gibi negatif yüklü polianyon grubu arasındaki elektrostatik etkileşime dayanır. TPP toksik olamayan ve çok değerlikli bir moleküldür ve iyonik etkileşimler yoluyla jeller oluşturabilmektedir. Kitosan nanopartiküllerini hazırlanmak için ilk olarak, kitosan, seyreltik asetik asitte çözündürülmektedir. Bu kitosan çözeltisine, oda sıcaklığında ve mekanik karıştırma altında, polianyon veya anyonik polimer çözeltileri eklenilerek, karıştırma işlemi devam ettirilmektedir ve böylece nanopartiküller oluşmaktadır. Kitosanın ve TPP'nin konsantrasyonları, kitosan çözeltisinin pH değerini vs. değiştirerek, boyut ve yüzey yükü açısından farklı özelliklere sahip kitosan nanopartikülleri hazırlanabilmektedir (Sailaja, Amareshwar ve Chakravarty, 2011; Zhao vd., 2011).

Polielektrolit Kompleksi (PEC)

Bu teknik, son derece basit ve kullanışlı bir tekniktir. PEC, formülasyonu, anyon ve katyon arasındaki elektrostatik etkileşimin ardından yük nötralizasyonu ile oluşmak-

tadır. Asetik asit içinde çözünmüş olan kitosan çözeltisine, genetik materyalin sulu çözeltisi eklenilerek oda sıcaklığında karıştırılır ve bu da nanopartiküllerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Hembram vd., 2016).

Çöktürme

Kitosanın asetik asitte olan düşük pH değerindeki çözeltisinin, amonyum hidroksitin yüksek pH değerlikli (8,5-9,0) çözeltisine eklenmesi, çökelme ve yüksek oranda monodispers bir nanopartikül yığınının oluşumu ile sonuçlanır. Bu yöntem yüksek enkapsülasyon verimi ile, 10 nm kadar düşük boyuttaki monodispers ve küresel şekilli nanopartiküller hazırlanabilmektedir (Mohammed vd., 2017).

Kompleks Koaservasyon

Koaservasyon yöntemi, zıt yüklü iki polielektrolit, sulu bir çözelti içinde karıştırıldığında meydana gelen, faz ayrışmasına dayanmaktadır (Lebre vd., 2012). Kompleks koaservasyon yöntemiyle, katyonik kitosan ve anyonik polianyonlar, polimerler veya biyomakromoleküller arasında koaservatların oluşumuyla, kitosan nanoparçacıkları hazırlanmaktadır. DNA-kitosan nanoparçacıkları, kitosan'ın pozitif yüklü amin gruplarının ve negatif yüklü DNA fosfat gruplarının koaservasyonu ile oluşmaktadır (Hembram vd., 2016).

Mikroemulsiyon

Bu yöntemde, asetik asit çözeltisindeki kitosan ve glutaraldehit, yüzey aktif madde içeren heksan gibi bir organik çözücü içine ilave edilmektedir. Bu karışım, çapraz bağlama işleminin tamamlanması için gece boyunca oda sıcaklığında karıştırmaya bırakılır. Organik çözücü daha sonra düşük basınç altında buharlaştırılarak uzaklaştırılmaktadır. Ürünün içerdiği, fazla yüzey aktif maddeyi, kalsiyum klorit ile çökeltip, ardından santrifüjleme ile uzaklaştırılır. Nanopartikül süspansiyonu diyaliz edilir ve daha sonra liyofilize edilmektedir. Bu yöntemde çok dar bir boyut dağılımı görülür ve nanopartiküllerin boyutu hazırlanmasındaki glutaraldehit konsantrasyonu ile kontrol edilebilmektedir (Mohammed vd., 2017).

Emulsiyon-çözücü diffüzyonu

Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasına yönelik spesifik bir yöntem, hidrofobik ilaç içeren organik bir fazın (örneğin metilen klorür ve aseton), kitosan ve bir stabilizatör

(örneğin poloksamer ve lesitin) içeren sulu bir çözeltiye, karıştırılarak eklenmesini içermektedir. Bu işlem, su içinde yağ emülsiyonunun oluşumuna yol açar ve bu emülsiyon daha sonra yüksek basınçlı homojenizasyona tabi tutulmaktadır. Metilen klorür daha sonra oda sıcaklığında düşük basınç altında uzaklaştırılmaktadır. Bu aşamada, aseton sulu faza geçer, kitosanın çözünürlüğünü azaltır ve böylece polimer çökeltilmesiyle nanopartiküller oluşmaktadır. Asetonun tamamen difüzyonuna izin vermek için genellikle bir miktar su eklenmektedir. Son olarak, nanopartiküller santrifüjleme ile izole edilmektedir (Grenha, 2012).

Kovalent-çapraz bağlama yöntemi

Kitosan, değişken çeşitli çapraz bağlayıcılarla kovalent bağ oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu nanopartikül hazırlama yöntemi, polietilen glikol (PEG), dikarboksilik asit, glutaraldehit veya epiklorohidrin gibi monofonksiyonel ajanlar ile kitosan zincirleri arasında kovalent bağların oluşmasına dayanmaktadır. Kitosan, bir asidik sulu çözeltiye eklendiğinde protonlanarak onu çözünebilen hale getiren amino gruplarına sahiptir. Ancak diğer çözücülerde çözünmemesi onun kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, suda veya diğer organik çözücülerde çözünür hale getirmek için kitosan, PEG veya başka bir çapraz bağlayıcı ile modifiye edilebilmektedir. Pegile olunmuş kitosan nanopartikülleri, gen/ilaç taşınması için kullanılabilir (Hembram vd., 2016).

2.7. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hedeflendirilmesi

Hedefli ilaç taşıma, ilaçların terapötik etkilerini arttırmak için onların istenen hedefe taşınmasının sağlanmasıdır. İlacın arzu edilen hedefe taşınması, hedef dışı bölgelerdeki etkiyi azaltırken, hedef bölgede etkinliğinin artmasına ve istenmeyen yan etkilerin azalmasına neden olur. İstenilen organ/dokuya yönelik ilaç hedeflemesi için iki strateji yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar pasif hedefleme ve aktif hedeflemedir (Şekil 2.11.) (Kang, Yoon ve Choi, 2017).

2.7.1. Pasif hedefleme

Birçok tümörde ve enfarktüsli bölgelerde, kan damar duvarı endotelinin, normal durumdan daha geçirgen olduğu gözlemlenmektedir. Bu geçirgenlik sonucu, bu tür alanlarda, büyük moleküller ve hatta 10 ila 500 nm arasında değişen miseller ve lipozomlar gibi büyük parçacıklar, vasküler yataktan ayrılabilir ve interstisyel boşluğun içinde birikebilirler (Torchilin, 2010). Taşıyıcı sistemlerin hastalıklı dokularda, gevşek fenestrasyonlar ve/veya zayıf lenfatik drenaj nedeniyle birikmesi olgusu, artırılmış geçirgenlik ve

tutulma (Enhanced Permeability and Retention EPR) etkisi olarak adlandırılır. İlaç ya da genetik materyal taşıyan partiküller, EPR etkisi için uygun boyutta hazırlanırsa, bu partiküller geçirgenliğin arttığı alanda birikecek ve böylece pasif hedeflendirilmiş olacaktır (Pattni ve Torchilin, 2015).

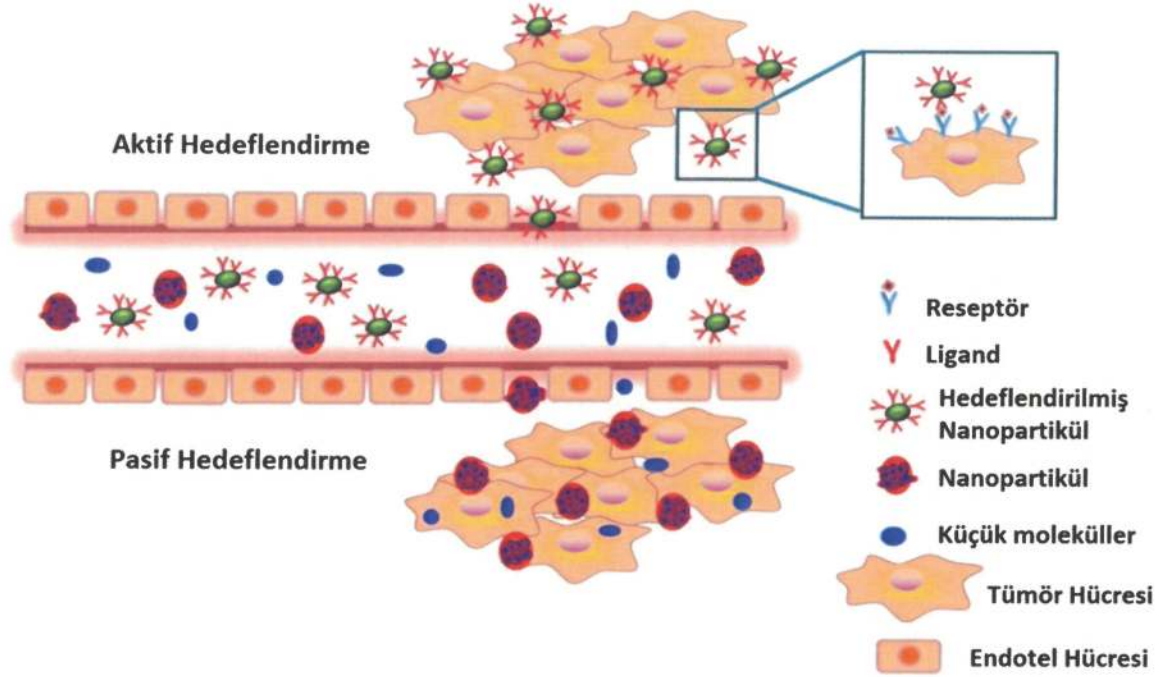
2.7.2. Aktif hedefleme

Aktif hedefleme, ilaçların etkinliği artırmak için, hedefleyici moleküllerin, ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeylerine bağlanarak onların hücrelerin yüzeyindeki belli reseptörlere bağlanabilmesinin sağlanmasıdır. Buradan da anlaşıldığı gibi, aktif hedefleme ligand-reseptör etkileşimlerine dayanmaktadır. Aktif hedeflenme için taşıyıcı sistemlerin yüzey modifikasyonları yapıldığı zaman hastalık, hedeflenen organ ve hedef organ/hücre üzerinde normal hücrelerde olduğundan daha fazla hedeflenebilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerin yüzey modifikasyonları için hedefleyici ajanlar olarak, peptitler, antikorlar, şekerler, lektinler, vb. kullanılmaktadır. Bu ligandlarla yüzey modifikasyonu yapılmış taşıyıcı sistemler, vücuda uygulandığında, hedefleyiciler taşıyıcı sistemlerin, sadece amaçlanan etki bölgelerine etkili bir şekilde ulaşmasını ve spesifik olmayan birikimlerden ve bununla ilgili yan etkilerden kaçınmasını sağlamaktadır (Kang, Yoon ve Choi, 2017; Pattni ve Torchilin, 2015; Mishra vd., 2016). Aktif hedefleme üç farklı şekilde yapılabilmektedir:

Birinci dereceden hedefleme; Bu, ilaç taşıyıcı sistemlerin önceden belirlenmiş bir hedef alanın, organ veya dokunun kılcal yatağına dağılımı anlamına gelir.

İkinci dereceden hedefleme; İlaçların, tümör hücreleri gibi spesifik hücrelerine hedeflenmesidir. Örneğin karaciğerdeki kupffer hücrelerine hedeflendirmesidir.

Üçüncü dereceden hedefleme; Hedef hücrelerin, hücre içi bölgesine ilaç hedeflendirilmesini ifade eder. Örneğin, ligand-reseptör aracılığıyla, ilaç kompleksinin bir hücreye endositozla girmesidir (Rani ve Paliwal, 2014).



Şekil 2.11. Aktif ve Pasif hedeflenme (Bhushan vd., 2017).

2.8. Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein (High Density Lipoprotein, HDL)

Kolesterol ve trigliseritler gibi lipitler, suda çözünmediklerinden, bu lipitler kan dolaşımında proteinlerle birlikte taşınır. Lipoproteinler, kolesterol esterleri ve trigliseritlerden oluşan merkezi hidrofobik bir çekirdeğe sahiptir. Bu çekirdek serbest kolesterol, fosfolipitler ve apolipoprotein ile çevrilerek lipoproteinlerin kompleks yapılarını oluşturur. Plazma lipoproteinleri, boyutlarına, lipit bileşimlerine ve içerdikleri apolipoproteinlere dayanarak yedi sınıfa ayrılır (şilomikronlar, şilomikron kalıntıları, VLDL, IDL, LDL, HDL ve Lp (a)) (Feingold ve Grunfeld, 2018).

Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) keşfi, 1929'da Macheboeuf tarafından at serumundan, protein açısından zengin fakat lipit bakımından yoksun bir kompleksin izole edilmesine dayanmaktadır. HDL; kolesterol, fosfolipitler ve trigliseritlerin taşınması ve metabolizmasında rol oynayan endojen nanopartiküldür. HDL, fazla kolesterolü aterosklerotik plaklardan uzaklaştırmanın yanı sıra, aynı zamanda kardiyovasküler sistemi koruyan antienflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu için iyi kolesterol olarak bilinmektedir. HDL ayrıca endojen proteinleri, vitaminleri, hormonları ve miRNA'yı çeşitli organlara taşımaktadır (Lund-Katz ve Phillips, 2010).

HDL'nin ana yapısal proteini, insanlarda karaciğerde ve ince bağırsakta sentezlenen apolipo-protein A1'dir (APOA1). APOA1, kan ve mezenterik lenf içine salgılanmasından

sonra, kolesterol ve fosfolipitlerle birleşerek pre- β HDL'ler olarak adlandırılan diskoidal kompleksler oluştururlar. Pre- β HDL'nin dokuların interstisyel sıvısında esterlenmemiş kolesterol ve fosfolipidlerle, ilk lipidasyonu, taşıyıcı, ATP-bağlayıcı kaset A 1 (ABCA1) aracılığıyla gerçekleşir (Kingwell vd., 2014). Serbest kolesterolün hücrelerden pre- β HDL'lelere akışına takiben, küçük HDL parçacıklarının yüzeyindeki serbest kolesterol, kolesterol estere dönüştürülür ve HDL'nin çekirdeğinde depolanır. Bu işlem daha küçük pre- β HDL'yi büyük küresel HDL3'e ve HDL3'ü de daha büyük HDL2 parçacıklarına dönüştürür. Bu geçiş sırasında, diskoidal pre-HDL'nin morfolojisi, çekirdek içindeki kolesterol esteri ve yüzeydeki fosfolipit ile küresel bir şekle dönüşmektedir. Bu süreç lesitin kolesterol asiltransferaz (LCAT) aracılığıyla gerçekleşmektedir (Wang ve Briggs, 2004). Esterlenmemiş kolesterol ve kolesterol esterler, HDL2'den karaciğere iki ana yolla aktarılır: birincisi doğrudan, hepatositlerde SRB1'e bağlanarak veya dolaylı olarak, aterosjenik lipoproteinlere, kolesterol ester transfer proteini (CETP) yoluyla transfer edilerek gerçekleşmektedir. Bunlara ek olarak, HDL, tanımlanamayan bir HDL reseptörü (HDLR) yoluyla da hepatositlere alınmaktadır. HDL'nin hepatositlerde katabolize olması sonucu lipit içermeyen APOA 1 serbestleşir ve bir sonraki lipidasyon döngüsüne katılmaktadır (Şekil 2.12.) (Kingwell vd., 2014).

HDL ile siRNA taşınması için yapılan bir çalışmada, yüksek siRNA kapsülleme verimliliğine sahip yeni bir rHDL vektörü, Rui vd., tarafından geliştirilmiştir. Yaptıkları çalışmada siRNA'yı çeşitli ticari katyonik polimerler ile inkübe etmiş ve polipleksi lipidler ve apolipoprotein A1 (ApoA-I) tabakasıyla kaplamak suretiyle, siRNA taşıyan rHDL formülasyonu geliştirmişlerdir. Çeşitli rHDL formülasyonları, minimum sitotoksosite ile hepatositlerde yüksek susturma etkinliği (%70' den fazla) göstermiştir. Üstelik, rHDL'nin SMMC-7721 tarafından alınımının, doğal HDL alımın yolu ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Rui vd., 2013).

HDL'in yapısında kolesterol olması, siRNA'nın HDL partiküllerine inkübasyon yöntemi ile konjugasyonunu da mümkün kılmaktadır. siRNA'nın kolesterolün yanı sıra safra asitlerine ve uzun zincirli yağ asitlerine konjugasyonu, hücrelere alınımına aracılık ederek gen susturmasına olanak vermektedir. Bu tip siRNA konjugatlarının, etkin ve seçici olarak hücre tarafından alınımı lipoprotein parçacıkları, lipoprotein reseptörleri ve transmembran proteinleri ile etkileşimine bağlıdır. SRB1 reseptörü, yüksek düzeyde büyümeyi sürdürmeleri için kanser hücreleri üzerinde fazla eksprese olunan bir reseptördür (Shahzad vd., 2011). HDL'nin SRB1 reseptörüne bağlanma özelliğinden dolayı kanser tedavisinde kolaylık sağlayabileceği düşünülmektedir. Linda K. Mooberry vd., tarafından, SRB1 ve HDL etkileşiminin kanser tedavisinde etkili olacağı paklitaksel yüklenmiş HDL nanopariküllerinin prostat kanseri hücreleri (PC-3) üzerinde denenmesi ile ispat edilmiştir (Mooberry vd., 2010). HDL nanopartiküllerinin içerdiği apolipoprotein moleküllerinin hücre zarında olan SRB1 reseptörleri ile etkileşimi, bu partiküllerin taşıdığı siRNA'nın da hücre tarafından alınımını arttırmaktadır (Wolfrum vd.,2007)

Yapılan bir diğer çalışmada, Pokemon geninin susturulması için kolesterol ile konjugeli siRNA (Chol-siRNA) taşınması için, biyomimetik bir nanovektör olarak rHDL geliştirilmiştir. Chol-siRNA yüklü rHDL nanopartiküllerinin, (rHDL/Chol-siRNA kompleksleri) HepG2 hücrelerine alınımı HDL-reseptör aracılı mekanizma ile gerçekleşmiştir. In vitro sitotoksosite, apoptoz ve Western blot analizleri, Chol-siRNA-Pokemon yüklü rHDL nanopartikülleri (rHDL/Chol-siRNA-Pokemon) ile tedavi edilen HepG2 hücrelerinde, önemli hücre büyüme inhibisyonu ve Pokemon ve Bcl-2 protein ekspresyonunda azalma olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, rHDL'nin Chol-siRNA transferi için viral olmayan bir tümör hedefleme vektörü olabileceğini ve rHDL aracılı Chol-siRNA-

Pokemon taşınması, hepatosellüler karsinomda gen tedavisi için umut verici yeni bir strateji olabileceğini göstermektedir (Ding vd., 2012).

Beyin kılcal endotel hücresi (BCEC), kan-beyin bariyerinin önemli bir parçasıdır, bu hücrelerde organik anyon taşıyıcı 3 (OAT3) mRNA'ya hedeflenen HDL/Chol-siRNA partiküllerinin kullanılması, BCEC hücrelerinde OAT3 mRNA'yı önemli ölçüde susturmuştur. Bu bulgu, HDL'nin BCEC hücrelerinden kaynaklanan birçok hastalıkta, genetik materyal taşıyan sistem olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Aynı işlem için diğer endojen lipoproteinler kullanıldığında, sonuçlar HDL kullanımındaki kadar iyi olmamıştır (Kuwahara vd., 2011). Bu veriler, rHDL nanopartikülün yeni ve oldukça etkili bir siRNA taşıyıcısı olduğunu ve kanser tedavisinde yeni yaklaşımların temelini oluşturacağını göstermektedir.

2.8.2. HDL'nin kandan izolasyonu

HDL, kandan ilk kez 1950'li yılların sonunda Eder vd., tarafından izole edilmiştir. Fakat HDL'nin kandaki görevi ve kalp-damar sistemi üzerindeki etkileri ile ilgili ilk görüşler 1960'dan sonra ortaya çıkmıştır. Günümüzde, HDL'nin kandaki fonksiyonu ve özellikleri açık ve net olarak belirtilmiştir. Bu özelliklerinin sağlayacağı avantajlar göz önünde bulundurularak çeşitli amaçlar doğrultusunda HDL'nin kandan izolasyonu için farklı yöntemler kullanılmıştır. Kandan HDL izolasyonu için en yaygın kullanılan yöntem Ultrasantrifüj yöntemidir. Bu yöntem yüksek g kuvvetlerinde (G force) lipoproteinlerin dansitelerine bağlı olarak ayrışmasına dayanır (Warnick, Cheung ve Albers, 1979). Polianyonlar üzerindeki negatif yüklü gruplar ile lipoproteinlerin protein kısımlarında pozitif yüklü gruplar arasındaki olabilecek etkileşim baz alınarak, lipoproteinleri kandan ayırma yöntemleri geliştirilmiştir. Buna dayanarak HDL'lerin PEG6000 ile kandan izolasyonunun yapılması olasıdır (Izzo, Grillo ve Murador, 1981). Çöktürme işlemi için heparin-manganozu çeşitli konsantrasyonlarda kullanılarak, HDL kandan izole edilebilmektedir (Warnick ve Albers, 1978). Aynı temele dayanarak, HDL'yi dekstran sülfat kullanılarak da kandan ayırmak mümkündür (Warnick, Nguyen ve Albers, 1985). Bu yöntemlerin yanı sıra HDL'yi dekstran sülfat aracılığıyla seçici olarak çöktürmek için, bir ticari ürün olan STA- 607 HDL Saflaştırma Kiti, geliştirilmiştir. Cell Biolabs Inc tarafından geliştirilmiş bu kit HDL'nin kandansaf olarak ayrıştırılmasını sağlamaktadır ([http-3](http://3)).

2.9. Apoptoz

Çok hücreli organizmaların hücreleri, oldukça organize bir topluluğun üyeleridir. Bu topluluktaki hücrelerin sayısı, sadece hücre bölünmesi oranını kontrol ederek değil, aynı zamanda hücre ölüm hızını kontrol ederek de düzenlenmektedir. Hücrelere artık ihtiyaç duyulmadığında, hücreler, hücre içi ölüm programını aktive ederek “intihar” ederler. Bu nedenle bu işleme programlı hücre ölümü adı verilmiştir. Programlı hücre ölümü için yunanca “ağaçtan düşen yaprak” anlamına gelen apoptozis (Apo: ayrı, Ptoxis: düşme demektir) sözcüğü kullanılmaktadır (Alberts vd., 2002). Apoptoz terimi ilk kez 1972’de, Kerr, Wyllie, and Currie tarafından yayınlanan makalede kullanılmıştır (Kerr, Wyllie ve Currie, 1972).

Apoptoz ilk bakışta hücrelerin ölmesi gibi negatif bir algı oluştursa da aslında organ ve dokular için büyük önem taşımaktadır. Örneğin, gelişmekte olan bir insan embriyosunda parmakların ayrılması, parmaklar arasındaki hücrelerin apoptoz geçirmesi sonucu gerçekleşmektedir (Mori vd., 1995). Apoptoz ayrıca immün reaksiyonlarda veya hücrelerin bir hastalık durumunda veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğü durumlarda bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır (Norbury ve Hickson, 2001). Apoptozun immün sistemi için diğer bir önemi, bağışıklık sisteminin B ve T hücreleri arasında, otoimmüniteye neden olabilecek hücreleri elimine etmesidir (Cohen, 1991). Gelişimleri sırasında, potansiyel olarak kanserli ve virüs bulaşmış hücrelerin eliminasyonu da apoptozla gerçekleşir. Bir hücrenin DNA’sı zarar gördüğünde, genellikle hasar, hücre tarafından algılanır ve tamir edilmeye çalışılır. Hasar onarılamayacakoyutta ise hücre normalde kendini apoptoza gönderir ve hasarlı DNA’sının yeni hücrelere geçmesini engeller. DNA hasarına sahip hücre apoptoza gitmezse, DNA’daki hasar yeni hücrelere aktarılır ve kansere neden olabilir. Bu nedenle kansere neden olabilecek veya kanserli hücrelerin apoptozu önem taşımaktadır (Norbury ve Hickson, 2001; Chen vd., 1996).

Hücrelerin apoptozu ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki ana yolda gerçekleşebilmektedir. Ancak, iki yolun birbirine bağlı olduğuna ve bir yoldaki moleküllerin diğerini etkileyebileceğine dair kanıtlar da bulunmaktadır (Elmore, 2007).

2.9.1. Ekstrinsik yolda apoptoz

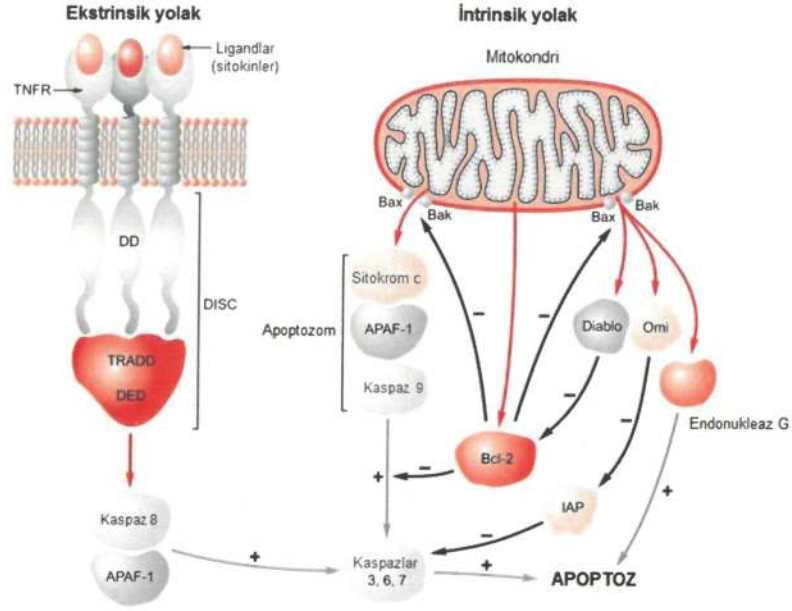
Apoptozu başlatan ekstrinsik sinyal yolları, transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içermektedir. Bu etkileşim, tümör nekroz faktörü (TNF) familyasının sitokini olan

ligandlar ile tümör nekroz faktörü reseptör (TNFR)/ Fas reseptörleri arasında gerçekleşmektedir. Bu reseptörler, ligandı bağlayan hücre dışı bir alana, bir transmembran segmentine ve bir intrasitoplazmik alana (Ölüm Alanı, Death Domain (DD)) sahip protein homotrimerleridir. Bu reseptörlere spesifik ligandın bağlanması, zarın iç yüzeyinde "ölüme neden olan sinyal kompleksi" (death-inducing signaling complex, DISC) olarak bilinen ve procaspaz 8-10 moleküllerini de içeren kompleksin oluşumuna yol açar. Ligand bağlanması sonucunda procaspazlar (8-10), DISC molekülünden ayrılarak aktive olur. Daha sonra bu aktive kaspazlar (8-10) diğer kaspazları (3-6-7) uyardığı sitoplazmaya gider. Bu uyarı sonucunda Kaspaz 3, 6 ve 7 aktive olur ve hücre proteinlerinin degradasyonunu gerçekleştirerek hücrelerin apoptoza gitmesini sağlarlar (Şekil 2.13.) (Brill vd.,1999; Blanco ve Blanco, 2017).

2.9.2. İnterinsik yolakta apoptoz

Hipoksi veya besin eksikliği gibi hücre stresleri ve hücre içine gelen radyasyon, toksinler, viral enfeksiyonlar, serbest radikaller gibi DNA veya diğer hücre yapılarına zarar veren ajanlar interinsik yolakta apoptozu aktive edebilmektedir. İnterinsik yolla apoptozun gelişimi mitokondriden başlar ve bu nedenle bu yolak mitokondriyal apoptoz yolağı olarak da bilinmektedir (Saelens vd., 2004; Blanco ve Blanco, 2017).

İnterinsik yolakta apoptozun gerçekleşmesinde Bax ve Bak adlı proteinler önemli görev almaktadır. Sağlıklı hücrelerde Bak proteini mitokondriyal dışı zara gevşek bir şekilde bağlanmış haldedir, Bax proteini ise sitoplazmada bulunur. Hücreye bir proapoptotik uyarıcı etki ettiği zaman, Bax ve Bak, mitokondriyal dışı membrana derinlemesine yerleşerek, oligomerik zar gözeneklerini oluştururlar. Oluşan bu gözenekler, sitokrom c, Smac (veya Diablo), Omi ve endonükleaz G gibi proapoptotik faktörlerin, mitokondriyal membrandan geçerek sitoplazmaya salınmasına neden olmaktadır. Sitoplazmada, sitokrom c, Apaf-1 proteinine bağlanır ve apoptozom denilen bir yapı oluşturur. Apoptozomdaki Apaf-1, apoptozoma prokaspaz 9'un bağlanmasına sağlar. Prokaspaz 9'un apoptozoma bağlanması, kaspaz 9 kompleksini oluşturur. Aktif kaspaz 9 daha sonra proteaz kaspazları (3, 6 ve 7) aktive eder ve bu kaspazların aktivasyonu, hücre apoptozuyla sonuçlanmaktadır. Sitokrom c'nin yanı sıra sitoplazmaya salınan Smac (veya Diablo), Omi ve Endonükleaz G de proteaz kaspazları (3, 6 ve 7) aktive ederek hücrelerinin apoptozuna neden olmaktadır (Şekil 2.13.) (Igney ve Krammer, 2002; Blanco ve Blanco, 2017; Pollard vd., 2016).



Şekil 2.13. Apoptoz yolları (Blanco ve Blanco, 2017)

2.10. Bcl-2

Bcl-2, 12 proteinden oluşan bir protein ailesidir. Bu ailenin bir üyesi olan Bcl-2 proteinini kodlayan gen bölgesi ilk kez B hücreli lenfomasında bulunmuştur. Bcl-2 ailesi, üç fonksiyonel gruba ayrılmaktadır. I grup *Bcl-2 koruyucuları*dır ve bunlar hücreleri apoptoza karşı korumaktadır. II grup *Bcl-2 katiller* (örneğin, Bax ve Bak), aktif olarak hücreleri öldüren proapoptotik proteinlerdir. III grup *Bcl-2 düzenleyicileridir* (BH3 proteinleri olarak bilinir), koruyuculara müdahale ederek veya katilleri aktive ederek hücre ölümünü tetiklerler (Pollard vd., 2016). Bu sınıfların ortak özelliği yapılarında BH (Bcl-2 homolojisi) alanları (domain) adı verilen protein sekanslarına sahip olmalarıdır. Bu protein sekansları BH1, BH2, BH3, BH4 olmak üzere 4 gruba ayrılır. Temel olarak hücreler intrinsik yolu harekete geçiren sinyaller aldıklarında, Bcl-2 proteinleri mitokondriden ölümü teşvik edici faktörlerin salınımını düzenlemektedir. (Hengartner, 2000).

Bcl-2 ve Bcl-xL gibi birinci grubun üyeleri dört tane kısa ve korunmuş BH alanı (BH1-BH4)'na sahiptirler ve mitokondrinin dış yüzeyinde bulunurlar. Grup I üyelerinin temel özelliği, hepsinin antiapoptotik aktiviteye sahip olmaları ve hücreleri ölümden korumalarıdır. Bu grup proteinlerin antiapoptotik aktivite göstermelerinin nedeni, Bax/Bak'a bağlanarak, Bax ve Bak'ın mitokondri membranında gözenek oluşturmalarını engellemeleridir (Pollard vd., 2016).

Hücrelerin ölmesini önleyen bir gen, çok hücreli organizmalarda, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda çoğu kanser türünde Bcl-2 proteinini kodlayan genin transkripsiyonunda artış olduğu görülmüştür. Bcl-2 proteinin hücre ölümünü engellemesi özellikle kanser hastalığında istenmeyen bir durum olan hücre ploriferasyonu ile sonuçlanmaktadır (Yip ve Reed, 2008). Bu nedenle bu proteini kodlayan genin susturulması kanser hastalığının tedavisi için büyük önem taşımaktadır. Son dönemlerde Bcl-2 geninin susturulmasıyla kanserin baskılanması için farklı çalışmalar yapılmış ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Feng vd., tarafından yapılan çalışmada Bcl-2 genini hedef alan siRNA, spesifik olarak HepG2 hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunu azaltarak, Bax/Bcl-2 oranını ve kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı ve hücrelerin apoptoza gitmesini sağladığı gözlemlenmiştir (Feng vd., 2006). Akut B lenfoblastik lösemi (A-BLL) hastalarından alınan hücrelere anti-Bcl-2 siRNA uygulandığı zaman hücrelerde Bcl-2 mRNA ekspresyonunda azalma ve hücrelerin apoptozunda önemli artış görülmüştür (Meng, Liu ve Wang, 2015). Bcl-2 genini susturmak için anti-Bcl-2 siRNA'nın meme kanseri hücrelerine (MCF7) uygulanması sonucunda, hücre büyümesinde durma ve hücre ölümünde artış gözlemlenmiştir (Akar vd., 2008). Yapılan diğer çalışmalar da kanser tedavisinde Bcl-2 geninin susturulmasının kanser tedavisi için umut vaat ettiğini göstermektedir.

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Kimyasal	Firma
Agaroz	Prona İspanya
Akrilamit/Bisakrilamit (% 30, 29:1)	Applichem Almanya
Amonyum persülfat (% 99)	Applichem Almanya
<i>Brillant Blue G</i>	Amresco Amerika
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Biological Ind. İsrail
DMSO (Dimetilsülfoksit)	Applichem Almanya
EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit)	Sigma-Aldrich Almanya
Etanol	Merck Almanya
Etidyum bromür	Amresco Amerika
Fötal sığır serumu	Sigma-Aldrich Almanya
Glasiyel asetik asit	Sigma-Aldrich Almanya
Gliserol	Sigma-Aldrich Almanya
Glisin	Merck Almanya
Kitosan	Sigma-Aldrich Almanya
Metanol	Merck Almanya
MTT boyası	Applichem Almanya
n-Butanol	Sigma-Aldrich Almanya
Penisilin/streptomisin	GIBCO İngiltere
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	Merck Almanya
SDS için protein işaretleyici (4 renkli 10-260kDa)	Thermo Scientific Amerika
siRNA Bcl-2	SantaCruz Bio. Amerika
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich Almanya
Sodyum klorür	Merck Almanya
STA-607 (Utrasantrifüjsüz HDL Saflaştırma kiti)	Cell Biolabs Amerika
TEMED (Tetrametiletilendiamin)	Applichem Almanya
TPP (Tripolifosfat)	Sigma-Aldrich Almanya
Tripsin/EDTA	Biological Ind. İsrail
Trizma baz	Sigma-Aldrich Almanya
Yükleme tamponu (Laemli tampon)	Sigma-Aldrich Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Firma Adı
Büyük kapasiteli santrifüj	Eppendorf 5810, Almanya
CO ₂ 'li etüv	Hera Cell 240i, Amerika
Cytation 5 plaka okuyucu	BioTek, ABD
Distile su cihazı	Millipore, Amerika
Dondurucu (-20°C)	Arçelik, Türkiye
Dondurucu (-80°C)	New Brunswick Sci., Amerika
Floresan mikroskop	Leica 400DMI, Almanya
Güç kaynağı	Consort E861, Belçika
İnvert mikroskop	Leica DMIL, Almanya
Jel dokümantasyon cihazı	Uvitec Cambride, İngiltere
Laminar akış kabini	Heal, Force Çin
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Mekanik karıştırıcı	Heidolph Almanya
Mikrosantrifüj	Eppendorf, Almanya
Orbital karıştırıcı	Stuart SSL1, İngiltere
Otoklav	Hirayama, Japonya
Otomatik mikropipetler	Eppendorf, Almanya
pH-metre	ThermoScientific Amerika
SEM Cihazı	Carl Zeiss Ultra Plus, ABD
Su banyosu	GFL T-251425, Almanya
Vorteks karıştırıcı	Jeio Tech Co., Çin
Yatay Çalkalayıcı	Stuart SSL2, Amerika
Yatay elektroforez cihazı	ThermoScientific, Amerika
Zeta potansiyel ve parçacık boyutu ölçer : Nano Zetasizer ZS	İngiltere (Malvern)

4. YÖNTEM

Yüzeyine HDL bağlı kitosan nanopartiküllerin hazırlanması için öncelikle HDL'nin kandan izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, gönüllülerden alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Formülasyonların hazırlanmasında kullanılacak olan HDL, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın 06.02.2018 Karar Tarihli, No:29 Kararı uyarınca, 18 yaşından büyük sağlıklı gönüllülerden alınan yaklaşık 10 mL kan numunelerinden izole edilerek elde edilmiştir (Ek 1).

4.1. Gönüllülerden Kan Alma

Gönüllülerden kan alma işlemi, Anadolu Üniversitesi Mediko Sosyal Hastanesi'nin hemşirelik desteği ile Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için, 50-20 yaş aralığındaki 41 kişi gönüllü olmuştur. Etik Kurulun onaylamış olduğu '*Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu*' Ek 2'de sunulmuştur.

4.2. HDL İzolasyonu

4.2.1. Kandan Serumun Çıkarılması

HDL'nin elde edilmesi için, Wiebe ve Smith (1985)'in kullanmış olduğu yöntem seçilmiştir ve yapılan işlemler aşağıda basamaklar halinde sunulmuştur.

- Kanlar önce oda sıcaklığında pıhtılaşmaya kadar 30-60 dakika bekletilmiştir,
- Kanlar pıhtılaştıktan sonra 1.500xg kuvvetinde 20 °C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir,
- Santrifüjleme işlemi bittikten sonra tüplerdeki süpernatant kısımlar, yani serumlar, 50 mL'lik plastik deney tüplerine toplanmıştır,
- Toplanan serumlar, HDL izolasyon işlemi yapılınca kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.2. HDL'nin Serumdan izolasyonu

HDL'nin kandan izolasyonu için, ultrasantrifüjsüz HDL Saflaştırma Kit'i [HDL Purification Kit (Ultracentrifugation Free), STA- 607; Cell Biolabs, USA] kullanılmıştır. Kullanılan kite ait prosedür (<http-3>) aşağıda verilmiştir.

Reaktiflerin Hazırlanması:

- **HDL Resüspansiyon Tamponunun hazırlanması:**

Kit içerisindeki Dextran çözeltisi 1:100, Çöktürme çözeltisi 1:10 oranlarına Tris çözeltisi ile seyreltilmiştir. Bunun için 110 µL Dextran çözeltisi, 1,1 mL Çöktürme Çözeltisi bir behere aktarılmış, 9,79 mL Tris çözeltisi eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

- **1X HDL Yıkama Çözeltisinin hazırlanması:**

5X HDL Yıkama çözeltisini deiyonize su ile 1X'e seyreltilmesi için, 500 µL alınmış 2 mL distile su eklenerek pipettaj yapılmıştır.

HDL izolasyon işlemi:

Kit kullanarak HDL izolasyonu yapılırken, her defasında 24 mL serum kullanılmıştır.

- -20 °C' de saklanan serum oda sıcaklığında eritilmiştir,
- 2 mL'lik mikrotüplere aktarılan 1 mL seruma, buz üstünde, 5 µL Dextran çözeltisi ve 50 µL Çöktürme çözeltisi eklenmiş ve pipet yardımı ile karıştırılarak 5 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır,
- İnkübasyondan sonra 6.000 x g kuvetinde +4 °C' de 10 dakika santrifüj edilmiştir,
- Tüplerdeki süpernatant kısmı yeni tüplere aktarılmıştır ve 60 µL Dextran çözeltisi ve 150 µL Çöktürme çözeltisi eklenilerek oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır,
- İnkübasyon sonrasında 18.000-20.000 x g kuvetinde, +4 °C' de 30 dakika santrifüjlenmiş, süpernatantlar atılmış ve pellet üzerine 500 µL HDL Resüspansiyon Tamponu eklenilerek pipet yardımıyla karıştırılmıştır,
- Resüspand edilen karışım, 6000xg kuvetinde, +4°C'de, 10 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant kısmı atılarak, pellet üzerine 600 µL 1X HDL Yıkama solüsyonu eklenmiştir,
- Tüpler yatay çalkalayıcıya alınmış ve 160 rpm' de 4 °C' de 30 dakika boyunca köpük oluşumuna dikkat edilerek çalkalanmıştır,
- Sonra yine 6.000 x g kuvetinde, +4 °C ' de, 10 dakika santrifüj edilmiştir,
- Elde edilen süpernatant yeni mikrotüpe aktarılmış ve üzerine kit içerisinde bulunan Dextranı uzaklaştıran çözeltisinden 90 µL eklenerek, pipet yardımıyla karıştırılmıştır ve sonra +4 °C' de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır,

- Tüpler tekrar 6.000 x g kuvvetinde, +4 °C' de, 10 dakika santrifüj edildikten sonra saf HDL içeren süpernatantlar 15 mL'lik plastik deney tüplerine toplanmıştır.

Kısa vadede kullanılacak bir miktar HDL içeren çözelti ayrılarak +4 °C' de, geri kalan kısmı ise -20 °C ' de muhafaza edilmiştir.

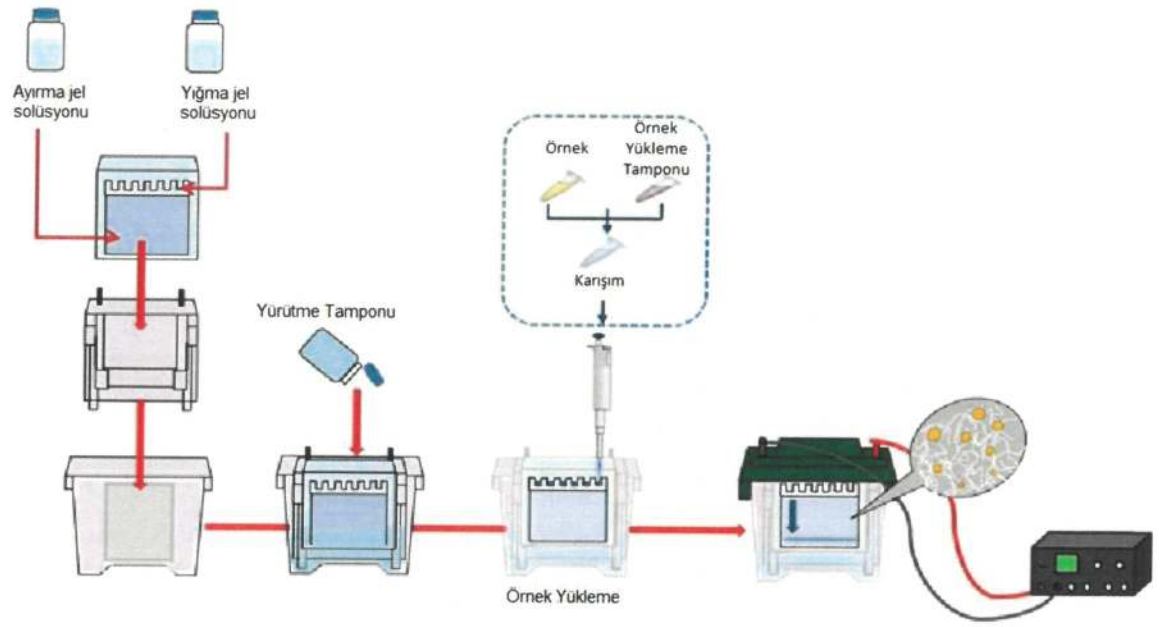
4.2.3. HDL miktar tayini

Elde edilen HDL çözeltilerinin konsantrasyonu Eskişehir Acıbadem Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında hastaların kanlarındaki HDL miktarını belirlemek için kullanılan cihaz ve yöntem kullanılarak belirlenmiştir.

4.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi (*Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi*)

İzole edilen HDL 'nin saf olup olmadığının belirlenmesi ve ApoA1 proteininin jeldeki yerinin saptanması ve bu bölgeden izolasyonu için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır.

Genel anlamıyla elektroforez, makromoleküllerin elektrik alanında ayrılması yöntemidir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), yüklü moleküllerin, bir elektrik akımı vasıtasıyla jel matrisinde taşınmalarıyla gerçekleşen bir tekniktir (Şekil 4.1.). En popüler SDS-PAGE prosedürü 1970 yılında Laemmli tarafından tanımlanmıştır. SDS-PAGE' de destek ortamı olarak bir poliakrilamid jel ve proteinleri doğrusal hale getirmek için denatüre eden anyonik (negatif yüklü) deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanır. SDS-PAGE prosedürü genel olarak, SDS'in proteinlerle kompleksleşme yeteneğine dayanmaktadır. SDS, hidrofobik molekülleri çözebilen ve ikincil ve disülfid bağı olmayan üçüncül yapıları denatüre edebilen bir anyonik (negatif yüklü) deterjandır. On iki karbonlu kuyruk kısmının varlığından dolayı, SDS, hidrofobik etkileşimler yoluyla protein molekülünün polar olmayan bölgeleriyle birleşirken, SDS molekülünün polar bölgeleri, SDS-protein komplekslerine net negatif bir yük katmanı oluşturur. Kompleksi çevreleyen bu negatif yük, çevrelediği proteinin kütlesi ile doğru orantılıdır ve kompleksin elektrik alanında anota (pozitif kutup) doğru göç etmesini sağlamaktadır (Manns, 2011; Pavlova vd., 2018).



Şekil 4.1. SDS-PAGE jel elektroforezi (Boon vd., 2016).

Tablo 4.1. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler

% 10 Ayırma Jeli (5 mL)

Distile su	1.9 mL
% 30 Akrilamit/bisakrilamit	1.7 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.3 mL
% 10 SDS	0.05 mL
% 10 APS	0.05 mL
TEMED	0.002 mL

% 5 Yığma Jel (2 mL)

Distile su	1.4 mL
% 30 Akrilamit/bisakrilamit	0.33 mL
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.25 mL
% 10 SDS	0.02 mL
% 10 APS	0.02 mL
TEMED	0.002 mL

Yürütme Tamponu (10X)

Trizma baz	30 g
Glisin	144 g
SDS	10 g
Distile su	1 L

Örnek Yükleme Tamponu (2X)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 mL
Gliserol	1.6 mL
% 10 SDS	3.2 mL
2-Merkaptoetanol	0.8 mL
%1 Bromofenol blue	0.4 mL

Sabitleme çözeltisi (100 mL)

Glasiyel asetik asit	10 mL
Metanol	50 mL
Su	40 mL

Boyama çözeltisi (100 mL)

Comassie Brilliant blue	0.25 g
Glasiyel asetik asit	10 mL
Metanol	45 mL
Distile su	45 mL

Yıkama çözeltisi (100 mL)

Glasiyel asetik asit	10 mL
Metanol	40 mL
Distile su	50 mL

SDS-PAGE için protein örneklerinin hazırlanması

1. Mikrotüp içerisine 7,5 µL HDL solüsyonu konmuş ve üzerine 7,5 µL yükleme tamponu eklenmiştir,
2. Diğer bir tüpe 10 µL renkli protein işaretleyicisi konumuş ve üzerine yükleme tamponu ilave edilmiştir,
3. Tüpler (işaretleyici haricinde) su banyosunda yaklaşık 90 °C'de 3 dakika bekletilmiştir,
4. Tüpler su banyosundan alındıktan sonra hemen buz üzerine aktarılmış ve orada 1 dakika bekletildikten sonra yüklenme için hazır hale gelmiştir.

SDS-PAGE'in uygulanması

Proteinin boyanarak belirlenmesi ve izolasyonu işlemi için iki ayrı jel yürütülmüştür.

1. Jel hazırlanmadan önce cam plakalar distile su ile yıkanarak, kurulanmıştır, Plastik şeritlere sızıntıyı önlemek için az miktarda vazelin sürüldü ve camların arasına koyuldu. Camlar jel kasetine yerleştirildi ve sıkıca tutturulmuştur,
2. Ayırma jelini hazırlamak için gereken çözeltiler (sırasıyla, distile su, akrilamit, Tris-HCl, SDS) bir behere konularak iyice karıştırılmıştır. Sonrasında APS ve TEMED eklenmiş ve karışım hemen pipet yardımı ile plakalar arasına hava kabarcığı kalmayacak bir şekilde dökülmüştür,
3. Tarakların yaklaşık 1 cm altına kadar ayırma jeli doldurulduktan sonra üzerine Bütanol eklenerek, polimerleşme için 30-45 dakika beklenmiştir,
4. Jelleşme tamamlandıktan sonra bütanol kurutma kağıdı yardımı ile ortamdan çekilmiştir,
5. Yükleme jelini hazırlamak için de gereken çözeltiler (sırasıyla, distile su, akrilamit, Tris-HCl, SDS) bir behere konularak iyice karıştırılmıştır, en son olarak APS ve TEMED eklenmiş ve karışım hemen pipet yardımı ile plakalar arasına hava kabarcığı kalmayacak bir şekilde dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir. Polimerleşme için 30-45 dakika beklenmiştir.
6. Jelleşme tamamlandıktan sonra camların alt kısmındaki plastik şerit çıkarılarak kaset tank içerisine yerleştirilmiştir. Taraklar dikkatlice çıkarılmış ve kuyular pipet yardımıyla yürütme tamponuyla yıkanmıştır,

7. Örnekler ve işaretleyici mikropipet yardımı ile kuyulara yüklenmiştir,
8. 80 V ve 25 mA'de 30 dakika ve 120 V 40 mA'de 80 dakika yürütülmüştür,
9. Yürütme işlemi sonunda jellerden birisi boyanarak protein belirlenmesinde diğeri ise boyanmadan protein izolasyonunda kullanılmıştır.

Jelde proteinin belirlenmesi;

Jelin Fiksasyonu;

1. Yürütme tamamlandıktan sonra jel, elektroforezden çıkarılarak plastik kap içine alınmıştır ve jel distile su ile yıkanmıştır,
2. Kabın içine fiksasyon çözeltisi konulup çalkalayıcı üzerine alınarak 1 saat çalkalanmaya bırakılmıştır.

Jelin Boyanması;

1. Fiksasyon işleminden sonra kaptaki fiksasyon çözeltisi alınmış ve kabın içine boyama çözeltisi konulup kap çalkalayıcı üzerine koyulmuştur,
2. Çalkalayıcı üzerinde yaklaşık 20-30 dakika çalkalanmıştır.

Jelin Boyasının Yıkama

1. Jelin boyanması tamamlandıktan sonra kaptaki boyama çözeltisi alınmıştır,
2. Kabın duvarında kalan boyayı uzaklaştırmak için bir iki kez distille su geçirilerek kap ve jel birlikte yıkanmıştır,
3. Sonra üzerine yıkama solüsyonu konularak, boya protein olmayan bölgelerden tamamen uzaklaşana kadar çalkalayıcıda bırakılmıştır.

Jel tamamen boyadan arandıktan sonra görüntülenmesi yapılmıştır. Bu işlem sonucunda protein bandının jeldeki yeri ve renkli protein işaretleyicisinin hangi renkli bandının hizasında olduğu belirlenmiştir.

Jelden Apo A1 proteinin izolasyonu

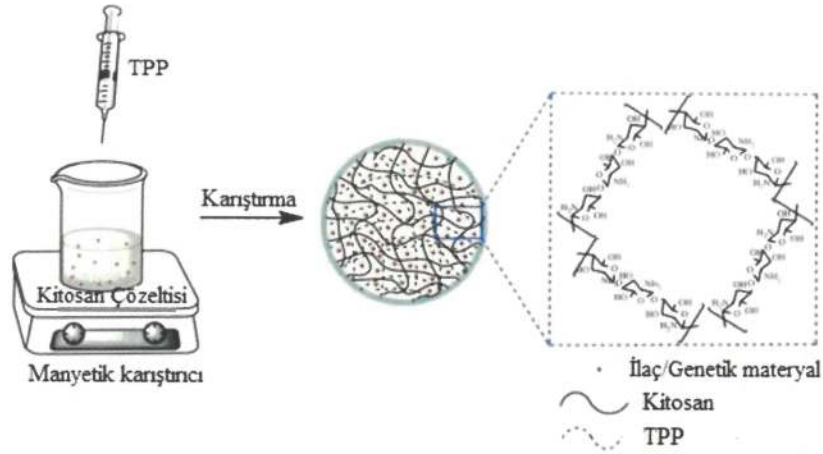
1. Yürütme tamamlandıktan sonra ikinci jel elektroforezden çıkarılarak kaba aktarılmıştır ve distile su ile yıkanmıştır,

2. Sonra işaretleyicinin daha önceki jelde belirlenen, proteinin moleküler ağırlığına denk gelen renkli bant hizasında jel yatay olarak bir şerit şeklinde kesilerek çıkarılmıştır,
3. Kesilip çıkarılan jel şeridi 3-4 mm' lik kareler şeklinde parçalanmıştır,
4. Bundan sonra jel parçaları 15 mL' lik tüplere aktarılarak üzerlerine 4 mL distille su konulmuştur ve gece boyunca çalkalanmaya bırakılmıştır,
5. Ertesi gün tüpler çalkalayıcıdan alınarak, jel parçalarının çökmesi için santrifüj edilmiştir ve sıvı kısım (protein içeren çözelti) alınarak ayrı tüplere aktarılmıştır,
6. Tüplere aktarılan protein çözeltisini daha yoğun hale getirmek için, hacmi 500 µL olan, 5-10 kDa'luk protein konsantre edici (vivaspin) kolonlar kullanılmıştır, kolonlara aktarılan protein çözeltisi uygun olan g kuvveti ve süre boyunca santrifüj edilerek konsantre hale getirilmiştir.

Elde edilen protein çözeltisi kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

4.4. Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanma Çalışmaları

Kitosan nanopartikülleri, daha önceden de belirtildiği gibi farklı hazırlanma teknikleri kullanılarak hazırlanabilmektedir. Bizim çalışmamızda kitosan nanopartikülleri iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Şekil 4.2.). İyonik jelleşme yöntemiyle üretilen kitosan nanopartikülleri, ilaç ve genetik materyal taşınması için üzerinde en çok çalışılan nanosistemlerden biridir. Sert olmayan ve sulu işleme koşulları, toksik olmayan reaktifler ve çok düşük enerji gereksinimleri, bu üretim yöntemini, oral ilaç taşınması, protein formülasyonu ve gen terapisi gibi biyolojik uygulamalar için çok elverişli kılmaktadır (Sreekumar vd., 2018). İyonik jelleşme ile kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kitosanın ve TPP'nin konsantrasyonları, oranları, kitosanın moleküler ağırlığı, kitosan çözeltisinin pH değeri, nanopartiküllerin boyut ve yüzey yüküne etki edebilecek farklı etkenler dikkate alınarak farklı formülasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar arasından en uygun olanı seçilerek diğer aşamalarda kullanılmıştır.



Şekil 4.2. İyonik jelasyon yöntemiyle kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması (Chen vd., 2017)

Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması için yüksek (high), ve düşük (low) moleküler ağırlıklı kitosanlar kullanılmıştır. Yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı kitosanların, %1 (h/h) asetik asit çözeltisi kullanılarak, pH değeri ~ 3 olan % 1 ve % 5' lik (a/h) farklı çözeltileri hazırlanmıştır. Kullanılan TPP çözeltisinin konsantrasyonu ise 0,7 mg/mL 'dir.

Tüm formülasyonların hazırlaması, Gan vd., geliştirdiği metod ile ve belirttiği koşullar sağlanarak yapılmıştır (Gan vd., 2005). Hazırlanan formülasyonların kodları ve içerikleri Tablo 4.2 ve 4.3'de verilmiştir. Buna göre, Kitosan-TPP nanopartiküllerinin hazırlanması için kitosan çözeltisinden belli bir miktar alınmış ve su eklenmesiyle gerekli konsantrasyona seyreltilmiştir. Seyreltilmiş kitosan çözeltisi daha sonra manyetik karıştırıcı üzerine konularak karıştırılmıştır. Kitosan çözeltisinin pH değerinin ayarlanması için çözelti üzerine gerekli miktarda 2M NaOH eklenmiştir. Çözeltinin pH'sı ayarlandıktan sonra TPP çözeltisi, karışmakta olan kitosan çözeltisinin üzerine damla damla eklenmiştir. TPP eklenmesi tamamlandıktan sonra formülasyon 30-60 dakika boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır.

4.4.1. Yüksek yoğunluklu kitosan kullanılarak yapılan formülasyon çalışmalarındaki koşullar

Yüksek yoğunluklu kitosan kullanılarak formülasyon hazırlama çalışmaları yukarıda belirtilen iyonik jelleşme metoduyla yapılmış ve Tablo 4.2'de oranları belirtilmiştir. Deney prosedüründe Karıştırma hızı 500 rpm ve süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Yüksek yoğunluklu kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların adlandırılması, formülasyon bileşimi.

Formülasyon kodu	Y.K1	Y.K2	Y.K3
Kitosan çözeltisi %0.05 (a/h)	560 µl	2 mL	2.8 mL
Kitosan Çözel-tisi pH değeri	3-4	3-4	3-4
0.7mg/ mL TPP çözeltisi	1	1	1
Kitosan/TPP kütle oranı	4/1	1,4/1	2/1

4.4.2. Düşük yoğunluklu kitosan kullanılarak yapılan formülasyon çalışmaları

Düşük kitosan kullanılarak formülasyon hazırlama çalışmaları yukarıda belirtilen iyonik jelleşme metoduyla yapılmış ve Tablo 4.3’de oranları belirtilmiştir. Deney prosedüründe Karıştırma hızı tüm formülasyonlar için 400 rpm ve karıştırma süresi K1, K2, K3 için 60, K4 için 30 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.3. Düşük yoğunluklu kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların adlandırılması, formülasyon bileşimi.

Formülasyon kodu	K1	K2	K3	K4
% Kitosan çözeltisi (a/h) /miktarı (mL)	0,05 /5,5	0,15/5,6	0,5/2,24	0,5/1,12
Kitosan Çözel-tisi pH değeri	4,5-5	4,5-5	4,5-5	6
0.7mg/ mL TPP çözeltisi	1	3	4	2
Kitosan/TPP kütle oranı	4/1	4/1	4/1	4/1

4.4.3. Yüzeyine HDL bağlı düşük yoğunluklu kitosan formülasyonların hazırlanması

Kitosan nanopartiküllerinin aktif hedeflendirilmesi için yüzeyinin kandan izole edilen HDL ile kaplanmasına için, kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması için kullanılan iyonik jelasyon yöntemi, modifiye edilmiştir. HDL yüzey modifikasyonlu kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması için, önce farklı miktarlarda olan kandan izole edilmiş HDL solüsyonu, TPP çözeltisine eklenerek karıştırılmıştır. Sonra bu HDL/TPP çözeltisi damla-damla % 0,5 kitosan çözeltisinin üzerine eklenmiş ve 400 rpm’de 30 dakika süre ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan Kitosan ve TPP miktarları, K3 formülasyonu baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların içerikleri ve kodları Tablo 4.4.’de verilmiştir.

Tablo 4.4. HDL ve düşük yoğunluklu kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların adlandırılması, formülasyon bileşimi.

Formülasyon kodu	K3-H1	K3-H2	K3-H3	K3-H4
% Kitosan çözeltisi (a/h) /miktarı (mL)	0,5 /2,24	0,5 /2,24	0,5 /2,24	0,5 /2,24
Kitosan Çözel-tisi pH değeri	4,5-5	4,5-5	4,5-5	4,5-5
0.7 mg/ mL TPP çözeltisi	4	4	4	4
Kitosan/TPP kütle oranı	4/1	4/1	4/1	4/1
HDL çözeltisinin hacmi (5,7 mg/mL)	500µl	250µl	100µl	75µl

4.5. Genetik Materyalin (DNA ve siRNA) Taşıyıcı Sistemlere Yükleme Çalışmaları

Formülasyonların genetik materyal taşınması için optimizasyon çalışmalarında öncelikli olarak GFP (Green Floresan Protein) plazmid DNA'sı genetik materyal olarak kullanılmıştır. Proje kapsamında tedarik edilen siRNA miktarının çok az olması nedeniyle, laboratuvarımızda bulunan pDNA'nın, formülasyonların genetik materyal bağlamadaki optimizasyonu sırasında kullanımına yönelinmiştir. GFP pDNA yaklaşık 3705 bp uzunluğundadır ve siRNA'ya göre daha büyük bir moleküldür. Hazırladığımız formülasyonların pDNA'yı bağlar özellikte olması siRNA gibi küçük molekülün bağlanmasında daha aktif olacağı kanısı önceki çalışmalarımızdan bilinen bir sonuçtur. Bu nedenle, GFP pDNA ile genetik materyal taşınması için formülasyonların uygunluğu kanıtlandıktan sonra Bcl- 2 siRNA kullanımına geçilmiştir. Çalışmada kullanılan siRNA (*Santa Cruz Biotechnology*), Bcl- 2 mRNA'sına spesifik olarak hazırlanmış ticari bir üründür.

Genetik materyalin taşıyıcı sistemlere yüklenmesinde iki yöntem kullanıldı.

4.5.1. Enkapsülasyon Yöntemi

Enkapsülasyon, genetik materyalin taşıyıcı sistemler içerisine hapsolma işlemidir. Bu çalışmada enkapsülasyon işleminin gerçekleşmesi için, formülasyonların hazırlanma sırasında genetik materyalin belirli miktarları, kullanılan TPP çözeltisine ve bu çözelti de daha sonra kitosan çözeltisine damla damla eklenmiştir. TPP çözeltisine genetik materyalin eklenmesi, iyonik jelasyon yöntemiyle nanopartiküllerin oluşması sırasında, genetik materyalin nanopartiküllerin içine enkapsüle olmasına neden olmaktadır (Katas ve Alpar 2006).

4.5.2. Adsorpsiyon Yöntemi

Adsorpsiyon yöntemi negatif yüklü genetik materyalin pozitif yüzey yüklü partiküllerle elektrostatik etkileşim sonucu, partikül yüzeyine siRNA'nın adsorbe olmasına dayanmaktadır. Bu işlem için, HDL bağlanmış K3 formülasyonu (K3-H4) ve K3 formülasyonlarının farklı miktarlarına (8, 10, 12, 15 ve 20 µL) mikrotüplere aktarılmış üzerine 200 ng siRNA çözeltisi eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

4.6. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için yüzey morfolojisi, partikül boyutu ve PDI değerleri, Zeta potansiyeli ve pH değerleri belirlenmiştir.

4.6.1. Partiküllerin yüzey morfolojisinin incelenmesi

Yüzey morfolojisinin incelenmesi taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope, SEM) (Zeiss Ultra Fesem, Germany) ile yapılmıştır. Bunun için önce formülasyon distille su ile seyreltilerek, iki taraflı karbon bant yapıştırılmış örnek stub'ının üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kuruması için bekletilmiştir. Son olarak da örnekler püskürtme makinesi kullanılarak ince altın tabakası (100Å) ile kaplanmış ve yüksek vakumda ve 8kV hızlanma voltajında SEM vasıtasıyla görüntülenmiştir.

4.6.2. Partikül Boyutu

Formülasyonların partikül boyutu Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 100 µL örnek üzerine 900 µL su eklenerek karıştırılmış ve 100 ölçüm alınmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve bu 3x100 ölçümün sonucunda elde edilen ortalama değer formülasyonun partikül boyutu olarak kabul edilmiştir. Ölçüm işlemi 25 °C'de gerçekleştirilmiştir.

4.6.3. Zeta Potansiyel

Formülasyonların Zeta potansiyellerinin belirlenmesi için de Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılmıştır. Partikül boyutu ölçümünde kullanılan örnekler kullanılarak, formülasyonların Zeta potansiyel değerleri belirlenmiştir. 3x20 ölçümün ortalaması formülasyonun Zeta potansiyeli değeri olarak kabul edilmiştir. Ölçümlerde pH 7.4 ve 50 µS iletkenliğe sahip 0.22 µm filtreden geçirilmiş distile su kullanılmıştır. Elektrostatik hareketliliğin zeta potansiyeline dönüştürülmesinde Helmholtz-Smoluchowski eşitliği kullanılmıştır.

4.6.4. pH değeri

Formülasyonların hazırlanması için kullanılan çözeltilerin ve formülasyonların pH değerleri örnek hacmine bağlı olarak pH metre ya da pH indikatörleri kullanılarak belirlenmiştir. pH değerinin ayarlamaları 2M NaOH çözeltisi kullanılarak yapılmıştır.

4.7. Formülasyonların Genetik Materyal Bağlama Yetilerinin Belirlenmesi

Bu çalışma için, agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Enkapsülayon ve adsorbsiyon yöntemi ile formülasyonlara yüklenmiş genetik materyalin bağlanma oranlarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel hazırlamak için, belirli konsantrasyondaki agaroz tampon çözelti ile (DNA için TAE, siRNA için TBE) karıştırılıp ısıtılmış ve etidyum bromür eklendikten sonra jel tepsisine dökülüp donması beklenmiştir. Donan agaroz jelin üzerine jelin üzerini kapatacak şekilde tampon çözelti eklenmiş, örnekler yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jeldeki kuyucuklara uygulanarak elektiriksel alan içinde belli bir gerilimde yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında jel dökümentasyon sistemi (Uvitec Cambride, İngiltere) ile UV ışık altında görüntülenmiştir.

4.7.1. Jel retardasyon çalışmaları

Bu sistem, formülasyonların siRNA bağlama oranlarını ve bu oranların serum varlığında olası değişiminin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

Elektroforez işlemi için %1,5 veya %2 agaroz içeren jel hazırlanmıştır. Yürütme tamponu ve jel hazırlamak için siRNA için 1 X TBE, pDNA için 1XTAE çözeltisi kullanılmıştır.

%1,5'lik Agaroz jelin hazırlanması (100 mL);

1. 1.5 g agaroz 100 mL tampon çözeltisine eklenmiş ve manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözündürülmüştür,
2. Agaroz tam çözündükten sonra berrak jel çözeltisi yaklaşık 45 °C' ye kadar soğutulmuş sonra üzerine %5 oranında etidyum bromür (10 mg/ mL) eklenerek jel tepsisine dökülmüştür,
3. Dökülen jelin üzerine taraklar hemen yerleştirilmiş ve jel polimerleşmeye bırakılmıştır,
4. Jel tam polimerleştikten sonra jel tepsisi tanka aktarılmış ve üzerine tampon konularak taraklar çıkartılmıştır,

5. Örnekler üzerine yükleme tamponu konulmuş ve örnekler mikropipet yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir.
6. Örnekler, 50 mV uygulanarak ~2 saat jelde yürütülmüştür
7. Yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

4.8. Serum İçindeki Kararlılık

Hazırlanan formülasyonların genetik materyali serum bileşenlerine karşı koruması, formülasyonların en önemli özelliklerinden biridir. Formülasyonların bu özelliğinin belirlenmesi için siRNA yüklenmiş formülasyonların serum bileşenleri içeren besiyeri içerisindeki davranışları incelenmiştir. Bu işlem için transfeksiyon sırasında kullanılan oranda siRNA yüklü formülasyonlar, %10 FBS içeren DMEM ile 37 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır. 1, 4, 10, 24 ve 48 saat sonunda örnekler alınarak agaroz jele yüklenmiş ve görüntülenmiştir.

4.9. Hücre Kültürü

Hazırlanan formülasyonların etkinliğinin belirlenmesi için, HepG2 insan karaciğer kanseri hücre hattı ve L929 sağlıklı fare fibroblastı hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültürü için hücrelerin üretilmesi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Hücreler % 10 FBS, % 1 penisilin-streptomisin ve % 1 L-glutamin içeren DMEM ortamında kültüre edilmiştir,
2. Hücre kültürü 37 °C’ de % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren atmosfer koşullarında yapılmıştır,
3. Hücreler hızlı büyüme fazına ulaştığı zaman, 2 X Trypsin/ EDTA çözeltisi ile muamele edilerek flask duvarından kopması sağlanmış ve bundan sonra alt kültürlere ayrılmıştır.
4. Üretilmiş kültürlerin bir kısmı basamaklı olarak soğutulmuş ve hücre stoğu olarak -80 °C’ de muhafaza edilmiştir.

4.9.1. Sitotoksikite çalışmaları

İn vitro sitotoksikite testleri, herhangi bir madde veya bileşiğin, kültürdeki hücrelere karşı toksik olup olmadığını, genellikle belirlenmiş bir inkübasyon süresinden sonra hücre canlılığını ölçerek belirleyen metotlardır (Riss, Moravec ve Niles, 2011). Hücre canlılığı, belirli bir popülasyondaki canlı hücrelerin sayısıdır. Hücrelerin canlılık düzey-

leri ve/ veya proliferasyon oranları, hücre sağlığının bir göstergesidir. Fiziksel ve kimyasal ajanlar hücre sağlığını ve metabolizmasını etkileyebilir. Bu ajanlar, hücre zarlarının tahrip edilmesi, protein sentezinin önlenmesi, reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma, polioksinükleotit uzamasının engellenmesi ve enzimatik reaksiyonlar gibi farklı mekanizmalar yoluyla hücreler üzerinde toksisiteye neden olabilir (Aslantürk, 2018).

Bir ilacın etkisi hücreler üzerinde sitotoksik ve sitostatik etki olarak gözlemlenebilir. Sitotoksik etki toksik olma ve hücrelerin ölmesi, sitostatik etkiyse hücre büyümesinin inhibisyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu etkilerin belirlenmesi ise farklı sitotoksisite testleri aracılığıyla yapılmaktadır. Bu amaçla kullanılan testlerden biri de Mosmann tarafından geliştirilmiş olan MTT testidir (Mosmann, 1983). MTT testi, MTT' nin ((3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolyum bromür) canlı hücrelerde salınan mitokondriyal NAD(p)H' ye bağlı oksidoredüktaz enzimler tarafından çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürülmesine dayanır. Bu mitokondriyal enzimler, bazı hücre kültürü koşulları altında indirgeme reaksiyonu ile MTT' yi çözünmeyen formazanlara dönüştürme kabiliyetine sahiptir. MTT testi ile temel olarak, formazan kristallerinin miktarı ile ilgili olan mitokondriyal aktivite ölçülerek canlı hücrelerin miktarı belirlenir. Proliferatif hücreler daha yüksek oranda MTT' yi formazan kristallerine dönüştürücü reaksiyona sahipken, ölü veya yavaş büyüyen hücrelerde düşük metabolizma seviyeleri, düşük miktarda MTT dönüştürülmesi ile sonuçlanır. MTT uygulamasından sonra formazan kristalleri, dimetil sülfoksit ya da deterjan sodyum dodesil sülfat gibi bir çözelti ile çözündürülür. Bu nedenle formazan konsantrasyonları, 540 ila 720 nm arasında bir spektrofotometre ile ölçülebilir (Adan, Kiraz ve Baran, 2016).

Bu çalışmada geliştirilmiş formülasyonların hücreler üzerindeki etkileri MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. Testin uygulanması aşağıdaki ifade edildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

1. Hücreler kültüre edildikten sonra % 10 FBS içeren DMEM ortamında dağıtılarak süspansiyon haline getirilmiştir,
2. Hücre süspansiyonundan belli bir miktar *Thoma* lamı üzerine alınmış ve hücre sayısı belirlenmiştir,
3. Konsantrasyonu $10 \times 10^4/\text{mL}$ ' ye ayarlanmış hücre süspansiyonundan alınarak 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her kuyucuğuna 100 μL süspansiyon aktarılmıştır.

4. Sitotoksik etkiyi incelemek için 1 günlük üremeye bırakılan hücrelerin besiyerleri 2. gün formülasyonların farklı konsantrasyonlarını içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. Bazı kuyucuklara formülasyon konulmamış ve o kuyucuklardaki hücreler kontrol hücreleri olarak kullanılmıştır. Bu işlemler tamamlandıktan sonra plaklar 37 °C' de %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamında 24- 48 saat inkübasyona bırakılmıştır,
5. 24- 48 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki formülasyon ve besiyeri uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 20 µL (5 mg/mL) MTT boyası konulmuştur. MTT boyasının canlı hücrelerde formazan kristallerine dönüştürülebilmesi için 37 °C de 4 saat bekletilmiştir,
6. MTT boyası kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 200 µL DMSO konularak 30 dakika 37 °C' de etüvde bekletilmiştir,
7. 30 dakikalık inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücre canlılığını belirlemek üzere plaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır (Şenel vd. 2012),
8. Deney, formülasyonların her bir konsantrasyonu için 8 kuyuda yapılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir.

4.9.2. Transfeksiyon çalışmaları

Formülasyonların genetik materyali hücre içerisine aktarabilmelerinin belirlenmesi için kontrol siRNA olarak bilinen FITC-konjugeli kontrol siRNA kullanılarak transfeksiyon çalışmaları yapılmıştır. Kontrol siRNA, 19-25 nükleotid uzunluğuna sahip ve yapısına fluorescein bağlanmış siRNA dizisi (Control siRNA (Fluorescein Conjugate)-A, Santa Cruz Biotechnology)'dir. siRNA yapısına bağlanmış fluorescein 490 nm'de eksitasyon ve 514 nm'de emisyonu sahip floresan özellikli bir bileşiktir ve hücre içerisine girdiği zaman, floresan mikroskopunda yeşil renk olarak görülmektedir. Transfeksiyon çalışması, HepG2 ve L929 hücre hatlarında yapılmıştır. 200 ng FITC- siRNA 10 µL formülasyonlara ilave edildikten sonra 37 °C' de 30 dakika adsorbsiyon için inkübe edildikten sonra aşağıda belirtilen protokole uygun olarak hücrelere uygulanmıştır.

1. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına antibiyotiksiz %10 FBS içeren besiyeri ile hücre ekimi yapılmış ve 37 °C' de %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamında 24 saat inkübasyona bırakılarak, kuyucuklardaki hücre yoğunluğunun % 60- 70 oranına ulaşması sağlanmıştır,
2. 2. gün kuyucuklardaki besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılarak, kuyucuklar 1 X PBS tamponu ile yıkanmıştır,

3. FITC- siRNA adsorbeli formülasyonlar antibiyotiksiz ve FBS içermeyen besiyeri ile karıştırılarak kuyucuklara damla damla eklenmiştir,
4. Plakalar, 37 °C' de 6 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 6 saatlik inkübasyondan sonra formülasyon içeren besiyeri üzerine %20 FBS içeren besiyeri eklenerek tekrar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır,
5. 24 saat inkübasyondan sonra plakalar floresan mikroskobu altında incelenmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. HDL'nin Serumdan İzolasyon Çalışmaları

HDL'nin kandan izolasyonu için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Genel olarak lipoproteinlerin kandan ayrılması yöntemleri, polianyonlar üzerindeki negatif yüklü gruplar ile lipoproteinlerin protein kısımlarında pozitif yüklü gruplar arasında olabilecek etkileşim baz alınarak geliştirilmiş çöktürme ve lipoproteinlerin dansitesine dayanan ultrasantrifüjleme yöntemlerini içermektedir (Warnick, Nguyen ve Albers,1985).

Cell Biolabs Inc tarafından geliştirilmiş bu kit kandan HDL' yi saf olarak elde etmeyi sağlamaktadır. HDL Saflaştırma Kiti kullanarak HDL' yi seçici olarak çökeltmek, Dekstran Sülfat sayesinde gerçekleşir. Kit, ultrasantrifügasyona gerek olmadan HDL' nin izolasyonunu sağlar. Lipoprotein parçacıkları, bir dizi çökeltme ve düşük hızlı santrifüjleme aşamaları yoluyla yüksek oranda saflaştırılır. Kit kullanımıyla, insan serum veya plazma numunelerinden, numuneye bağlı olarak mL başına ~4.500 µg verim ile HDL izole edilebilmektedir (<http-3>).

Çalışmamızda, bu kit kullanımıyla gönüllülerden toplanan kandan HDL izolasyonu aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Her aşamada 24 mL kan kullanılmış ve çalışma sonunda ortalama olarak 14 mL saf HDL solüsyonu elde edilmiştir. Her izolasyon aşamasında elde edilen HDL solüsyonları bir tüp içinde stoklanmıştır. Stok solüsyondaki HDL'nin miktar tayini sonucunda, HDL-kolesterolün konsantrasyonunun 5,7 mg/mL olduğu bulunmuştur.

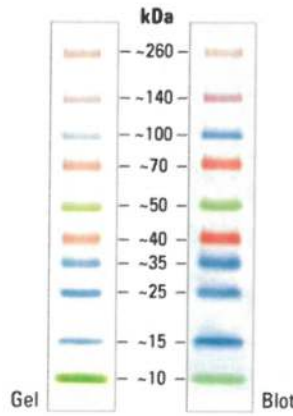
5.2. SDS-PAGE Çalışması

HDL'nin yapısında olan Apo A1 proteinini elde etmek için kit yardımıyla kandan izole edilmiş HDL'den bir miktar alınarak, SDS-PAGE çalışmasında kullanılmıştır. Çalışma bölüm 4.3'de belirtilen şekilde yapılmıştır.

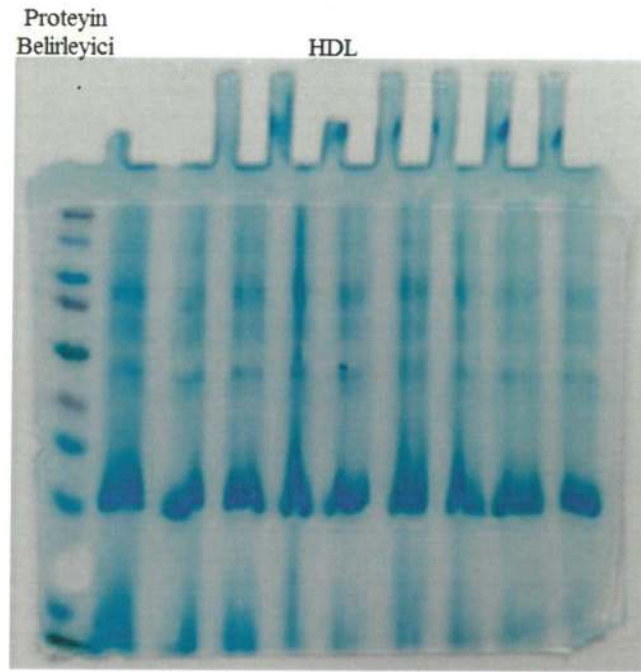
4 renkte ve 10 farklı kDa değerlerinde bant verme özelliğe sahip bir protein işaretleyicisi kullanılmıştır (Şekil 5.1). HDL partiküllerinin ana proteini olan ApoAI, 28.3 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir (Feng vd., 2006). Bu nedenle SDS jelde kullanılan işaretleyicideki 25 kDa ve 35 kDa'daki protein bantlarının arasındaki alana denk gelecek bir bant görülmesi gerekmektedir. Yürütme sonrası boyanan jellerde, bahsedilen alanda bant gözlemlenmiştir (Şekil 5.2.). Bu sonuç Apo A1 proteininin dolayısıyla HDL'nin kandan izole edildiğini ve saflaştırıldığını işaret etmektedir. Jel üzerindeki gö-

rülen farklı protein bantları açısından sonuçlarımız, daha önce Brace vd tarafından yapılan HDL'nin SDS-PAGE çalışmasındaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Brace vd., tarafından yapılan çalışmada Apo A1 proteininin SDS-PAGE jeli üzerinde verdiği bant 25 kDa' dan daha düşük kDa değerine karşılık gelen bölgede gözlemlenmiştir (Brace vd., 2010). Fakat bizim çalışmamızda Apo A1 proteininin bandı 25 kDa ile 35 kDa arasındaki bölgede görülmüştür ki bu bölge Apo A1 proteininin moleküler ağırlığına denk gelmektedir.

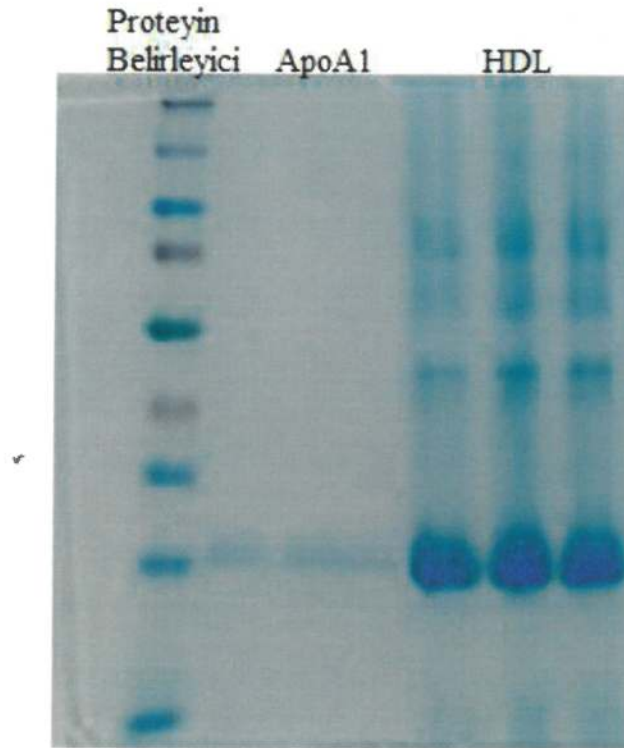
Apo A1 proteinin jelden izolasyon işlemi bölüm 4.3'de belirtilen şekilde yapılmıştır. İzolasyon işleminden sonra elde edilen çözeltinin protein içerip içermediği SDS jele yüklenerek kontrol edilmiştir. Bu işlem sonucunda, yalnız bir yerde (25 kDa ve 35 kDa aralığında) bant gözlemlenmiştir ki bu Apo A 1'in jelden izole edilebildiğini göstermektedir (Şekil 5.3.).



Şekil 5.1. Proteinlerin molekül ağırlığını belirlemek için kullanılan işaretleyici. (4 farklı renkte 10 tane bant) (<http-4>).



Şekil 5.2. HDL 'nin SDS-PAGE görüntüsü



Şekil 5.3. Apo A1 proteininin izolasyonu sonrası SDS-PAGE görüntüsü

5.3. Kitosan Nanopartiküllerinin Formülasyon Çalışmaları

Bir kitin türevi olan kitosan ve onun türevleri, diğer sentetik katyonik polimerlere kıyasla mükemmel biyouyumluluk, düşük immünojeniklik ve düşük sitotoksositeye sahiptir. Diğer yandan kitosan, genetik materyali etkili bir şekilde bağlayabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı kitosan, genetik materyal taşınması için büyük ilgi görmektedir (Yoo vd., 2005; Köping-Höggård 2004). Sağladığı bu avantajlardan dolayı çalışmamızda kitosan kullanılarak genetik materyal taşınması için taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.

5.3.1. Partikül boyutu ve dağılımı

Partikül büyüklüğü ve boyut dağılımı partikül sistemlerin en önemli özelliklerindendir. Bu özellikler taşıyıcı sistemlerin *in vivo* dağılımını, biyolojik davranışlarını, toksisitesini ve hedefleme yeteneğini belirler. Bunların yanı sıra parçacık büyüklüğü ve boyut dağılımı, taşıyıcı sistemlerin ilaç yüklemesi, ilaç salımı ve stabilitesini de etkilemektedir. Birçok çalışma nanopartiküllerin, mikropartiküllere kıyasla aktivite avantajlarına sahip olduğunu göstermiştir, bu da boyut farklılığının önemini işaret etmektedir. Nanopartiküllerin hücresel alımlarının, mikropartiküllere oranla yüksek olduğu bilinen bir gerçektir. Ayrıca nanopartiküller, küçük boyut ve hareketliliklerinden dolayı daha geniş bir yelpazedeki hücresel ve hücre içi hedeflemeleri olası kılmaktadır (Singh ve Lillard, 2009). Nanopartiküllerin partikül boyutu ve yüzey yükleri, hücrelere bağlanma ve etkileşimlerinde anahtar rol oynamaktadır. Reseptör aracılı endositoz ile hücrelere alımında 100-200 nm boyutundaki nanopartiküllerin uygun olduğu, daha büyük parçacıkların fagositoz ile alınması gerektiği literatürlerde yer almaktadır. Daha küçük boyuttaki nanopartiküller, yüzey enerjileri endositoz işleminde ihtiyaç duyulan içeri doğru bükme enerjisi için yetersiz kaldığından, küçük kapsülleme verimliliğine sahip olduğundan ve çok hızlı ilaç salımı gerçekleştirdiğinden tercih edilmemektedirler (Kulkarni ve Feng, 2013). İyonik jelasyon yöntemiyle kitosan partikülleri hazırlanmasında, kitosanın molekül ağırlığı, kitosan konsantrasyonu, kitosan/TPP ağırlık oranı, çözelti pH değeri, ortamda tuzların olup olmaması, kitosanın asetilasyon derecesi gibi faktörler hazırlanan nanopartiküllerinin boyutlarına etki etmektedir (Gan vd., 2005; Sreekumar vd., 2018). Bu nedenle, bu faktörler göz önünde bulundurularak ve farklı kombinasyonlar denenerek formülasyonların hazırlanmasına çalışılmıştır.

Yüksek molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonlar, formülasyon geliştirmede ön formülasyon olarak hazırlanmıştır ve partikül boyutları ile dağılımı 7.000 ± 100 ile 9.000±100 nm arasında ve 0,9±0,1 ile 1,000 arasında bulunmuştur (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm) ± SH	PDI ± SH	Zeta Potansiyel (mV) ± SH
Y.K1	7000 ± 100	0,9±0,1	15 ± 1,9
Y.K2	7700±50	1,000	5 ± 1,1
Y.K3	9000±100	1,000	-7,45 ± 1,89

Düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak yapılan çalışmalarda partikül boyutunun küçük olması için genellikle birçok faktörün etkisi dikkate alınarak çalışmalar yapılmaktadır. Bu etkenlerden biri de, kitosan/TPP kütle oranıdır. Kitosanla yapılan farklı çalışmalarda farklı kitosan/TPP oranları kullanılmıştır (Sreekumar vd., 2018; Gan vd., 2005; Othman vd., 2018). Yaptığımız denemeler sonucunda kitosan/TPP için 4/1 oranı kullanılmasının partikül boyutu açısından uygun sonuçların elde edilmesini sağladığını belirledik (Tablo 5.2.).

Tablo 5.2. Düşük molekül ağırlıklı kitosan kullanılarak yapılan çalışmaların partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm) ± SH	PDI ± SH	Zeta Potansiyel (mV) ± SH
K1	300 ± 30	0,45 ± 0,05	23 ± 0,2
K2	261 ± 24	0,45 ± 0,05	20 ± 0,3
K3	170 ± 10	0,285 ± 0,05	36 ± 0,1
K4	210 ± 10	0,3 ± 0,05	32 ± 0,5

Yapılan çalışmalarda parçacık boyutuna ve parçacık boyut dağılımına etki eden bir diğer faktörün karıştırma hızı olduğu belirtilmektedir. Al-Nemrawi vd., tarafından, karıştırma hızının 500 rpm' den 1.500 rpm'e yükseltilmesiyle partikül boyut ve dağılımında azalma gözlemlendiği belirtilmektedir (Al-Nemrawi vd., 2018). Çalışmamızda genetik materyal ve protein yapı kullanılacağı için, yüksek hızda karıştırmanın bu materyallere zarar

verebilme olasılığını göz önünde bulundurarak, formülasyonları olabilecek en düşük rpm’de küçük partikül boyutu elde edilebilecek şekilde optimize edilmiştir. Karıştırma hızıyla ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, 1.500 rpm gibi sert mekanik etki oluşturan bir karıştırma hızına gerek kalmadan, 400 rpm karıştırma hızı kullanılmasıyla yeterince küçük parçacık büyüklüğüne sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Düşük yoğunluktaki kitosan kullanılarak elde edilen partikülleri boyutları ve dağılımları 160 ± 10 nm ile 300 ± 30 nm ve $0,285 \pm 0,05$ ile $0,45 \pm 0,05$ aralığında bulunmuştur.

K3 ve K4 formülasyonlarında karıştırma süresi ve pH değeri dışında tüm parametreler aynı olsa da partikül boyutu arasındaki fark görülmektedir. Bu farkın ilk bakışta karıştırma süresinden kaynaklandığı düşünülebilir fakat K4 formülasyonunun yarım saat ve bir saat karıştırılarak hazırlanması sonucunda partikül boyutunda fark gözlemlenmiştir. Bu nedenle K3 ve K4 formülasyonunları arasında olan partikül büyüklüğü farkının pH’ya bağlı olduğu düşünülmektedir. Kitosan zayıf bir baz polisakarittir ve nötr ya da alkali pH değerlerinde çözünmez. Asidik bir ortamda amin grupları, pozitif olarak yüklenir. Dolayısıyla, kitosan moleküllerinin yüzey yükü yoğunluğu, çözelti pH’ına güçlü bir şekilde bağlıdır ve kitosan-TPP nanoparçacıklarının oluşumu için iyonik çapraz bağlama işlemi, pH’ya bağlıdır (Gan vd., 2005; Bhumkar ve Pokharkar, 2006). Bu nedenle pH değerinin 4,5’den 6’ya çıkartılması, çapraz bağlanmaya etki göstererek partikül boyutunun artmasına neden olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak Tablo 5.2’den de görüldüğü üzere düşük molekül ağırlıklı kitosanla yapılan formülasyon çalışmaları yüksek molekül ağırlıklı kitosana kıyasla çok daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu formüllerden K3 daha küçük parçacık büyüklüğü ve PDI değerine sahip olduğu için K3 kullanımının transfeksiyon çalışmalarında daha verimli sonuçlar vereceği düşünülmüştür.

5.3.2. Zeta Potansiyel Değeri

Zeta potansiyel, kolloidal sistemlerde elektrokinetik potansiyeli ölçmek için kullanılan bir değerdir. Bu değer, bir ortamda, dağılmış partiküle bağlı sıvı tabakası ile o dispersiyon ortamı arasındaki olan potansiyel farktır ve partikülün yüzey yükünün göstercisidir (Harmata ve Guelcher, 2016). Zeta potansiyelini etkileyen en önemli faktör ortamın pH’ıdır. Bunun yanı sıra iyonik kuvvet, herhangi bir maddenin konsantrasyonu ve sıcaklık da Zeta potansiyeli etkileyen faktörlerdendir (Lu ve Gao, 2010).

Zeta Potansiyel, partiküllerin stabilitesi üzerinde önemli etkiye sahiptir. Zeta potansiyeli +30 mV' den yüksek veya -30 mV' den düşük olan partiküller stabil kabul edilir (Kadu vd., 2011). Sıfıra yakın Zeta potansiyeli veya hafif yüklü yüzeyleri olan parçacıklar daha hızlı agregasyon eğilimindedir (Gumustas vd., 2017). Zeta potansiyel sadece partiküllerin kararlılığını değil, aynı zamanda salın hızlarını, kanda dolaşım sürelerini ve hücrelere alımlarını da etkiler (Honary ve Zahir, 2013).

Zeta potansiyel, gen taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon etkinliğini de etkilemektedir. Genetik materyaller negatif yüklü oldukları için onların taşınmasında, pozitif yüzey yük yoğunluğuna sahip taşıyıcı sistemlere gerek duyulur. Pek çok protein ve hücre zarı yüzeyleri hafif anyonik olduğundan, pozitif bir Zeta potansiyel, yalnızca genetik materyal yükleme etkinliği için fayda sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hedef hücrelerde etkili bağlanmayı da sağlar (Honary ve Zahir, 2013). Bu da genetik materyalin hücrelere daha etkin bir şekilde transfekte olmasına neden olur. Zeta potansiyelin artmasıyla hücrelere genetik materyal transfeksiyonunda artışın olduğu yapılan çalışmalarla ispat edilmiştir (Takeuchi vd., 1996).

Zeta potansiyel değeri, uygulanan bir elektrik alanının etkisi altında bir hücrede hareket eden partikülün hızı ölçülerek belirlenir (Fonte vd., 2012). Bizim çalışmamızda Zeta potansiyel ölçümü için Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılmıştır ve yüksek yoğunluklu kitosan ile hazırlanan nanopartiküller için $-7,45 \pm 1,89$ ile $15 \pm 1,9$ arasında, düşük yoğunluklu kitosan kullanılarak hazırlanan nanopartiküller için 20 ± 0.3 ile 36 ± 0.1 arasında değerler bulunmuştur (tablo 5.1 ve 5.2).

Tablo 5.1. ve 5.2' de verilen değerler dikkate alındığında, düşük moleküler ağırlıklı kitosan formülasyonlarının yüksek molekül ağırlıklı kitosan formülasyonlarına kıyasla daha yüksek Zeta Potansiyel ve daha düşük partikül boyutu ile dağılımına sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle diğer çalışmalar için düşük molekül ağırlıklı kitosan formülasyonların kullanımına yönelinmiştir. Bu formülasyonlar arasında da K3 ve K4 formülasyonları değerlendirilmeye alınmıştır. K3 formülasyonunun partikül boyutunun 170 ± 10 nm, zeta potansiyelinin 36 ± 0.1 mV olması ve K4 formülasyonuna göre (210 ± 10 nm ve 32 ± 0.5 mV) hücresel alım ve kararlılık açısından daha uygun olacağı düşündürdüğünden, ideal formül olarak **K3** formülasyonu seçilmiştir.

5.4. HDL ile Yapılan Formülasyon Çalışmaları

HDL'nin yapısında bulunan ve onun ana yapı taşı olan molekül Apo A1 lipoproteindir. HDL üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda Apo A1'in HDL partikülünün dış kısmını sardığı belirlenmiştir. Apo A1'in yapı ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi gibi araştırmalar genellikle Apo A1'in farklı çapraz bağlayıcılarla bağlanmasıyla gerçekleştirilmiştir (Edelstein, Halari ve Scanu, 1982; Swaney ve O'Brien, 1976; Melchior vd., 2017). Bunun yanı sıra az da olsa Apo A1 ve Apo E, Apo B 100 gibi diğer lipoproteinlerin, çapraz bağlayıcılar aracılığıyla ilaç taşıyıcı sistemlere bağlanması çalışmaları da bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda, Apo A1, Apo E, ve Apo B 100 lipoproteinler, albumin nanopariküllerinin yüzeyine bağlanmıştır (Michaelis vd., 2006; Kreuter vd., 2007) ve hücresel alımda etkinliği kanıtlanmıştır. Bu çalışmalarda, bu lipoproteinler modifiye edilerek albümin nanopartiküllerine bağlanmıştır. Bu projede ise, bu çalışmalardan farklı olarak, nanopartikül yüzeyine sadece Apo A1'in bağlanması değil, HDL'nin bağlanması hedeflenmiştir. Böylelikle, HDL yapısında bulunan Apo A1'in saflaştırılmasına veya Apo A1'in yapısında modifikasyona gerek gerek duyulmadan HDL ile birlikte bağlanması üzerine yoğunlaşmıştır.

Çapraz bağlayıcıların proteinlerin yapısında bulunan lizin amino asidinin amin gurupuna ($-NH_2$) bağlanması, proteinler ile ilgili yapılan biyokimyasal çalışmalarla belirlenmiştir (Leavell, vd., 2004). Apo A1 ile yapılan bazı biyokimyasal çalışmalardan da kullanılan çapraz bağlayıcının, bu proteinde bulunan lizin gurupuna bağlandığı bilinmektedir (Melchior vd., 2017). Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan TPP de NH_2 guruplarına sahip iki molekül arasında bağ oluşturabilen bir çapraz bağlayıcıdır ve kitosanın nanopartiküllerinin oluşumu sırasında TPP molekülleri iki kitosan molekülünü, yapılarında bulunan NH_2 gurupları aracılığıyla birbirine bağlar. Bu hususları dikkate alınarak, hazırladığımız kitosan nanopartiküllerine, Apo A1'in lizin aminoasit kalıntısında bulunan $-NH_2$ gurubuyla, kitosanın $-NH_2$ gurupları arasında TPP araçlı çapraz bağ oluşturmak koşuluyla, HDL partiküllerinin bağlanması sağlanmıştır.

Bu çalışma için genel olarak baz aldığımız bilgiler aşağıdakılardır;

1. Apo A1'in HDL'nin dış yüzeyinde bulunması (Kontush vd., 2015; Feingold ve Grunfeld, 2018),
2. Apo A1'in yapısında bulunan lizin aracılığıyla çapraz bağlayıcılarla bağlanabilmesi (Leavell, vd., 2004),

3. Kitosanın -NH₂ gurubuna sahip olması (Rinaudo, 2006)
4. TPP'nin, moleküllerin -NH₂ gurupları arasında bağ oluşturan çapraz bağlayıcı olması (Gan vd., 2005)

5.4.1. Partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel bulguları

Kitosan nanopartiküllerinin yüzeyine HDL bağlamak için farklı miktarlarda (Tablo 4.4.'de gösterilen) HDL çözeltisi kullanılarak nanopartiküller hazırlanmıştır ve partikül boyutu, dağılımı ve zeta poansiyelleri belirlenerek Tablo 5.3.'de sunulmuştur.

Tablo 5.3. HDL bağlı formülasyonların partikül boyutu, dağılımı ve zeta patansiyel değerleri

Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm) $\pm$ SH	PDI $\pm$ SH	Zeta Potansiyel (mV)
K3-H1	625 $\pm$ 75	0,75 $\pm$ 0,2	27 $\pm$ 1,0
K3-H2	460 $\pm$ 17	0,45 $\pm$ 0,05	29 $\pm$ 0,5
K3-H3	376 $\pm$ 26	0,4 $\pm$ 0,05	32 $\pm$ 0,2
K3-H4	240 $\pm$ 10	0,25 $\pm$ 0,05	34 $\pm$ 0,5

Elde edilen sonuçlara göre, HDL miktarı azaldıkça partikül boyutunda azalma gözlemlenmiştir. Bunun muhtemel nedeni fazla miktarlarda HDL kullanımının daha fazla HDL partiküllerinin, kitosan nanopartiküllerin yüzeyine tutunmasıdır. Hazırlanan formülasyonlar arasında K3-H4 formülasyonu diğer formülasyonlara kıyasla partikül boyutu ve dağılımı açısından uygun bulunmuştur. K3-H4 formülasyonu, yüzeyi HDL ile modifiye edilmemiş K3 formülasyonu ile partikül boyutu (170 $\pm$ 10 nm) açısından kıyaslandığında, K3-H4'ün K3'e oranla daha büyük olduğu gözlenmiştir. Bu da HDL'nin K3 formülasyonun yüzeyine bağlandığının göstergesidir. Genel olarak yüzey modifikasyonu yapılmış ve yapılmamış nanopartiküllerin boyutları arasında fark olduğu farklı ekipler tarafından yapılan çalışmalarda da belirtilmiştir. Apo A1'in albumin nanopartiküllerinin yüzeyine bağlanması çalışma sonucunda parçacık büyüklüğünde ufak da olsa (7 nm) bir artışın olduğu belirtilmiştir (Kreuter vd., 2007). Bu çalışmada ise, Apo A1'e kıyasla daha büyük boyutta olan HDL partiküllerinin kullanılması ile yüzey modifikasyonu yapılmış ve yapılmamış formülasyonlar arasında partikül boyutundaki artış daha yüksek bulunmuştur.

HDL ile modifiye edilmiş formülasyonların zeta potansiyelleri, birbirleri içerisinde ve K3 formülasyonu ile da kıyaslandığında, artan miktarlarda HDL'nin zeta ptansiyel değerlerini düşürdüğü belirlenmiştir (Tablo 5.3.). Bunun, HDL'nin yüzey yüküne bağlı bir

değişim olduğu ön görülmektedir. Davidson vd., tarafından HDL üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, HDL partiküllerinin yüzey yükünün düşük bir negatif değerde olduğu belirlenmiştir (Davidson., 1994). HDL bağlanmış formülasyonların zeta potansiyellerinin HDL miktarının artmasıyla azalması ve K3'e kıyasla düşük değerde olması, HDL partiküllerinin K3 formülasyonunun yüzeyine tutunarak yüzeyini modifiye ettiğini işaret etmektedir.

Sonuç olarak partikül boyutu, dağılım ve yüzey yükü değerlendirildiğinde, HDL bağlı formülasyonlar arasında K3-H4 formülasyonu en ideal formül olarak belirlenmiştir.

5.4.2. Formülasyonların pH değeri

Genel olarak pH değeri kitosan formülasyonların hazırlanması ve onların hücrelere uygulanması sırasında büyük önem taşıyan bir parametredir. Şöyle ki, formülasyonların hazırlanması sırasında kullanılan kitosan solüsyonunun pH değerine bağlı olarak, oluşan nanopartiküllerin Parçacık boyutu ve Zeta potansiyel değerleri değişmektedir (Gan vd., 2005). Parçacık boyutu ve Zeta potansiyel değerlerindeki değişimler de formülasyonların hücresel alımını dolayısıyla da genetik materyalin transfeksiyonunu etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda 6.5 pH değerine sahip kitosan formülasyonlarının 7.1 pH değerli formülasyonlara kıyasla daha etkin transfeksiyon sağladıkları gözlemlenmiştir (Lavertu vd., 2006). pH değerinin transfeksiyon üzerindeki bu etkisi, pH değerinin azalmasına bağlı olarak partiküllerin Zeta Potansiyel değerlerinin artması ve bu nedenle de pozitif yüklü partiküllerin negatif yüke sahip hücre yüzeyiyle etkileşiminin artmasından kaynaklanmaktadır (Nimesh vd., 2010).

K3 ve K3-H4 formülasyonlarının 5,5-6 aralığında pH değerlerine sahip oldukları saptanmıştır. Lavertu vd, tarafından belirtilen pH değeri (6,5) dikkate alınarak K3 ve K3-H4 formülasyonlarının pH'sının genetik materyal bağlama ve transfeksiyon için uygun değerde olduğunu ön görülmüştür.

5.4.3. Formülasyonun morfolojisi

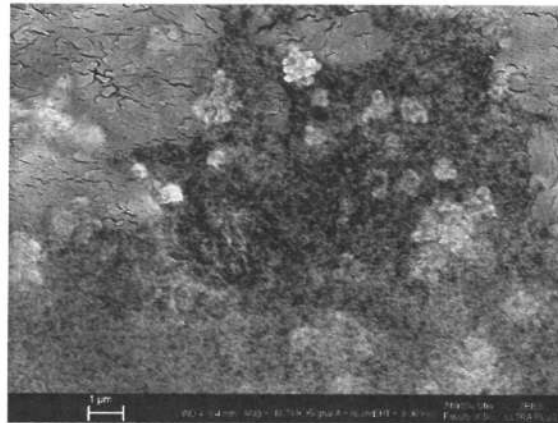
Nanopartiküllerin partikül boyutu ve yüzey yükünün yanısıra nanopartikül morfolojisi de, farmakokinetik ve hücresel alımı etkileyen önemli bir parametredir (Truong vd.,2015). Bu nedenle nanopartiküllerin morfolojisinin incelenmesi çok öneme sahiptir (Hall vd., 2007). Farklı nanopartiküllerin morfolojisinin incelenmesi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Kitosan nanopartiküllerinin morfolojisinin incelenmesinde SEM, TEM

ve AFM sıklıkla kullanılmaktadır (Anand vd., 2018; Bodnar, Hartmann ve Borbely, 2005).

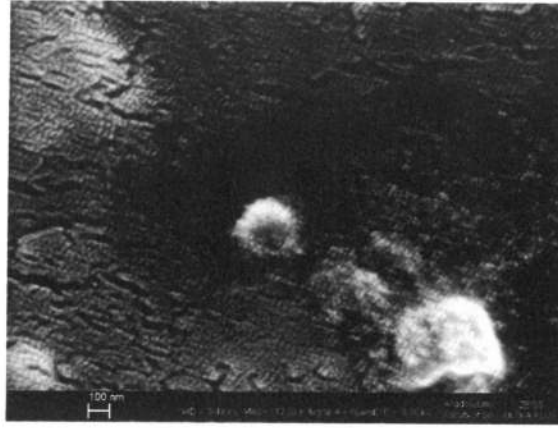
Hazırlanan formülasyonda HDL gibi küçük bir partikülün, ona kıyasla çok daha büyük bir kitosan nanopartikülünün yüzeyine bağlandığını düşündüğümüz zaman bu işlemin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için partiküllerin morfolojisinin incelenmesi büyük bir öneme sahiptir. Bu çalışmada formülasyonların morfolojisinin incelenmesi için SEM kullanılmıştır. Farklı ekipler tarafından daha önce yapılan çalışmalardan, kitosan nanopartiküllerinin küresel yapıda olduğu bilinmektedir (Patel, Parikh ve Aboti, 2013). Nanopartiküllerin SEM analizi sonucunda, K3-H4 nanopartiküllerinin de küresel yapıda olduğu ve partikül boyutlarının 200-300 nm aralığında olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.4.; Şekil 5.5.; Şekil 5.6.).



Şekil 5.4. K3-H4 formülasyonunun SEM görüntüsü (11,03K X büyütme)



Şekil 5.5. K3-H4 formülasyonunun SEM görüntüsü (18,74K X büyütme)

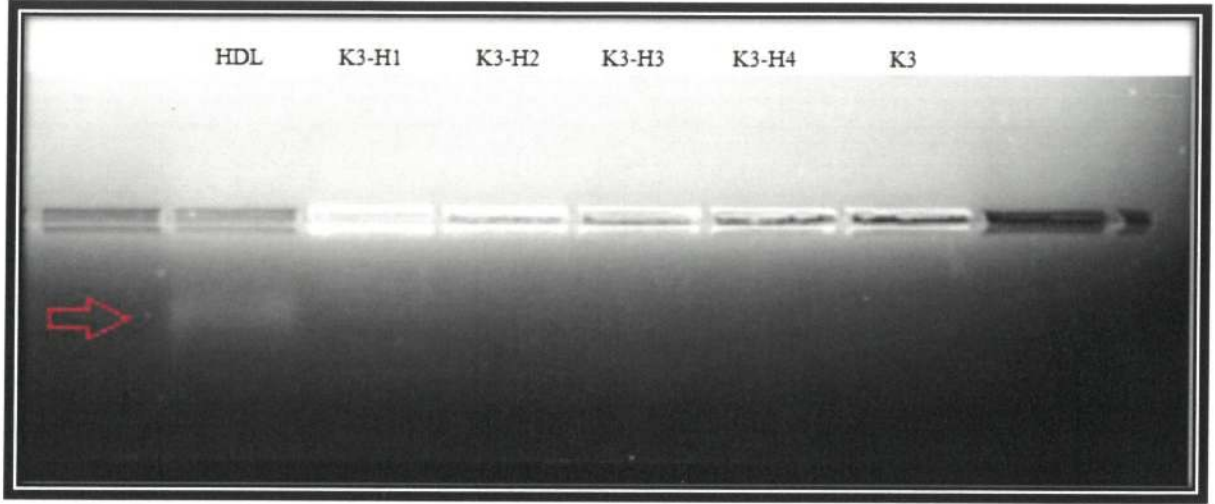


Şekil 5.6. K3-H4 formülasyonunun SEM görüntüsü (112,03K X büyütme)

5.5. HDL'nin formülasyonlara bağlanmasının belirlenmesi

HDL ile yapılan bazı çalışmalar, agaroz jelde yürütüldüğü zaman HDL'nin katoda doğru göç etmesine dayanmaktadır (Castro ve Fielding, 1988). HDL'nin bu özelliği HDL'nin diğer lipoproteinlerden ayrılması, miktar tayini ve bunun gibi biyokimyasal çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Conlon vd., 1979; Nauck vd., 1995). Yapılan çalışmalarda agaroz jelde yürütülmüş HDL'nin jelde yerinin belirlenmesi için önceden boyama gibi metodlar kullanılmaktadır (Kido vd., 2001; Conlon vd., 1979). Bu çalışmada, HDL'nin boyama yapılmadan da etidyum bromür (2,7 diamino-10 etil-9 fenil fenantidrium bromür) içeren jelde yürütülmesi sonucunda ışımaya verdiği tespit edilmiştir. Vincent ve Scherrer proteinlerin, etidyum bromür ile etkileşimlerini kullanarak SDS-PAGE sonrası etidyum bromür ile boyama yöntemini geliştirmiştir (Vincent ve Scherrer, 1979). HDL'nin yapısında proteinlerin bulunması onun agaroz jelde ışımaya vermesine neden olmaktadır.

HDL'nin bu özelliğinden faydalanarak, hazırlanan formülasyonların yüzeyine HDL'nin bağlanıp bağlanmadı agaroz jel ile de belirlenmiştir. Bu çalışmanın yapılmasının ana amacı, daha önceden de belirtildiği gibi negatif yüzey yüküne sahip HDL'nin, pozitif yüzey yüküne sahip partiküllerden uygulanacak bir elektrik akımı sonucu ayrılıp ayrılmayacağının belirlenmesidir. Burada beklenen, partikül yüzeyine bağlanmamış HDL'nin elektrik akımı ile katoda doğru sürüklenmesidir. Bu çalışma için hazırlanan formülasyonlardan 220 µL alınmış ve 30 µL yükleme tamponuyla karıştırılarak jele yüklenmiştir. Formülasyonların yanı sıra jele kontrol olarak serbest HDL ve K3 formülasyonu da yüklenerek akım uygulanmıştır. Jel görüntüsü Şekil 5.7.'de verilmiştir.



Şekil 5.7.: HDL, HDL bağlı Formülasyonların ve K3 Formülasyonunun agaroz jel görüntüsü

Ede edilen jel görüntüsünde, HDL'nin jel içerisinde sürüklendiği katota doğru sürüklendiği belirlenmiştir. Formülasyon yüklü kuyucuklardan HDL'nin sürüklenmediği görülmektedir. K3-H1, K3-H2, K3-H3 ve K3-H4 kuyucuklarında aynı miktarda formülasyon olmasına rağmen azalan bir ışımanın görülmesi, formülasyondaki HDL'nin oranına göre ışımayı arttırdığını işaret etmektedir. K3 formülasyonunun uygulandığı kuyucukta görünen ışımaya ise, daha önce kitosanla yapılan çalışmalarda olduğu gibi (Şenel, 2012) kitosanın agaroz jelde ışımaya verdiğini göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen veriler HDL'nin K3 formülasyonuna bağlandığını ispatlamaktadır.

5.6. Formülasyonlara DNA/siRNA yüklenmesi

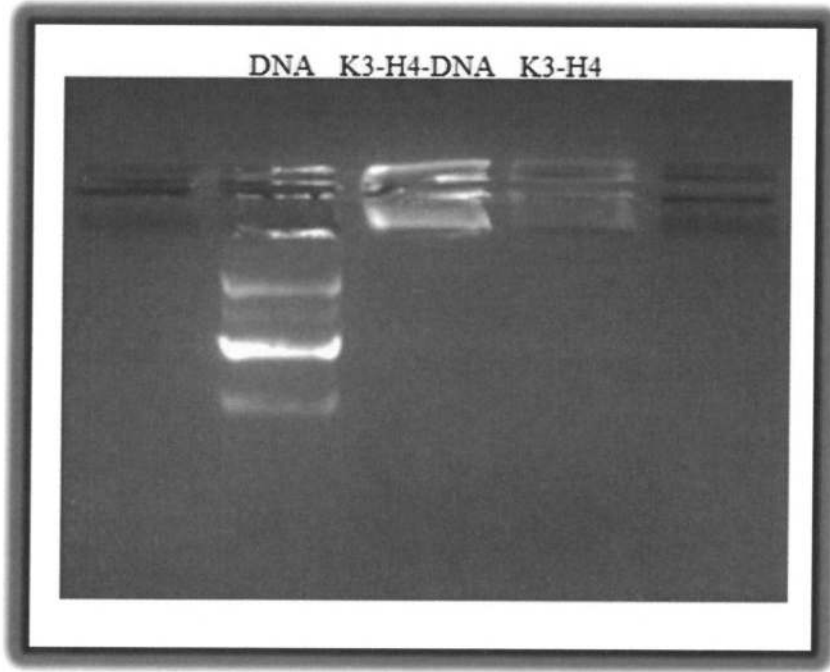
Kitosan nanopartiküllerine genetik materyalin yüklenmesi DNA'nın enkapsülasyonu ve siRNA'nın adsorbsiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

5.6.1. K3-H4 formülasyonuna DNA enkapsülasyonu

Kitosan nanopartiküllerine DNA enkapsülasyonu daha önce farklı ekipler tarafından yapılan çalışmalarla gerçekleştirilmiştir (Gaspar vd., 2010; Gan vd., 2005; Csaba, Köping-Höggård ve Alonso, 2009). Kiang vd., tarafından yapılan çalışmada kitosanın deasetilasyon derecesinde değişiklikler yapılarak, kitosan nanopartiküllerine büyük oranda DNA enkapsülasyonu başarılmış ve kitosanın DNA taşınması için çok avantajlı bir taşıyıcı sistem olabileceği ispatlanmıştır (Kiang vd., 2004).

K3-H4 Formülasyonuna pDNA'nın enkapsülasyonundan sonra formülasyon K3-H4-DNA olarak adlandırılmıştır. Formülasyona pDNA'nın enkapsüle edildiğinin belirlenmesi için, %1,5 agaroz jelle 750 ng pDNA, 25 µg pDNA enkapsüle edilmiş K3-H4-

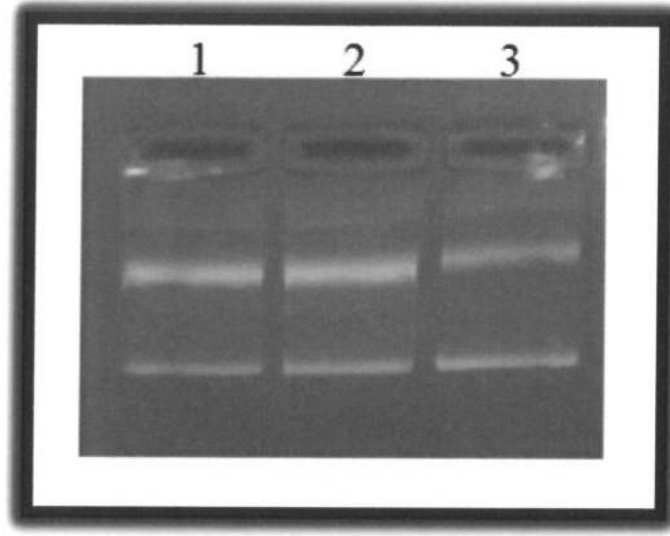
DNA formülasyonundan 100 μ L (750 ng pDNA içeren miktar) ve pDNA yüklenmemiş K3-H4 formülasyonundan 100 μ L jele yüklenmiştir ve jel görüntüsü Şekil 5.8’de sunulmuştur.



Şekil 5.8.: *DNA yüklü K3-H4-DNA Formülasyonunun agaroz jel görüntüsü*

Elde edilen jel görüntüsünde, K3-H4-DNA formülasyonunun pDNA’yı tamamen en kapsüle ettiği belirlenmiştir.

Kitosan ile enkapsülasyon işlemi için formülasyon hazırlanma sırasında, uygulanan karıştırma hızı (400 rpm), karıştırma süresi (30 dakika) ve ortam koşullarının (ortamda bulunan asetik asit) DNA’ya hasar vermesini belirlemek için çıplak DNA aynı koşula maruz bırakılarak, jele yüklenmiştir. Jel görüntülenmesi sonucunda kontrol DNA ile benzer olan bantlar görülmüş (Şekil 5.9.) ve bu formülasyon hazırlama koşullarının genetik materyale zarar vermediğini göstermiştir.

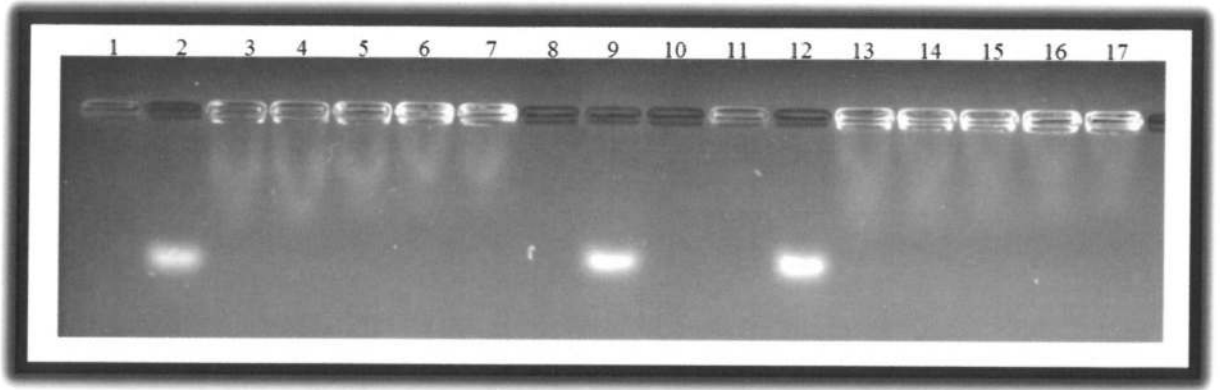


Şekil 5.9.: Formülasyon hazırlama koşullarının DNA'ya etkisi. 1. Kontrol DNA, 2. hızda su içinde karışıma bırakılmış DNA, 3. Asetik asit bulunan sulu ortamda karışıma bırakılmış DNA

5.6.2. Formülasyonlara siRNA adsorbsiyonu

pDNA'nın enkapsülasyonunun gerçekleştirilebildiği belirlendikten sonra siRNA'nın enkapsülasyonu çalışmasına geçilmek istenmiştir ancak, toplam formülasyon hacmi en az 3,25 mL olduğundan ve bunun için kullanılması gerekli siRNA miktarının 65 µg olması [transfeksiyon çalışmasındaki miktar (200 ng/10 µL) baz alındığında] gerektiği hesaplanmıştır. Ancak laboratuvarımızda yeterli siRNA bulunmadığından adsorbsiyon yöntemine geçilmiştir.

Enkapsülasyon yönteminin yanı sıra, doğal pozitif yüzey yüküne sahip olmasından dolayı, kitosan nanopartiküllerine DNA/siRNA yüklenmesi, adsorbsiyon yöntemi ile de gerçekleştirilmektedir (Mao, Sun ve Kissel, 2010). siRNA'nın hem K3 hem de K3-H4 nanopartiküllerine adsorbsiyonunu belirlemek amacıyla, 8µl, 10µl, 12µl, 15µl, 20µl formülasyonlar ayrı ayrı mikrotüplere alınmış ve her birine 200 ng siRNA eklenerek elektrostatik etkileşme için inkübasyona bırakılmış ve sonrasında jele yüklenerek görüntülenmiştir. Kullanılan miktarlar Tablo 5.4'te ve analiz sonuçları da Şekil 5.10'da görülmektedir.



Şekil 5.10.: *siRNA* adsorbe formülasyonların agaroz jel görüntüsü

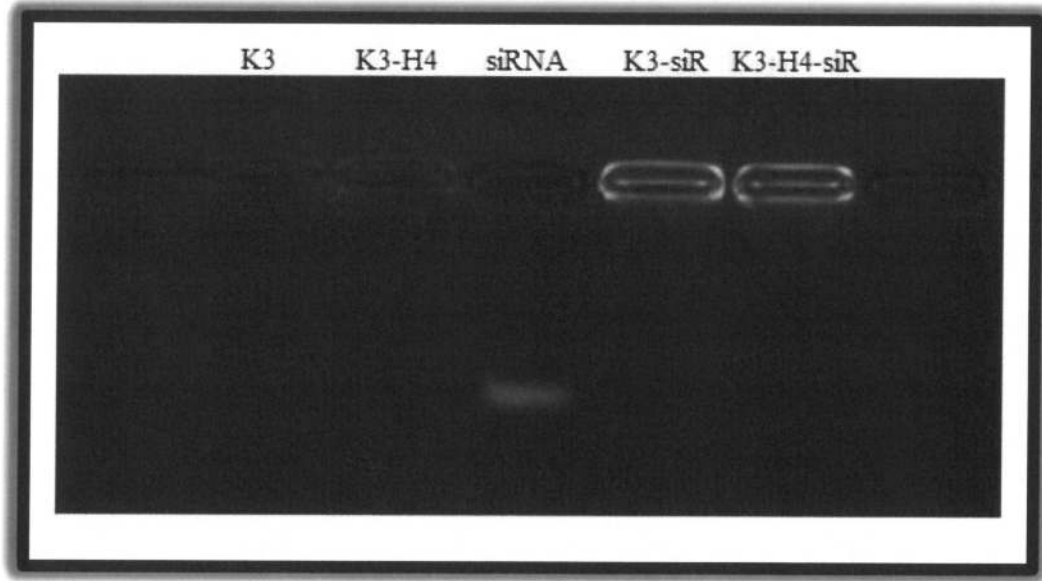
Tablo 5.4. Şekil 5.10. 'daki kuyucuklara yüklenmiş, *siRNA* 'nın ve *siRNA* adsorbsiyonu için kullanılmış olan K3, K3-H4 formülasyonlarının miktarları.

Kuyucuklar	siRNA(ng)	K3 (µL)	K3-H4(µL)
1	-	20	-
2	200	-	-
3	200	8	-
4	200	10	-
5	200	12	-
6	200	15	-
7	200	20	-
8			
9	200	-	-
10			
11	-	-	20
12	200	-	-
13	200	-	8
14	200	-	10
15	200	-	12
16	200	-	15
17	200	-	20

Elde edilen görüntüde, *siRNA* adsorbe edilmi formülasyonların bulunduğu kuyucukların altında parlamalar belirlenmiştir (Şekil 5.10.). Katas vd., tarafından yapılan çalışmada *siRNA* adsorbe edilmiş kitosan formülasyonlarının agaroz jelde görüntülenmesi sonucunda kitosan-*siRNA* yüklenmiş kuyucukların altında parlamalar gözlemlenmiştir ve bunun kitosan nanopartiküllerine bağlanmamış *siRNA* 'dan kaynaklandığı belirtilmiştir

(Katas ve Alpar, 2006). Bu çalışma da benzer ışımlar gözlenmiştir ancak, bu ışımların, Katas vd, tarafından yapılan çalışmadakinden farklı olarak, kontrol için kullanılan çıplak siRNA bandından geride kaldığı, bu nedenle bu ışımların partiküllere bağlanmamış siRNA'dan değil, önce partikülün yüzeyine tutunmuş olan fakat sonra uygulanan elektrik akımından dolayı partikülün yüzeyinden ayrılarak geriden sürüklenen siRNA'dan kaynaklı olduğunu göstermektedir (Büyükköroğlu vd., 2015).

Bu öngörünün doğrulanması için 20µL formülasyona 200 ng siRNA adsorbe edilmiş ve daha kısa sürede (30 dakika) ve daha düşük voltajda (40 mV) elektrik akımı uygulanarak jel çalışması tekrarlanarak görüntülenmiştir (Şekil 5.11.).



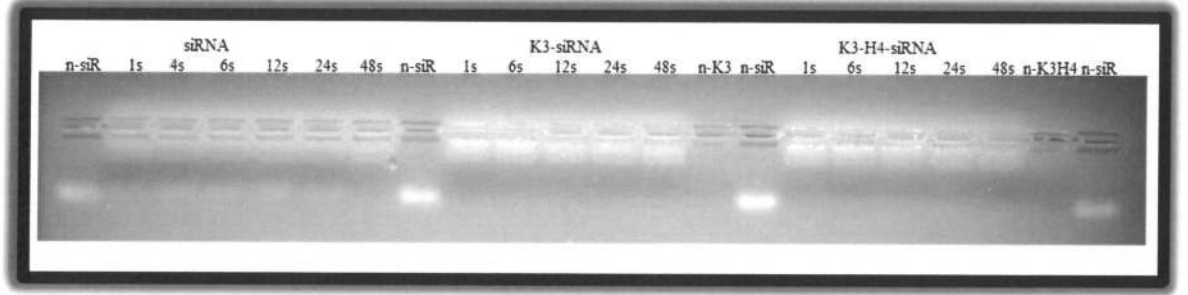
Şekil 5.11.: siRNA adsorbe formülasyonların agaroz jel görüntüsü

Bu çalışma sonucunda jelde daha önceki çalışmadaki gibi kuyucukların altında aynı parlamalar gözlemlenmemiştir. Şekil 5.10.'daki sonuç, Şekil 5.9.'daki daha önce bahsedilen parlamaların elektrik akımı sonucunda partikül yüzeyinden ayrılarak sürüklenen siRNA'dan kaynaklandığı doğrulanmıştır.

5.7. Serum kararlılık çalışması

Bir nanopartikülün taşıdığı genetik materyali nükleaz bozulumundan koruma yeteneği, önemli bir özelliktir. Hücrelerdeki maksimum aktivite için, siRNA'nın nükleazlar tarafından sindirilmesine karşı korunması gerekmektedir (Raja, Katas ve Wen, 2015). K3 ve K3-H4 formülasyonlarına adsorbe edilmiş siRNA'yı, serum varlığında enzim aktivitesine karşı ne kadar sürede koruyabildiğini saptamak için, çıplak siRNA, siRNA-K3 ve

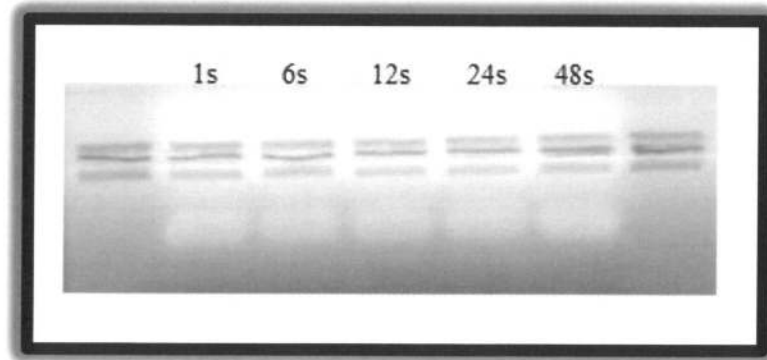
siRNA-K3-H4 formülasyonları farklı sürelerde (1, 6, 12, 24 ve 48 saat) serum içeren ortamda bekletilmiş ve agaroz jelde yürütülülerek görüntülenmiştir (Şekil 5.12).



Şekil 5.12.: Formülasyonların serum kararlılık çalışmasının agaroz jel görüntüsü

Daha önce siRNA ve siRNA yüklü kitosan nanopartikülleriyle yapılan serum kararlılık çalışmalarında çıplak siRNA'nın serumda 48 saatte tamamen parçalandığı fakat kitosan nanopartiküllerinin siRNA'yı koruduğu gözlemlenmiştir (Katas ve Alpar, 2006; Mao, Sun ve Kissel, 2010). Bu çalışma kapsamında da, daha önce yapılan çalışmalardaki gibi 48 saatlik süre sonunda çıplak siRNA'nın tamamen parçalandığı gözlemlenmiştir. Buna karşılık, K3 ve K3-H4 formülasyonlarının siRNA'yı 48 saat boyunca enzim degradasyonuna karşı koruduğu belirlenmiştir.

Jel görüntüsünde n-siR, n-K3 ve n-K3-H4 (sırasıyla serumda bekletilmemiş, çıplak siRNA, K3 ve K3-H4 formülasyonlarıdır) olarak isimlendirilen kuyucukları haricindeki tüm kuyucukların alt kısmında siRNA bandının yukarısında bantlar gözlemlenmiştir. Bu bantların serum içerisinde bulunan bileşenlerden kaynaklanabileceği düşünülmüş bu nedenle formülasyonlarla aynı sürelerde (1, 6, 12, 24 ve 48 saat) ve koşullarda bekletilen serum ortamı agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir (Şekil 5.13).



Şekil 5.13.: Formülasyonların serum kararlılık çalışmasının agaroz jel görüntüsü

Serum ortamının agaroz jelde yürütülmesi sonucunda da Şekil 5.12’de görülen bantlar elde edilmiştir. Bu sonuç, bu bantların siRNA ya da formülasyon kaynaklı değil serumdan kaynaklı olduğunu işaret etmektedir.

5.8. Formülasyonların Sitotoksitesitesi

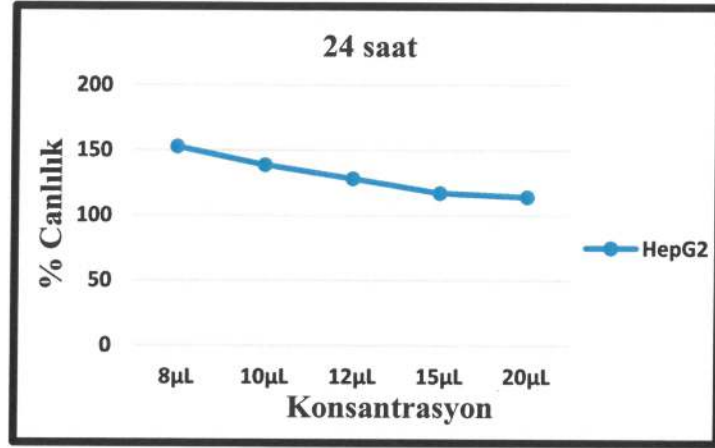
Sitotoksite çalışmalarında formülasyonların hücreler üzerinde olan etkisini belirlemek için MTT testi kullanılmıştır. Sitotoksitesite çalışmaları, partikül boyutu, zeta potansiyel değerleri ve genetik materyal bağlama yetisi değerlendirilmiş ve uygun bulunmuş K3 ve K3H4 formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Sitotoksite çalışmasında hücrelere uygulanan formülasyonların dozları Tablo 5.5.’de sunulmuştur.

Tablo 5.5. Sitotoksitesite testi için kullanılan K3 ve K3H4 formülasyonlarının miktarı

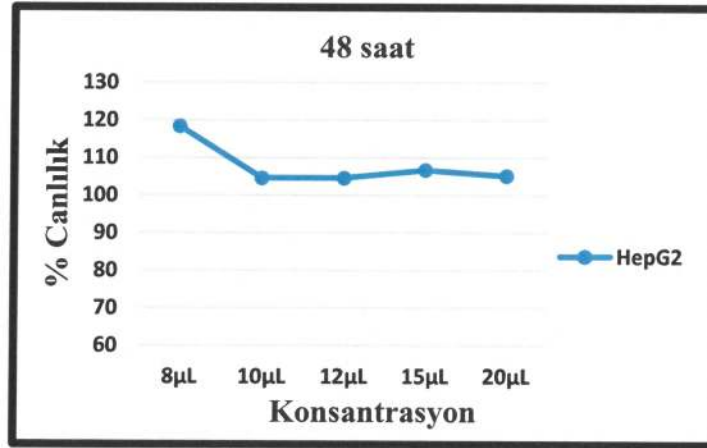
Formülasyon (µL)	Besiyeri (µL)	Kitosan Konsantrasyonu (µg/mL)
8	92	169,6
10	90	212,0
12	88	254,4
15	85	318,0
20	80	424,0

Yapılan bazı çalışmalarda kitosanın non-toksik özellikli bir polisakkarit olduğu belirtilmektedir (Jain vd 2016; Csaba, Köping-Höggård ve Alonso, 2009). Bunların yanı sıra kanserli hücreler ile yapılan bazı çalışmalar sonucunda kitosan nanopartiküllerinin farklı kanser hücreleri üzerinde belli konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği de belirlenmiştir. Bu özelliğinden dolayı kitosan nanopartiküllerinin kanser tedavisi için kullanılması önemli bir avantaj sağlamaktadır. Qi vd., tarafından yapılan çalışmada karaciğer kanseri hücre hattında (BEL7402), kitosan nanopartiküllerinin hücre büyüme ve proliferasyonunu durdurarak sitotoksik etki gösterdiği, ancak, sağlıklı karaciğer hücrelerinde bu etkisinin az olduğu belirlenmiştir (Qi vd., 2005). Kitosan nanopartiküllerinin HepG2 karaciğer kanseri hücre hattına uygulanması sonucunda belli bir konsantrasyonda (239µg/mL) hücrelerde sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür (Loutfy, 2016). Bu çalışmada K3 ve K3H4 formülasyonlarının hücrelere uygulanması sonucunda hücrelerde belli bir aralıktaki konsantrasyonlarda ciddi sitotoksik etki gözlemlenmese de bir noktadan sonra konsantrasyondaki artışa bağlı sitotoksik etkinin arttığı görülmüştür (Şekil 5.14-

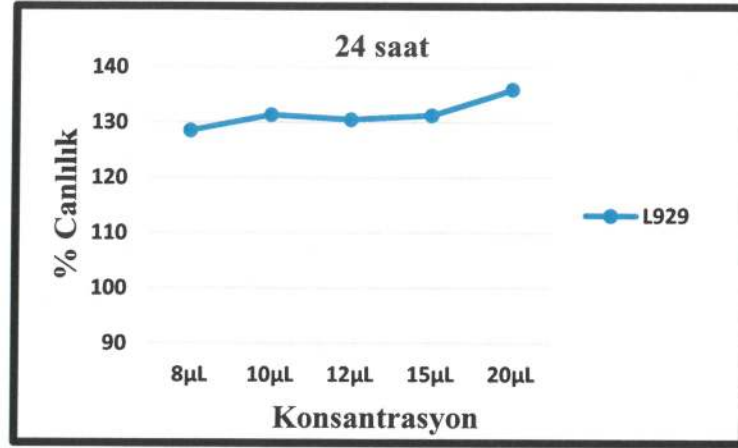
5.21). Bu açıdan çalışmamızın sonucu daha önce belirtilen çalışmaların sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.



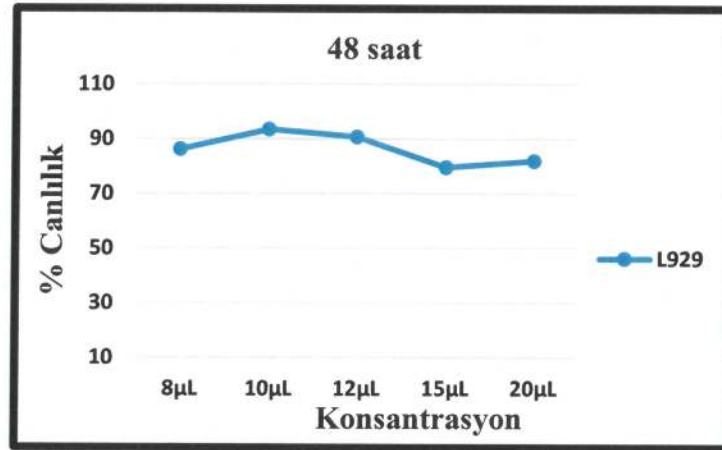
Şekil 5.14.: K3 formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi (n=3)



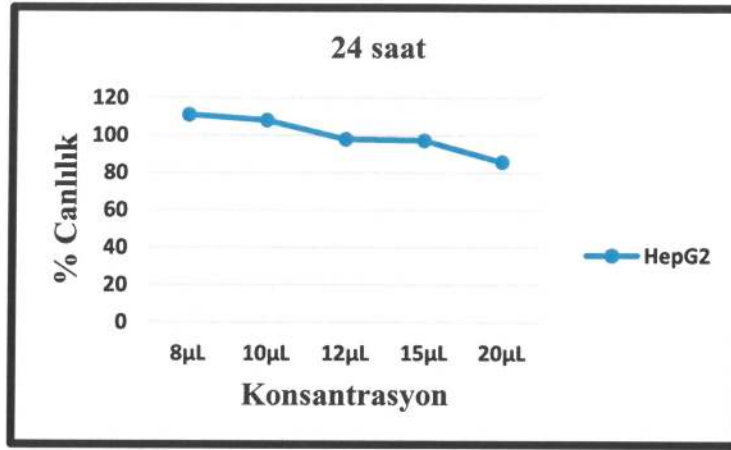
Şekil 5.15.: K3 formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)



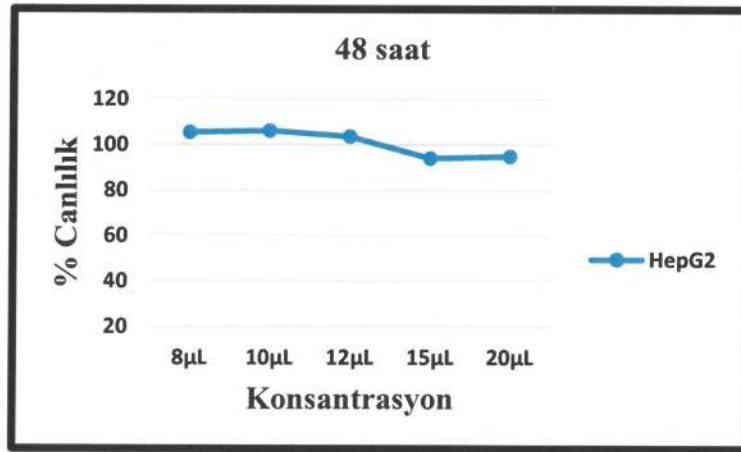
Şekil 5.16.: K3 formülasyonu'nun L929 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi (n=3)



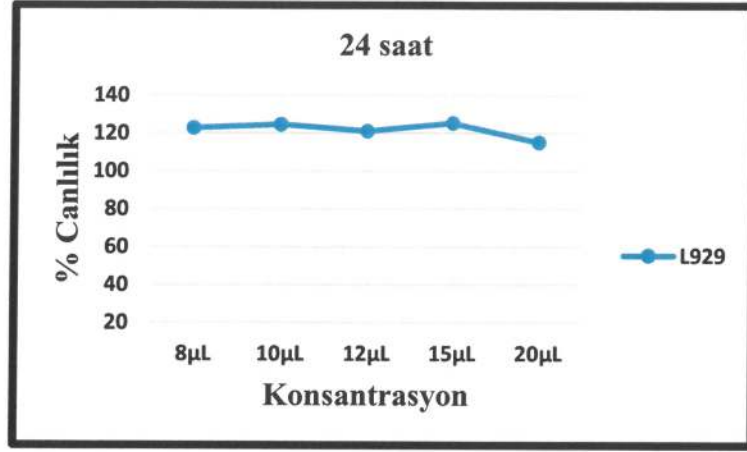
Şekil 5.17.: K3 formülasyonu'nun L929 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)



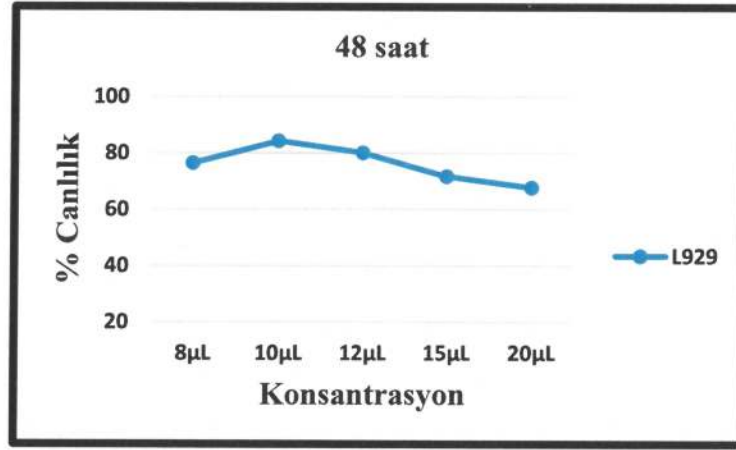
Şekil 5.18.: K3-H4 formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi (n=3)



Şekil 5.19.: K3-H4 formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)



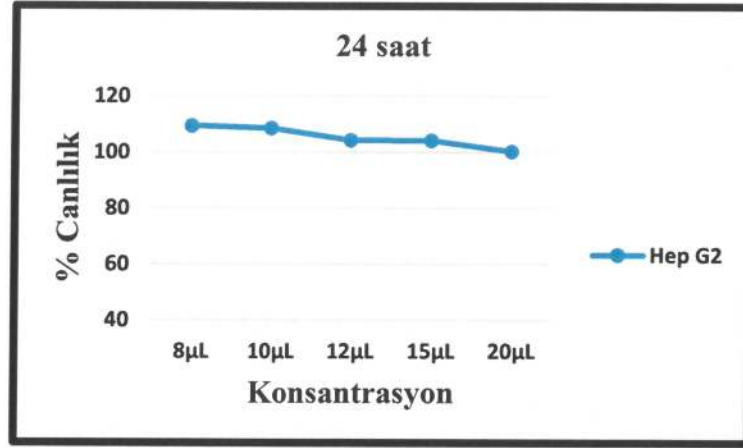
Şekil 5.20.: K3-H4 formülasyonu'nun L929 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi (n=3)



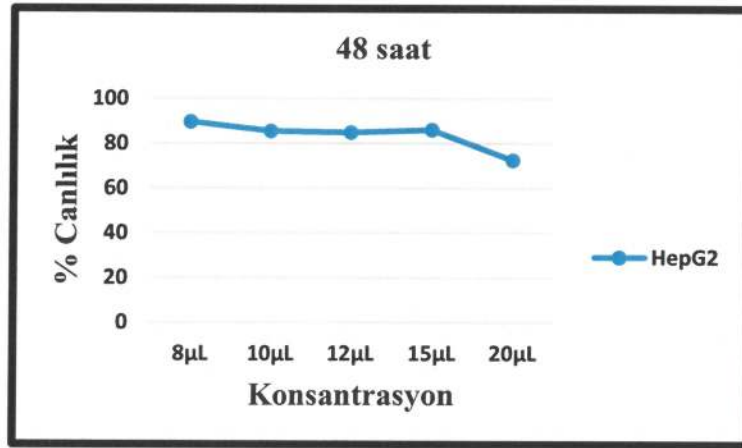
Şekil 5.21.: K3-H4 formülasyonu'nun L929 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)

Elde edilen sonuçlara ait grafiklerden de görüldüğü üzere K3 ve K3-H4 formülasyonlarının belirlenen konsantrasyonlarda, HepG2 ve L929 hücreleri üzerinde toksik etkisi bulunmamaktadır.

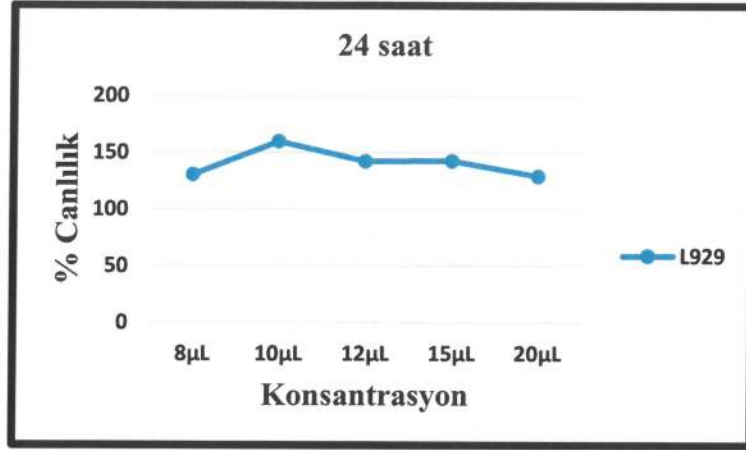
siRNA yüklenmiş K3 ve K3-H4 formülasyonlarının (K3-siRNA ve K3-H4-siRNA) her iki hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksite sonuçları Şekil 5.22-5.29'da sunulmuştur.



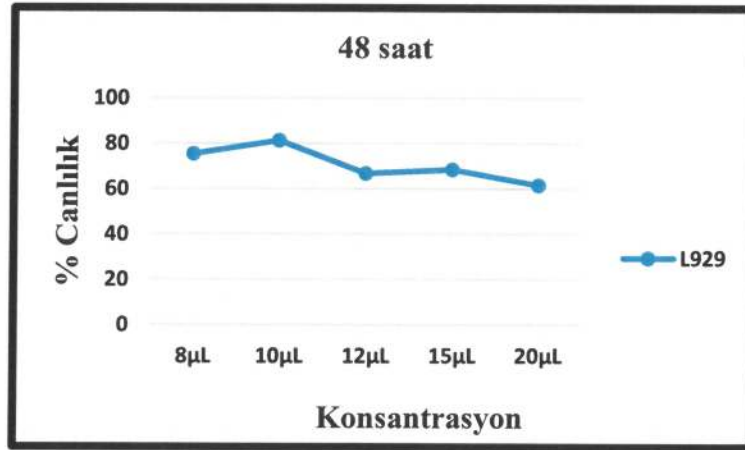
Şekil 5.22.: K3-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi (n=3)



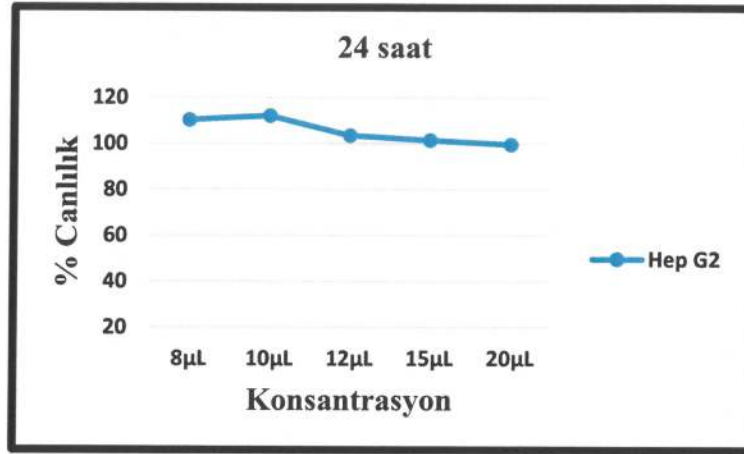
Şekil 5.23.: K3-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)



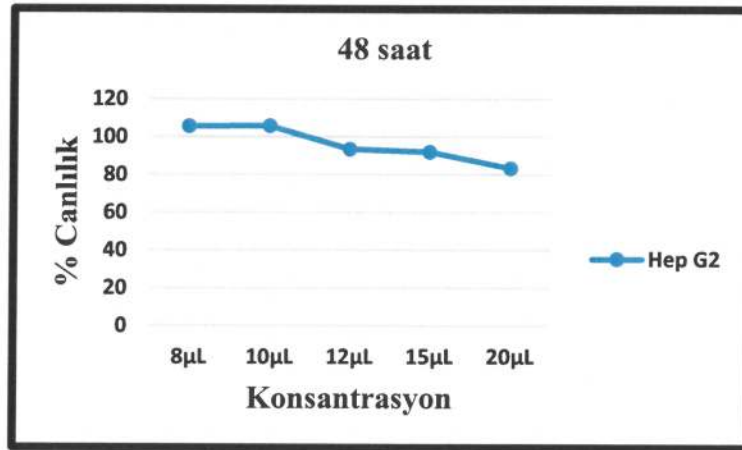
Şekil 5.24.: K3-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi (n=3)



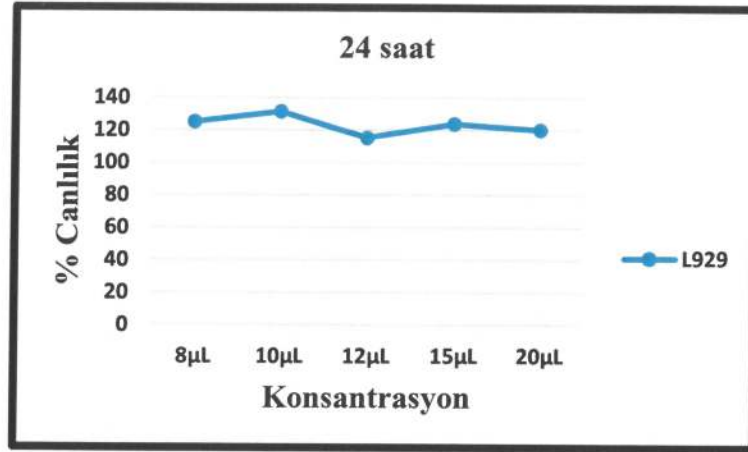
Şekil 5.25.: K3-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)



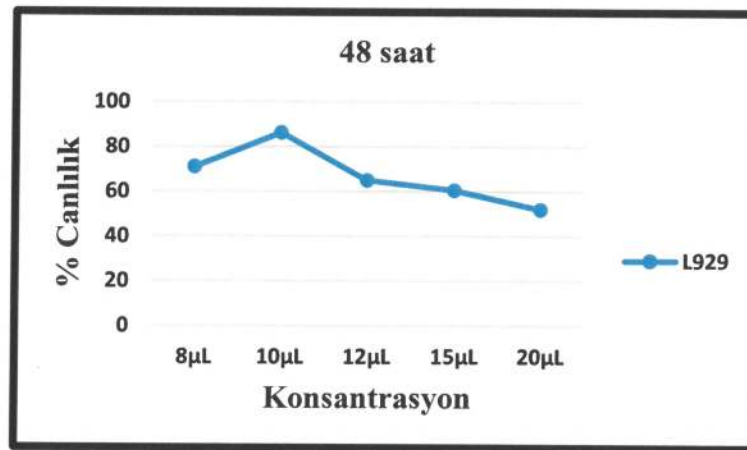
Şekil 5.26.: K3-H4-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi (n=3)



Şekil 5.27.: K3-H4-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)



Şekil 5.28.: K3-H4-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında 24. saatteki sitotoksitesi (n=3)

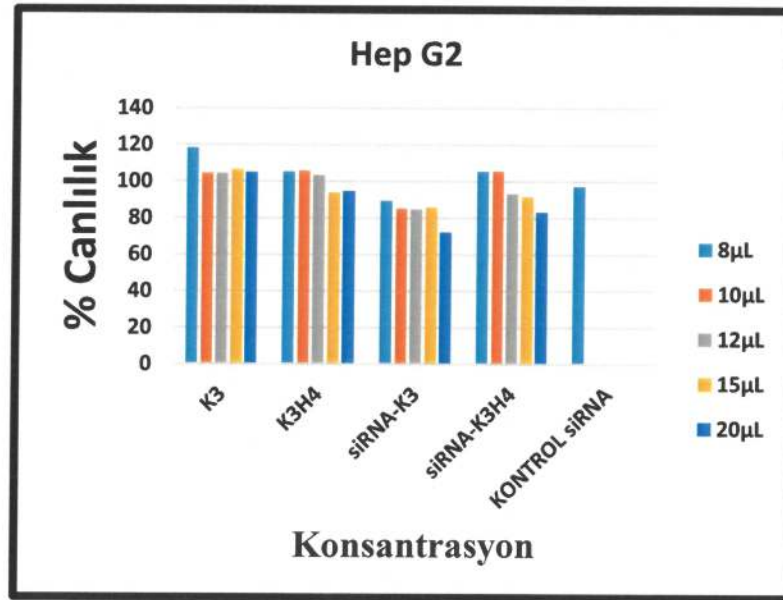


Şekil 5.29.: K3-H4-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)

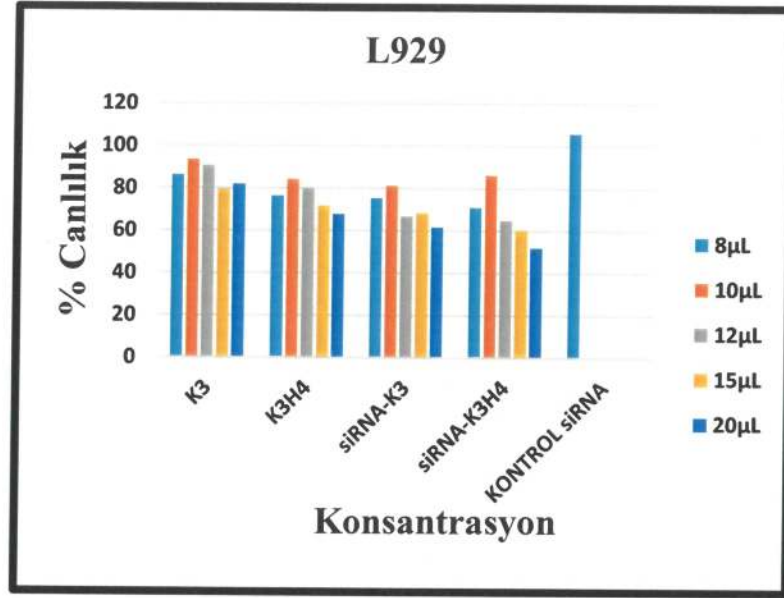
siRNA yüklenmiş K3-siRNA ve K3-H4-siRNA formüllerinin hem HepG2 hem de L929 hücrelerindeki sitotoksik etkilerinin 48 saatte 24 saattekine kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu formülasyonların HepG2 ve L929 hücrelerindeki sitotoksik etkilerini kıyaslandığında, L929 hücrelerindeki hücre ölümünün daha fazla oranda gerçekleştiği görülmektedir. L929 hücrelerine kıyasla HepG2 hücrelerindeki hücre canlılığının yüksek olmasının nedeni HepG2 hücrelerinin L929 gibi tek tabaka halinde değil de üst-üste üreme göstermesine bağlanmıştır. Bu üreyiş tarzı nedeniyle hücrelerin zemine tutunamaması, MTT işlemi sırasında geri alınan besiyeri ile hücrelerin (ölü ya da koloni halinde yaşayan) geri çekilmesine dolayısıyla ortamdan formazanı kristalleştirmiş hücrelerin taşınmasına bağlanmıştır. Ayrıca, 96 kuyucuk içerisinde besiyerinin sirkülasyonu söz konusu olmadığından koloni halinde ve besiyeri içinde asılı halde bulunan hücrelerin iç

ortamdaki hücrelerine formülasyonun nüfus etmemesi de bu etkiyi göstermiş olabilir düşüncesi hakim olmuştur. L929 hücrelerinin tek tabaka (monolayer) halinde üremesi formülasyonların tüm hücrelere ulaşabilmesine ve böylece daha etkin hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olmaktadır. Formülasyon yüzeyindeki HDL içinde var olan Apo A1 proteininin sağlıklı hücre yüzeyinde de SRB1 reseptörünün ve elbetteki Bcl-2 geninin de bulunması (kanser hücre yüzeyine oranla daha az miktarda), formülasyonlarımızın bu hücrelere de bağlanmasını ve siRNA'nın bu hücreler üzerinde etki gösterdiği görüşünün oluşumuna neden olmuştur. Bu değerlendirme sadece hücre kültürü sonuçlarına göre yapılmamıştır. Bu çıkarım transfeksiyon çalışması sonucunda elde edilen görüntüler ile de desteklenmektedir (Bölüm 5.9.).

Sonuç olarak hem HepG2 hem de L929 hücre hattında siRNA yüklü formüllerin, boş formülasyonlara ve çıplak siRNA'ya kıyasla daha toksik oldukları, her iki hücre hattında da 48 saatteki sitotoksitesinin daha etkin olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 5.30.: Formülasyonlar'ın HepG2 hücrelerinde 48. saatteki sitotoksitesi (n=3)



Şekil 5.31.: Formülasyonlar'ın L929 hücrelerinde 48. saatteki sitosoksisitesi (n=3)

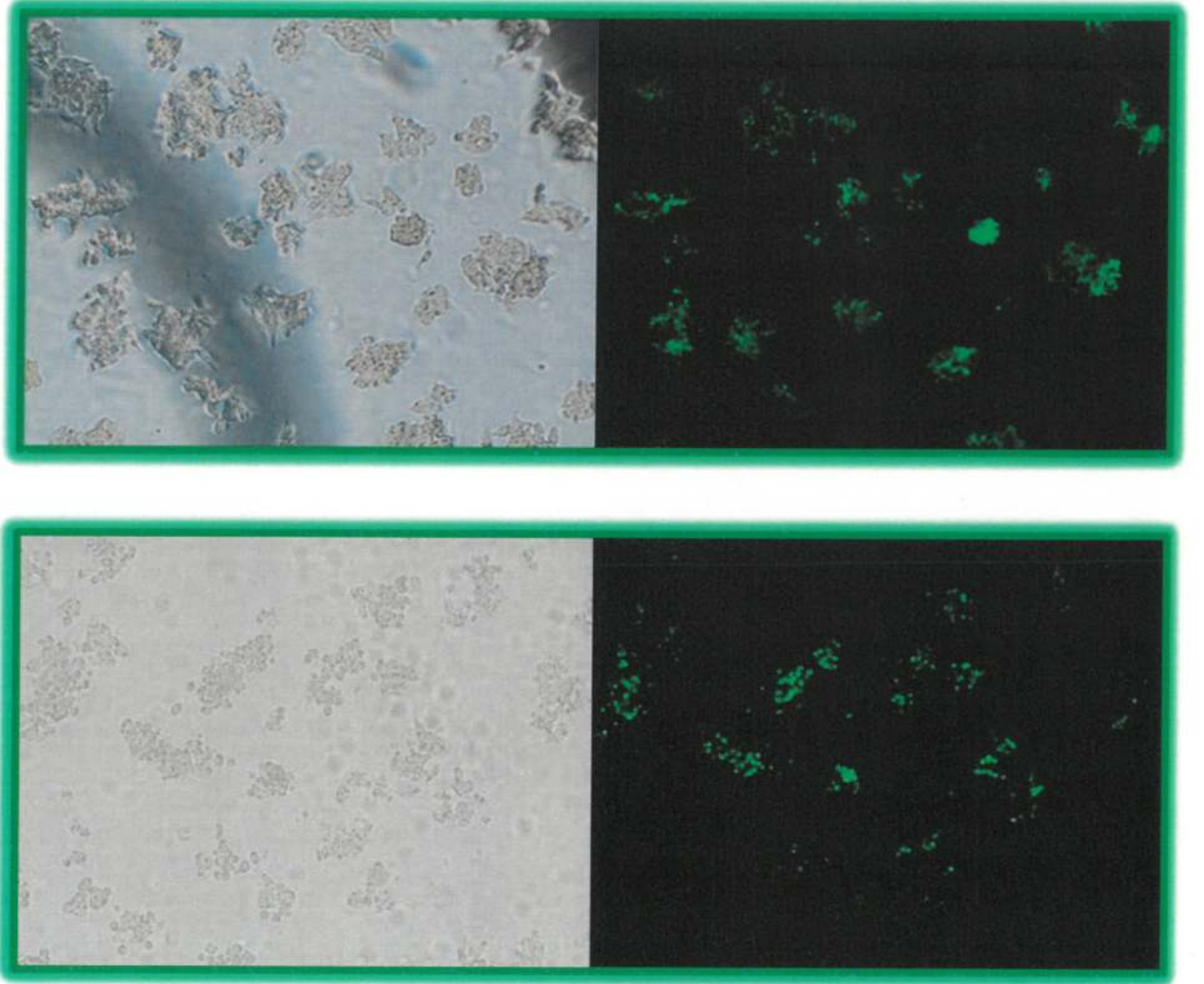
Kullanılan her iki hücre hattında da SRB1 reseptörünün bulunması (kanser hücrelerinde daha fazla) fakat HepG2 hücrelerine kıyasla L929'un tek tabaka halinde yüzeye yapışık halde üremesini göz önünde bulundurarak, MTT yöntemine göre, formülasyonlarımızın genel etkinliğinin L929 hücre hattındaki etkinliğinden yola çıkarak değerlendirilmesinin daha anlamlı olacağını düşünmekteyiz. Bu bağlamda L929 hücrelerinde, yüzeyine HDL bağlanmış siRNA-K3-H4'ün siRNA-K3'e kıyasla daha etkin hücre ölümüne neden olduğu görülmüştür (Şekil 5.30.; Şekil 5.31.).

5.9. Formülasyonların Transfeksiyonu

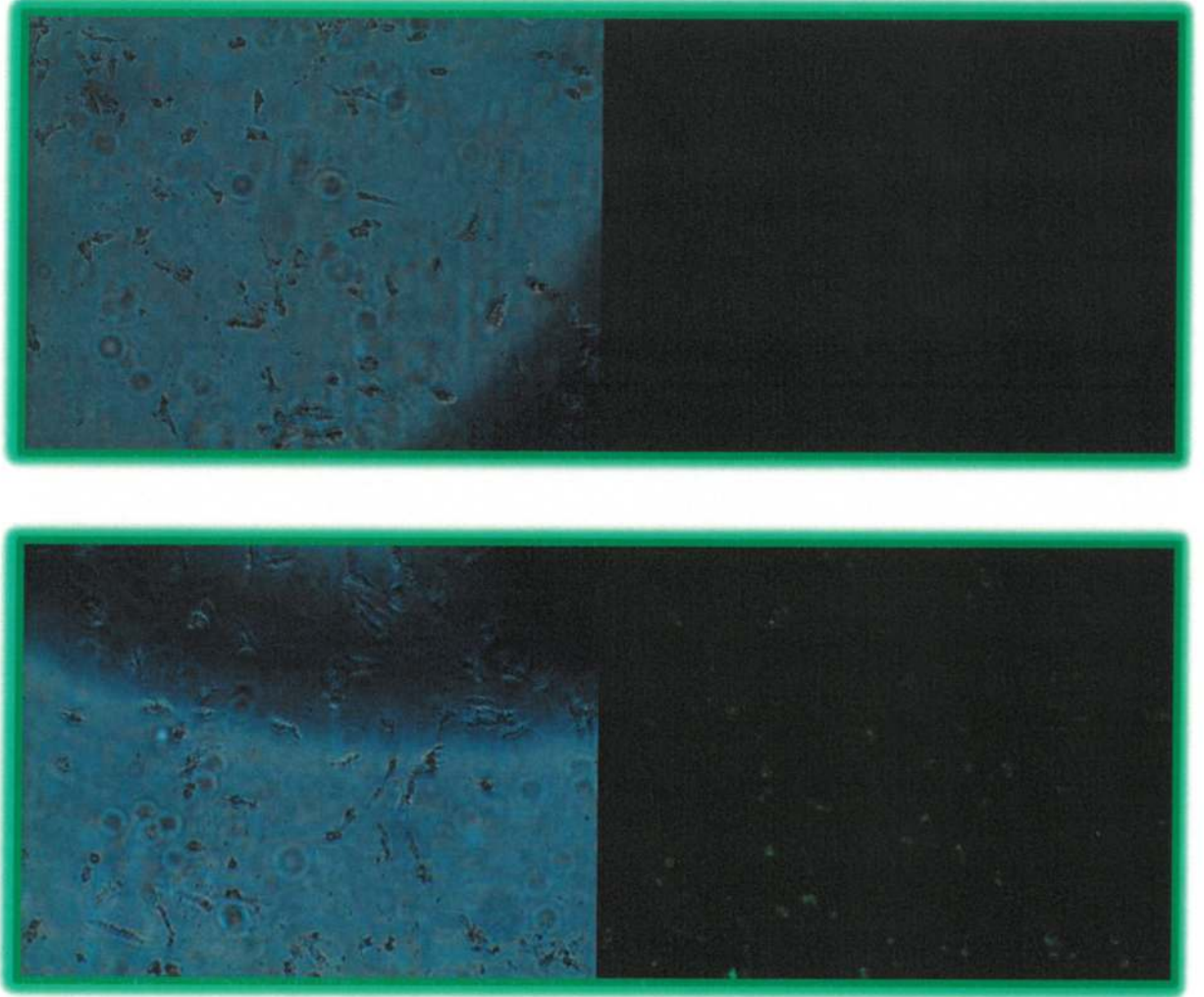
Transfeksiyon, DNA, RNA veya oligonükleotitler gibi eksojen nükleik asitleri hücrelere aktarma işlemidir (http-5). Bu nükleik asitlerin hücrelere aktarılması için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal yöntem, genetik materyallerin hücrelere taşınması için farklı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini içermektedir. Genel olarak bu yöntem, genetik materyalle taşıyıcı sistemlerin elektrosatik etkileşiminden yararlanarak, genetik materyali hücrelere taşınmasına dayanmaktadır (Kim ve Eberwine, 2010). Bu amaç için polimer ve lipid bazlı taşıyıcı sistemler çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Nguyen ve Szoka, 2012).

Bir polimerik taşıyıcı sistem olan kitosan nanopartikülleriyle yapılan çalışmalarda kitosan nanopartiküllerinin etkin bir hücresel alımı gözlemlenmiştir (Loh vd., 2010; Loutfy, 2016). Kitosan nanopartiküllerinin etkin hücresel alımı bu nanopartiküllerin hücre içine genetik materyal taşınmasında etkili bir araç olabileceğini göstermektedir.

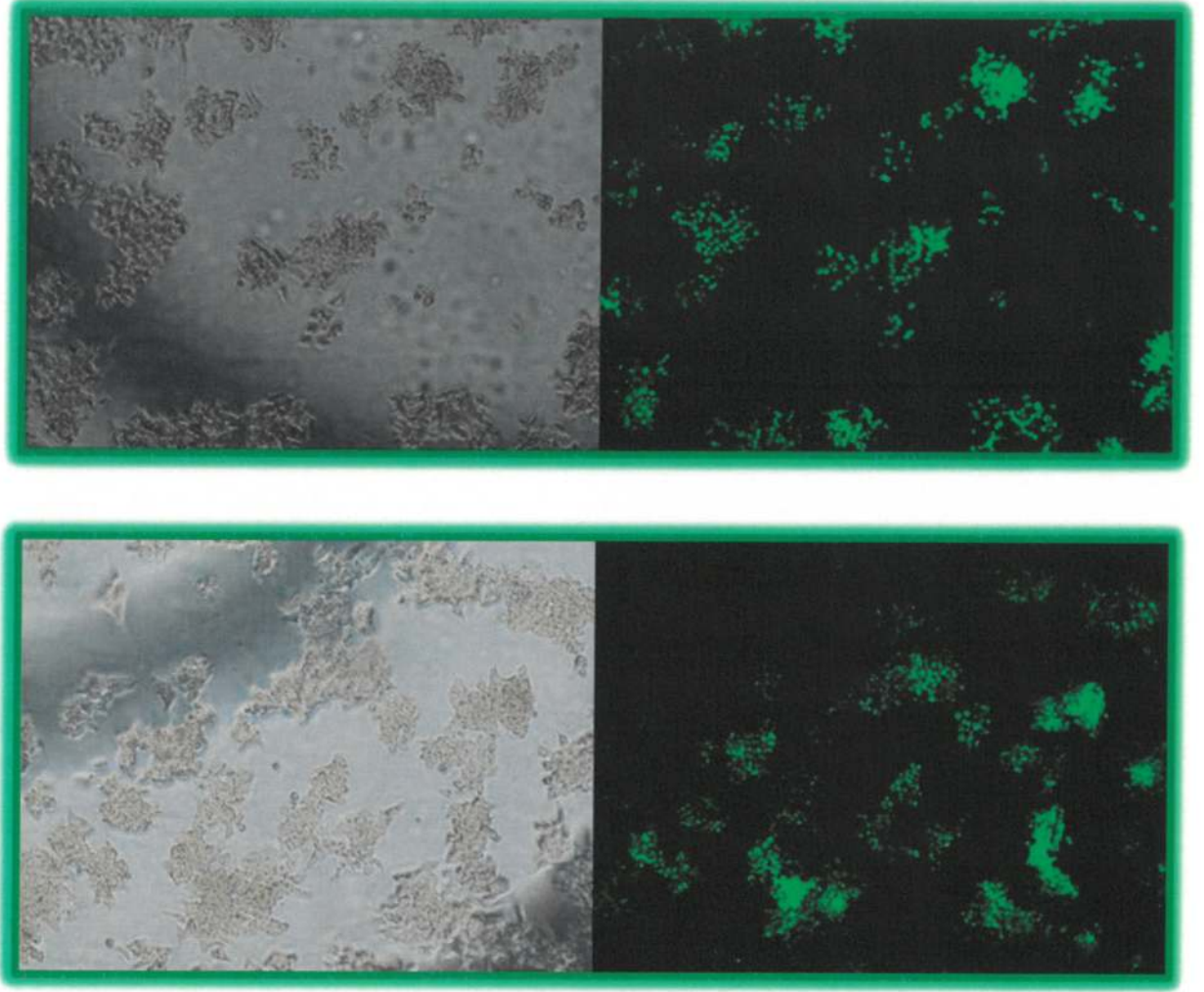
Farklı ekipler tarafından kitosan nanopartiküllerinin genetik materyal taşınmasında kullanımı hücrelere verimli bir genetik materyal transferiyle sonuçlanmıştır (Jayakumar vd., 2010; Özbaş-Turan ve Akbuğa). Farid vd, tarafından kitosan nanopartiküllerinin kullanımıyla, HepG2 insan karaciğer kanseri hücrelerine siRNA aktarımı sağlanmıştır (Farid vd., 2014). Bu çalışmada, transfeksiyon işlemi için hücre içerisine genetik materyalin aktarıldığının belirlenebilmesi amacıyla sitotoksikite çalışmalarında kullanılan siRNA yerine FITC-siRNA kullanılmıştır. FITC-siRNA K3 ve K3-H4 formülasyonlarına adsorbe edilmiş ve kuyu başına 200 ng olacak şekilde hem HepG2 hem de L929 hücrelerine uygulanmıştır ve kuyucuk içerisinde farklı iki alan seçilerek elde edilen floresan mikroskopu ile beyaz ışık görüntüleri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur (Şekil 5.32-Şekil 5.35.).



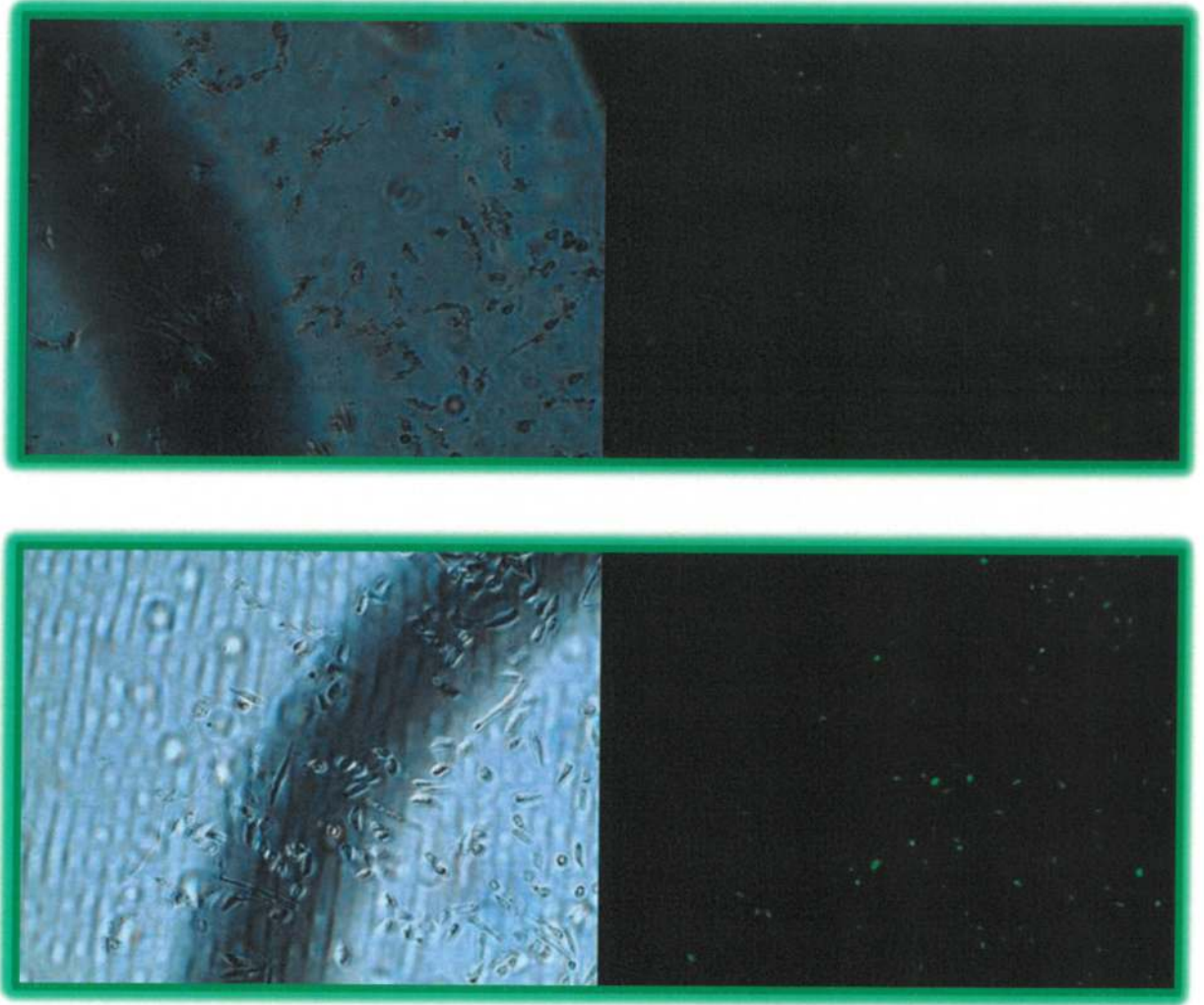
Şekil 5.32.: K3-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında transfeksiyon görüntüleri



Şekil 5.33.: *K3-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında transfeksiyon görüntüleri*



Şekil 5.34.: *K3-H4-siRNA formülasyonu'nun HepG2 hücre hattında transfeksiyon görüntüleri*



Şekil 5.35.: *K3-H4-siRNA formülasyonu'nun L929 hücre hattında transfeksiyon görüntüleri*

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki hücre hattında her iki formülasyonun transfeksiyon işlemi oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir.

Transfeksiyon oranı HepG2 hücrelerinin koloni halinde üç boyutlu üremeleri nedeniyle hesaplanamamıştır. Bu nedenle elde edilen görüntüler üzerinden tartışma yapılmıştır. Şekil 5.31 ve Şekil 5.34'de HepG2 hücrelerinin topaklanmış şekilde büyüdüğü açık olarak görülmektedir. Transfekte olmuş hücrelerin çoğunlukta olduğu, verdiği ışımaların yoğunluğuna göre değerlendirilmiştir. Buna göre, K3 ve K3-H4 formülasyonlarının HepG2 hücreleri tarafından L929 hücrelere oranla çok daha fazla oranda alındığı ve HepG2 hücreleri üzerinde çok daha fazla etkili olduğu düşünülmektedir. K3 ve K3-H4

formülasyonların etkinliği karşılaştırıldığında ise K3-H4 formülasyonunun transfeksiyon üstünlüğü Şekil 5.31 ve Şekil 5.33’de açıkça görölmektedir. Bu da HDL’nin, beklenildiği gibi, genetik materyal taşıyan nanopartikölün **hücreseİ alım oranını** arttırdığını yani **he-deflemenin** gerçekleştirildiini ispatlamaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, düşük ve yüksek molekül ağırlıklı kitosanlar kullanılarak iyonik jelasyon yöntemiyle genetik materyal taşıyıcı sitemlerin geliştirilmesi, bu sistemlerin yüzeyinin Apo A1 proteinini içeren HDL ile modifiye edilerek, hücre yüzeyinde çok sayıda SRB1 reseptörü bulunduran kanser hücrelerine hedefli bir sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Nanopartiküllerin hazırlanması için, ön çalışmalarda *yüksek molekül ağırlıklı kitosan* kullanılmıştır ancak bu partiküler sistemin partikül boyutu mikron ve zeta potansiyeli düşük bulunmuştur. Bu nedenle nano boyutlarda ve hem kararlılık hem de genetik materyal taşıma için optimal yüzey yüküne sahip olduğu belirlenen *düşük molekül ağırlıklı kitosan* ile hazırlanmış K3 formülasyonu ideal taşıyıcı sistem olarak belirlenmiştir.

Gönüllülerden alınan kanlardan HDL'nin izolasyonu sağlanmış, saflığı araştırılmıştır ve Apo A1 proteinini içerdiği ispatlanmıştır. K3 formülasyonunun yüzeyine bağlayacak uygun HDL miktarı belirlenmiş ve K3-H4 olarak adlandırılan yüzeyi HDL ile modifiye edilmiş K3 formülasyonunun genetik materyal taşıma ve hücresel etkinlikleri araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, K3 ve K3-H4 formülasyonlarının hücresel alım için uygun fizikokimyasal özelliklere ve genetik materyali bağlama yetisine sahip olduğu, sitotoksik özellik göstermediği, genetik materyali hücrelere başarı ile aktardığı ve karaciğer kanseri hücrelerine SRB1 reseptörüne afinitesi nedeniyle aktif hedeflendirilebildiği tespit edilmiştir.

Hazırlanan bu sistemin hücresel etkinliklerinin daha ileri yöntemlerle belirlenmesinin ardından *in vivo* etkinliğinin araştırılması planlanmaktadır. Ayrıca, karaciğer kanser hücrelerine hedeflendirilmesi sağlanmış bu sistemin farklı etkin maddeler yüklenerek etkinliğinin araştırılması da gelecekteki araştırma planlarımız dahilindedir.

KAYNAKÇA

- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, **17**(14), 1213-1221.
- Akar, U., Chaves-Reyez, A., Barria, M., Tari, A., Sanguino, A., Kondo, Y., ... & Ozpolat, B. (2008). Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*, **4**(5), 669-679.
- Akbuga, J., Ozbas-Turan, S., & Ekentok, C. (2016). Chitosan Nanoparticles in Gene Delivery. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement* (pp. 337-351). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Alameh, M., Lavertu, M., Tran-Khanh, N., Chang, C. Y., Lesage, F., Bail, M., ... & Buschmann, M. D. (2017). siRNA delivery with chitosan: influence of chitosan molecular weight, degree of deacetylation, and amine to phosphate ratio on *in vitro* silencing efficiency, hemocompatibility, biodistribution, and *in vivo* efficacy. *Biomacromolecules*, **19**(1), 112-131.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Programmed cell death (apoptosis). In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science. 17
- Al-Nemrawi, N. K., Alsharif, S. S. M., & Dave, R. H. (2018). Preparation of chitosan-TPP nanoparticles: the influence of chitosan polymeric properties and formulation variables. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, **10**(5), 60-65.
- Anand, M., Sathyapriya, P., Maruthupandy, M., & Beevi, A. H. (2018). Synthesis of chitosan nanoparticles by TPP and their potential mosquito larvicidal application. *Frontiers in Laboratory Medicine*, **2**(2), 72-78.
- Andersen, M. Ø., Lichawska, A., Arpanaei, A., Jensen, S. M. R., Kaur, H., Oupicky, D., & Howard, K. A. (2010). Surface functionalisation of PLGA nanoparticles for gene silencing. *Biomaterials*, **31**(21), 5671-5677.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In *Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages*, **2**, p. 64, InTech.
- Balazs, D. A., & Godbey, W. T. (2011). Liposomes for use in gene delivery. *Journal of drug delivery*, 2011. 1-12

- Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2002). Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(23), 14943-14945.
- Bhattacharya, S., Saha, I., Mukhopadhyay, A., Chattopadhyay, D., Ghosh, U. C., & Chatterjee, D. (2013). Role of nanotechnology in water treatment and purification: Potential applications and implications. *Int J Chem Sci Technol*, **3**(3), 59-64.
- Bhumkar, D. R., & Pokharkar, V. B. (2006). Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *Aaps Pharmscitech*, **7**(2), E138-E143.
- Bhushan, B., Khanadeev, V., Khlebtsov, B., Khlebtsov, N., & Gopinath, P. (2017). Impact of albumin-based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Advances in colloid and interface science*, **246**, 13-39.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). *Apoptosis. Medical Biochemistry*, 791–796. Bodnar, M., Hartmann, J. F., & Borbely, J. (2005). Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*, **6**(5), 2521-2527.
- Boisseau, P., & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*, **12**(7), 620-636.
- Boon, Y. T., Naim, M. N., Zakaria, R., Bakar, N. A., Ahmad, N., & Lenggoro, I. W. (2016). Grading of Emulsified Agarwood Oil Using Gel Electrophoresis Technique. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering*, **10**(5), 547-551.
- Brace, R. J., Sorrenson, B., Sviridov, D., & McCormick, S. P. (2010). A gel-based method for purification of apolipoprotein AI from small volumes of plasma. *Journal of lipid research*, **51**(11), 3370-3376.
- Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H., & Toder, V. (1999). The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **16**(10), 512-519.
- Burton, E. A., Fink, D. J., & Glorioso, J. C. (2002). Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA and cell biology*, **21**(12), 915-936.
- Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E., & Yazan, Y. (2016). Preparation and *in vitro* evaluation of vaginal formulations including siRNA and

- paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **109**, 174-183.
- Büyükköroğlu, G., Yazan, E. Y., & ÖNER, A. F. (2015). Preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing DOTAP® for DNA delivery. *Turkish Journal of Chemistry*, **39**(5), 1012-1024.
- Campbell, J. M., Bacon, T. A., & Wickstrom, E. (1990). Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *Journal of biochemical and biophysical methods*, **20**(3), 259-267.
- Carrillo, C., Sánchez-Hernández, N., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Suñé-Negre, J. M., Ticó, J. R., ... & Miñarro, M. (2013). DNA delivery via cationic solid lipid nanoparticles (SLNs). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **49**(2), 157-165.
- Castro, G. R., & Fielding, C. J. (1988). Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-. beta.-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry*, **27**(1), 25-29.
- Chen, C., Yu, Y., Wang, X., Shi, P., Wang, Y., & Wang, P. (2017). Manipulation of pH-Sensitive interactions between podophyllotoxin-chitosan for enhanced controlled drug release. *International journal of biological macromolecules*, **95**, 451-461.
- Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L., & Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes & development*, **10**(19), 2438-2451.
- Chen, Y. H., Keiser, M. S., & Davidson, B. L. (2018). Viral Vectors for Gene Transfer. *Current protocols in mouse biology*, **8**(4), e58.
- Clark, D. P., & Pazdernik, N. J. (2016). *RNA-Based Technologies*. *Biotechnology*, 131–179. doi:10.1016/b978-0-12-385015-7.00005-3
- Cohen, J. J. (1991). Programmed cell death in the immune system. In *Advances in immunology*, **50**, pp. 55-85. Academic Press.
- Commission européenne. (2005). *European Technology Platform on Nanomedicine: Nanotechnology for Health: Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for Nanomedicine*. Office for official publications of the European Communities.

- Conlon, D. R., Blankstein, L. A., Pasakarnis, P. A., Steinberg, C. M., & D'Amelio, J. E. (1979). Quantitative determination of high-density lipoprotein cholesterol by agarose gel electrophoresis. *Clinical chemistry*, **25**(11), 1965-1969.
- Crooke, S. T. (2004). Progress in antisense technology. *Annu. Rev. Med.*, **55**, 61-95.
- Csaba, N., Köping-Höggård, M., & Alonso, M. J. (2009). Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. *International journal of pharmaceutics*, **382**(1-2), 205-214
- Dabkowska, A. P., Barlow, D. J., Hughes, A. V., Campbell, R. A., Quinn, P. J., & Lawrence, M. J. (2011). The effect of neutral helper lipids on the structure of cationic lipid monolayers. *Journal of The Royal Society Interface*, **9**(68), 548-561.
- Dallas, A., & Vlassov, A. V. (2006). RNAi: A novel antisense technology and its therapeutic potential. *Medical science monitor*, **12**(4), RA67-RA74.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr  at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*, **161**(2), 505-522.
- Davidson, W. S., Sparks, D. L., Lund-Katz, S., & Phillips, M. C. (1994). The molecular basis for the difference in charge between pre-beta-and alpha-migrating high-density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, **269**(12), 8959-8965.
- DeVos, S. L., & Miller, T. M. (2013). Antisense oligonucleotides: treating neurodegeneration at the level of RNA. *Neurotherapeutics*, **10**(3), 486-497.
- Devroe, E., & Silver, P. A. (2002). Retrovirus-delivered siRNA. *BMC biotechnology*, **2**(1), 15.
- Dias, N., & Stein, C. A. (2002). Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Molecular cancer therapeutics*, **1**(5), 347-355.
- Ding, Y., Wang, W., Feng, M., Wang, Y., Zhou, J., Ding, X., ... & Zhang, Q. (2012). A biomimetic nanovector-mediated targeted cholesterol-conjugated siRNA delivery for tumor gene therapy. *Biomaterials*, **33**(34), 8893-8905.
- Dolatabadi, J. E. N., Valizadeh, H., & Hamishehkar, H. (2015). Solid lipid nanoparticles as efficient drug and gene delivery systems: recent breakthroughs. *Advanced pharmaceutical bulletin*, **5**(2), 151.
- Downward, J. (2004). RNA interference. *Bmj*, **328**(7450), 1245-1248.

- Duggal, D. (2011). Role of nanotechnology in new drug delivery systems. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(4), 4-8.
- Edelstein, C., Halari, M., & Scanu, A. M. (1982). On the mechanism of the displacement of apolipoprotein AI by apolipoprotein A-II from the high-density lipoprotein surface. Effect of concentration and molecular forms of apolipoprotein A-II. *Journal of Biological Chemistry*, 257(12), 7189-7195.
- Ekambaram, P., Sathali, A. A. H., & Priyanka, K. (2012). Solid lipid nanoparticles: a review. *Sci Rev Chem Commun*, 2(1), 80-102.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- European Science Foundation. (2005). *Nanomedicine: An ESF-European Medical Research Councils (EMRC) Forward Look Report*. ESF.
- Farid, M. M., Hathout, R. M., Fawzy, M., & Abou-Aisha, K. (2014). Silencing of the scavenger receptor (Class B–Type 1) gene using siRNA-loaded chitosan nanoparticles in a HepG2 cell model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 930-937.
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano*, 3(1), 16-20.
- Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2018). Introduction to lipids and lipoproteins. In *Endotext [Internet]*. MDText. com, Inc.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., ... & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7413-7417.
- Feng, L. F., Zhong, M., Lei, X. Y., Zhu, B. Y., Tang, S. S., & Liao, D. F. (2006). Bcl-2 siRNA induced apoptosis and increased sensitivity to 5-fluorouracil and HCPT in HepG2 cells. *Journal of drug targeting*, 14(1), 21-26.
- Feng, M. Q., Cai, Q. S., Song, D. X., Dong, J. B., & Zhou, P. (2006). High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 46(2), 337-342.
- Feng, M., Cai, Q., Shi, X., Huang, H., Zhou, P., & Guo, X. (2008). Recombinant high-density lipoprotein complex as a targeting system of nosiheptide to liver cells. *Journal of drug targeting*, 16(6), 502-508.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**(6669), 806.
- Fonte, P., Andrade, F., Araujo, F., Andrade, C., das Neves, J., & Sarmiento, B. (2012). Chitosan-coated solid lipid nanoparticles for insulin delivery. In *Methods in enzymology*, **508**, pp. 295-314. Academic Press.
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., & McCarron, P. (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **44**(2-3), 65-73.
- Gaspar, V. M., Sousa, F., Queiroz, J. A., & Correia, I. J. (2010). Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications. *Nanotechnology*, **22**(1), 015101.
- Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of drug targeting*, **20**(4), 291-300.
- Gumustas, M., Sengel-Turk, C. T., Gumustas, A., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2017). Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems. In *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* (pp. 67-108). Elsevier.
- Hall, J. B., Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K., & McNeil, S. E. (2007). Characterization of nanoparticles for therapeutics. 789-803
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature*, **418**(6894), 244.
- Hao, S., Mata, M., & Fink, D. J. (2007). Viral vector-based gene transfer for treatment of chronic pain. *International anesthesiology clinics*, **45**(2), 59.
- Harmata, A. J., & Guelcher, S. A. (2016). Effects of surface modification on polymeric biocomposites for orthopedic applications. In *Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration* (pp. 67-91). Woodhead Publishing.
- Helmschrodt, C., Höbel, S., Schöniger, S., Bauer, A., Bonicelli, J., Gringmuth, M., ... & Richter, F. (2017). Polyethylenimine nanoparticle-mediated siRNA delivery to reduce α -Synuclein expression in a model of Parkinson's disease. *Molecular Therapy- Nucleic Acids*, **9**, 57-68.

- Hembram, K. C., Prabha, S., Chandra, R., Ahmed, B., & Nimesh, S. (2016). Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artif Cells Nanomedicine Biotechnol*, **44**(1), 305-314.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**(6805), 770.
- Hermens, W. T., & Verhaagen, J. (1998). Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system. *Progress in neurobiology*, **55**(4), 399-432.
- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **12**(2), 265-273.
- Huang, M., Fong, C. W., Khor, E., & Lim, L. Y. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of Controlled Release*, **106**(3), 391-406.
- Huang, Y., Liu, X., Dong, L., Liu, Z., He, X., & Liu, W. (2011). Development of viral vectors for gene therapy for chronic pain. *Pain research and treatment*, 2011. 1-8
- IDTutorial. 2005. Antisense Technologies, 1-12
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, **2**(4), 277.
- Izzo, C., Grillo, F., & Murador, E. (1981). Improved method for determination of high-density-lipoprotein cholesterol I. Isolation of high-density lipoproteins by use of polyethyleneglycol 6000. *Clinical chemistry*, **27**(3), 371-374.
- Jain, A., Thakur, K., Sharma, G., Kush, P., & Jain, U. K. (2016). Fabrication, characterization and cytotoxicity studies of ionically cross-linked docetaxel loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, **137**, 65-74.
- Jain, K. K. (2007). Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clinical chemistry*, **53**(11), 2002-2009.
- Jayakumar, R., Chennazhi, K. P., Muzzarelli, R. A. A., Tamura, H., Nair, S. V., & Selvamurugan, N. (2010). Chitosan conjugated DNA nanoparticles in gene therapy. *Carbohydrate Polymers*, **79**(1), 1-8.
- Jin, J., Bae, K. H., Yang, H., Lee, S. J., Kim, H., Kim, Y., ... & Nam, D. H. (2011). *In vivo* specific delivery of c-Met siRNA to glioblastoma using cationic solid lipid nanoparticles. *Bioconjugate chemistry*, **22**(12), 2568-2572.

- Kadu, P. J., Kushare, S. S., Thacker, D. D., & Gattani, S. G. (2011). Enhancement of oral bioavailability of atorvastatin calcium by self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Pharmaceutical development and technology*, **16**(1), 65-74.
- Kakadia, P. G., & Conway, B. R. (2014). Solid lipid nanoparticles: a potential approach for dermal drug delivery. *American Journal of Pharmacological Sciences*, **2**(5A), 1-21
- Kang, M. H., Yoon, H. Y., & Choi, Y. W. (2017). RIPL peptide as a novel cell-penetrating and homing peptide: design, characterization, and application to liposomal nanocarriers for hepsin-specific intracellular drug delivery. In *Nanostructures for Cancer Therapy* (pp. 129-157). Elsevier.
- Katas, H., & Alpar, H. O. (2006). Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of controlled release*, **115**(2), 216-225.
- Katayose, S., & Kataoka, K. (1997). Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly (ethylene glycol)-poly (l-lysine) block copolymer. *Bioconjugate chemistry*, **8**(5), 702-707.
- Kelly, E. B. (2007). *Gene Therapy*. Gene Therapy: A Treatment for Altered Genes. Greenwood Press. 3-11
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, **26**(4), 239.
- Kher, G., Trehan, S., & Misra, A. (2011). Antisense oligonucleotides and RNA interference. In *Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* (pp. 325-386). Elsevier.
- Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., & Leong, K. W. (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, **25**(22), 5293-5301.
- Kido, T., Kurata, H., Matsumoto, A., Tobiyama, R., Musha, T., Hayashi, K., ... & Itakura, H. (2001). Lipoprotein analysis using agarose gel electrophoresis and differential staining of lipids. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, **8**(1), 7-13.
- Kim, B. K., Hwang, G. B., Seu, Y. B., Choi, J. S., Jin, K. S., & Doh, K. O. (2015). DOTAP/DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1848**(10), 1996-2001.

- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature reviews genetics*, **8**(3), 173.
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **397**(8), 3173-3178.
- Kingwell, B. A., Chapman, M. J., Kontush, A., & Miller, N. E. (2014). HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nature reviews Drug discovery*, **13**(6), 445.
- Knight, M., Miller, A., Liu, Y., Scaria, P., Woodle, M., & Ittiprasert, W. (2011). Polyethyleneimine (PEI) mediated siRNA gene silencing in the *Schistosoma mansoni* snail host, *Biomphalaria glabrata*. *PLoS neglected tropical diseases*, **5**(7), e1212.
- Kontush, A., Lindahl, M., Lhomme, M., Calabresi, L., Chapman, M. J., & Davidson, W. S. (2015). Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. In *High Density Lipoproteins* (pp. 3-51). Springer, Cham.
- Köping-Höggård, M., Vårum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T., & Artursson, P. (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene therapy*, **11**(19), 1441.
- Kreuter, J., Hekmatara, T., Dreis, S., Vogel, T., Gelperina, S., & Langer, K. (2007). Covalent attachment of apolipoprotein AI and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *Journal of controlled release*, **118**(1), 54-58.
- Kulkarni, S. A., & Feng, S. S. (2013). Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharmaceutical research*, **30**(10), 2512-2522.
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies: improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry*, **270**(8), 1628-1644.
- Kuwahara, H., Nishina, K., Yoshida, K., Nishina, T., Yamamoto, M., Saito, Y., ... & Yokota, T. (2011). Efficient *in vivo* delivery of siRNA into brain capillary endothelial cells along with endogenous lipoprotein. *Molecular Therapy*, **19**(12), 2213-2221.
- Lam, J. K., Chow, M. Y., Zhang, Y., & Leung, S. W. (2015). siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, **4**, e252.

- Lasic, D. D. (Ed.). (2000). *Gene therapy: therapeutic mechanisms and strategies*. CRC Press. vii
- Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, **27**(27), 4815-4824.
- Leavell, M. D., Novak, P., Behrens, C. R., Schoeniger, J. S., & Kruppa, G. H. (2004). Strategy for selective chemical cross-linking of tyrosine and lysine residues. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **15**(11), 1604-1611.
- Lebre, F., Bento, D., Jesus, S., & Borges, O. (2012). Chitosan-based nanoparticles as a hepatitis B antigen delivery system. In *Methods in enzymology*, **509**, pp. 127-142. Academic Press.
- Li, W., & Szoka, F. C. (2007). Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharmaceutical research*, **24**(3), 438-449.
- Liang, G. F., Zhu, Y. L., Sun, B., Hu, F. H., Tian, T., Li, S. C., & Xiao, Z. D. (2011). PLGA-based gene delivering nanoparticle enhance suppression effect of miRNA in HePG2 cells. *Nanoscale research letters*, **6**(1), 447.
- Liu, F., & Huang, L. (2002). Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *Journal of controlled release*, **78**(1-3), 259-266.
- Liu, W. G., & De Yao, K. (2002). Chitosan and its derivatives-a promising non-viral vector for gene transfection. *Journal of controlled release*, **83**(1), 1-11.
- Lobovkina, T., Jacobson, G. B., Gonzalez-Gonzalez, E., Hickerson, R. P., Leake, D., Kaspar, R. L., ... & Zare, R. N. (2011). *In vivo* sustained release of siRNA from solid lipid nanoparticles. *ACS nano*, **5**(12), 9977-9983.
- Loh, J. W., Yeoh, G., Saunders, M., & Lim, L. Y. (2010). Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. *Toxicology and applied pharmacology*, **249**(2), 148-157.
- Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasanin, M. T. M., & Abdellah, A. M. (2016). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, **7**(3), 035008.
- Lu, G. W., & Gao, P. (2010). Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. In *Handbook of non-invasive drug delivery systems* (pp. 59-94). William Andrew Publishing.

- Lund-Katz, S., & Phillips, M. C. (2010). High density lipoprotein structure–function and role in reverse cholesterol transport. In *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*: (pp. 183-227). Springer, Dordrecht.
- Luo, G., Jin, C., Long, J., Fu, D., Yang, F., Xu, J., ... & Ni, Q. (2009). RNA interference of MBD1 in BxPC-3 human pancreatic cancer cells delivered by PLGA-poloxamer nanoparticles. *Cancer biology & therapy*, **8(7)**, 594-598.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., & Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of controlled release*, **114(1)**, 100-109.
- Malmö, J., Sørsgård, H., Vårum, K. M., & Strand, S. P. (2012). siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *Journal of controlled release*, **158(2)**, 261-268.
- Manns, J. M. (2011). SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current protocols in microbiology*, **22(1)**, A-3M.
- Mansoor, M., & Melendez, A. J. (2008). Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene regulation and systems biology*, **2**, GRSB-S418.
- Mao, S., Sun, W., & Kissel, T. (2010). Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Advanced drug delivery reviews*, **62(1)**, 12-27.
- McTaggart, S., & Al-Rubeai, M. (2002). Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnology advances*, **20(1)**, 1-31.
- Melchior, J. T., Walker, R. G., Cooke, A. L., Morris, J., Castleberry, M., Thompson, T. B., & Sorci-Thomas, M. G. (2017). A consensus model of human apolipoprotein AI in its monomeric and lipid-free state. *Nature structural & molecular biology*, **24(12)**, 1093.
- Meng, W. B., Liu, J. P., & Wang, X. W. (2015). Effect of Bcl-2-siRNA on proliferation and apoptosis of pediatric acute B lymphoblastic leukemia (A-BLL) cells. *Genetics and molecular research: GMR*, **14(4)**, 12427-12436.
- Michaelis, K., Hoffmann, M. M., Dreis, S., Herbert, E., Alyautdin, R. N., Michaelis, M., & Langer, K. (2006). Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **317(3)**, 1246-1253.

- Mintzer, M. A., & Simanek, E. E. (2008). Non-viral vectors for gene delivery. *Chemical reviews*, **109**(2), 259-302.
- Mishra, N., Pant, P., Porwal, A., Jaiswal, J., & Aquib, M. (2016). Targeted drug delivery: a review. *Am. J. Pharm. Tech. Res*, **6**, 2249-3387.
- Misra, A. (Ed.). (2010). *Challenges in delivery of therapeutic genomics and proteomics*. chapter 5- Gene Delivery Using Viral Vectors. Elsevier, 207-270,
- Mohammed, M., Syeda, J., Wasan, K., & Wasan, E. (2017). An overview of chitosan nanoparticles and its application in non-parenteral drug delivery. *Pharmaceutics*, **9**(4), 53.
- Mooberry, L. K., Nair, M., Paranjape, S., McConathy, W. J., & Lacko, A. G. (2010). Recept or mediated uptake of paclitaxel from a synthetic high-density lipoprotein nanocarr ier. *Journal of drug targeting*, **18**(1), 53-58.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T., & Shiota, K. (1995). Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *The Anatomical Record*, **242**(1), 103-110.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, **65**(1-2), 55-63.
- Mu, L., & Sprando, R. L. (2010). Application of nanotechnology in cosmetics. *Pharmaceutical research*, **27**(8), 1746-1749.
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs*, **31**(4), 317-334.
- National Research Council, & Committee to Review the National Nanotechnology Initiative. (2006). *A matter of size: Triennial review of the national nano technology initiative*. National Academies Press. 15-44
- Nauck, M., Winkler, K., März, W., & Wieland, H. (1995). Quantitative determination of high-, low-, and very-low-density lipoproteins and lipoprotein (a) by agarose gel electrophoresis and enzymatic cholesterol staining. *Clinical chemistry*, **41**(12), 1761- 1767.
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., & Ali, P. A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced biomedical research*, **1**.1-11
- Nguyen, J., & Szoka, F. C. (2012). Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle. *Accounts of chemical research*, **45**(7), 1153-1162.

- Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., & Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, **254**(5037), 1497-1500.
- Nimesh, S., Thibault, M. M., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Molecular biotechnology*, **46**(2), 182-196.
- Norbury, C. J., & Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **41**(1), 367-401.
- Novina, C. D., & Sharp, P. A. (2004). The RNAi revolution. *Nature*, **430**(6996), 161.
- Othman, N., Masarudin, M., Kuen, C., Dasuan, N., & Abdullah, L. (2018). Synthesis and Optimization of Chitosan Nanoparticles Loaded with L-Ascorbic Acid and Thymoquinone. *Nanomaterials*, **8**(11), 920
- Ozpolat, B., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. (2014). Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, **66**, 110-116.
- Özbaş-Turan, S., & Akbuğa, J. (2011). Plasmid DNA-loaded chitosan/TPP nanoparticles for topical gene delivery. *Drug delivery*, **18**(3), 215-222.
- Park, T. G., Jeong, J. H., & Kim, S. W. (2006). Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, **58**(4), 467-486.
- Patel, B. K., Parikh, R. H., & Aboti, P. S. (2013). Development of oral sustained release rifampicin loaded chitosan nanoparticles by design of experiment. *Journal of drug delivery*, 2013. 1-10
- Patra, J. K., & Gouda, S. (2013). Application of nanotechnology in textile engineering: An overview. *Journal of Engineering and Technology Research*, **5**(5), 104-111.
- Pattni, B. S., & Torchilin, V. P. (2015). Targeted drug delivery systems: strategies and challenges. In *Targeted Drug Delivery: Concepts and Design* (pp. 3-38). Springer, Cham.
- Pavlova, A. S., Dyudeeva, E. S., Kupryushkin, M. S., Amirkhanov, N. V., Pyshnyi, D. V., & Pyshnaya, I. A. (2018). SDS-PAGE procedure: Application for characterization of new entirely uncharged nucleic acids analogs. *Electrophoresis*, **39**(4), 670-674.
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., & Johnson, G. (2016). Programmed Cell Death. *Cell Biology*, 797-815. Elsevier Health Sciences.

- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Li, Y., & Wang, M. (2005). Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **15**(5), 1397-1399.
- Raja, M. A. G., Katas, H., & Wen, T. J. (2015). Stability, intracellular delivery, and release of siRNA from chitosan nanoparticles using different cross-linkers. *PloS one*, **10**(6), e0128963.
- Ramamoorthi, M., & Narvekar, A. (2015). Non-viral vectors in gene therapy-an overview. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, **9**(1), GE01.
- Ramezani, M., Ebrahimian, M., & Hashemi, M. (2017). Current strategies in the modification of PLGA-based gene delivery system. *Current medicinal chemistry*, **24**(7), 728-739.
- Rani, K., & Paliwal, S. (2014). A review on targeted drug delivery: Its entire focus on advanced therapeutics and diagnostics. *Sch. J. App. Med. Sci*, **2**(1C), 328-331.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, **31**(7), 603-632.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., & Niles, A. L. (2011). Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. In *Mammalian Cell Viability*. Humana Press. 103-114
- Rojanarata, T., Opanasopit, P., Techaarpornkul, S., Ngawhirunpat, T., & Ruktanonchai, U. (2008). Chitosan-thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery. *Pharmaceutical research*, **25**(12), 2807.
- Roy, S. M., & Sahoo, S. K. (2015). Controlled Drug Delivery: Polymeric Biomaterials for. In *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials, 11 Volume Set* (pp 2135-2146). CRC Press.
- Rui, M., Tang, H., Li, Y., Wei, X., & Xu, Y. (2013). Recombinant high-density lipoprotein nanoparticles for target-specific delivery of siRNA. *Pharmaceutical research*, **30**(5), 1203-1214.
- Sabbioni, S., Callegari, E., Manservigi, M., Argnani, R., Corallini, A., Negrini, M., & Manservigi, R. (2007). Use of herpes simplex virus type 1-based amplicon vector for delivery of small interfering RNA. *Gene therapy*, **14**(5), 459.
- Saelens, X., Festjens, N., Walle, L. V., Van Gurp, M., van Loo, G., & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23**(16), 2861.

- Sailaja, A., Amareshwar, P., & Chakravarty, P. (2011). Different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application. *Int J Pharm Pharm Sci*, **3(2)**, 45-50.
- Schmidt-Wolf, G. D., & Schmidt-Wolf, I. G. (2003). Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends in molecular medicine*, **9(2)**, 67-72.
- Shahzad, M. M., Mangala, L. S., Han, H. D., Lu, C., Bottsford-Miller, J., Nishimura, M., & Thanappapras, D. (2011). Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles. *Neoplasia*, **13(4)**, 309-IN8.
- Shen, C., Buck, A. K., Liu, X., Winkler, M., & Reske, S. N. (2003). Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. *FEBS letters*, **539(1-3)**, 111-114.
- Singh, R., & Lillard Jr, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, **86(3)**, 215-223.
- Sreekumar, S., Goycoolea, F. M., Moerschbacher, B. M., & Rivera-Rodriguez, G. R. (2018). Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano-and micro particles. *Scientific reports*, **8(1)**, 4695.
- Swaney, J. B., & O'Brien, K. J. (1976). Cross-linking studies on the state of association of apo AI and apo A-II from human HDL. *Biochemical and biophysical research communications*, **71(2)**, 636-643.
- Şenel, B. (2012). siRNA taşıyıcı sistem geliştirme ve değerlendirme çalışmaları. Doktora Tezi
- Takeuchi, K. I., Ishihara, M., Kawaura, C., Noji, M., Furuno, T., & Nakanishi, M. (1996). Effect of zeta potential of cationic liposomes containing cationic cholesterol derivatived on gene transfection. *FEBS letters*, **397(2-3)**, 207-209.
- Tan, P. H., Yang, L. C., & Ji, R. R. (2009). Therapeutic potential of RNA interference in pain medicine. *The open pain journal*, **2**, 57.
- Taniguchi, N., Arakawa, C., & Kobayashi, T. (1974). On the basic concept of nano-technology'. In *Proceedings of the International Conference on Production Engineering, 1974-8*, Vol. **2**, pp. 18-23.
- Thomas, M., & Klibanov, A. M. (2003). Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Applied microbiology and biotechnology*, **62(1)**, 27-34.
- Tomar, R. S., Matta, H., & Chaudhary, P. M. (2003). Use of adeno-associated viral vector for delivery of small interfering RNA. *Oncogene*, **22(36)**, 5712.

- Torchilin, V. P. (2010). Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. In *Drug delivery* (pp. 3-53). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Truong, N. P., Whittaker, M. R., Mak, C. W., & Davis, T. P. (2015). The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, **12**(1), 129-142.
- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbeid, S., Czubyko, F., & Aigner, A. (2005). RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA *in vivo*. *Gene therapy*, **12**(5), 461.
- Wang, M., & Briggs, M. R. (2004). HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chemical reviews*, **104**(1), 119-138.
- Wang, Z., Ruan, J., & Cui, D. (2009). Advances and prospect of nanotechnology in stem cells. *Nanoscale research letters*, **4**(7), 593.
- Ward, C. M., Read, M. L., & Seymour, L. W. (2001). Systemic circulation of poly (L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood*, **97**(8), 2221-2229.
- Warnick, G. R., & Albers, J. J. (1978). Heparin--Mn²⁺ quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol: an ultrafiltration procedure for lipemic samples. *Clinical Chemistry*, **24**(6), 900-904.
- Warnick, G. R., Cheung, M. C., & Albers, J. J. (1979). Comparison of current methods for high-density lipoprotein cholesterol quantitation. *Clinical Chemistry*, **25**(4), 596-604.
- Warnick, G. R., Nguyen, T., & Albers, A. (1985). Comparison of improved precipitation methods for quantification of high-density lipoprotein cholesterol. *Clinical Chemistry*, **31**(2), 217-222.
- Wasungu, L., & Hoekstra, D. (2006). Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *Journal of Controlled Release*, **116**(2), 255-264.
- Wiebe, D. A., & Smith, S. J. (1985). Six methods for isolating high-density lipoprotein compared, with use of the reference method for quantifying cholesterol in serum. *Clinical chemistry*, **31**(5), 746-750.
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics*, **42**, 217-239.

- Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., ... & Zimmermann, T. (2007). Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. *Nature biotechnology*, **25**(10), 1149.
- Yang, Y., Chawla, A., Zhang, J., Esa, A., Jang, H. L., & Khademhosseini, A. (2019). Applications of Nanotechnology for Regenerative Medicine; Healing Tissues at the Nanoscale. In *Principles of Regenerative Medicine* (pp. 485-504). Academic Press.
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, **15**(8), 541.
- Yip, K. W., & Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, **27**(50), 6398.
- Yoo, H. S., Lee, J. E., Chung, H., Kwon, I. C., & Jeong, S. Y. (2005). Self-assembled nanoparticles containing hydrophobically modified glycol chitosan for gene delivery. *Journal of Controlled Release*, **103**(1), 235-243.
- Zamecnik, P. C., & Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **75**(1), 280-284.
- Zare, M., Samani, S. M., & Sobhani, Z. (2018). Enhanced Intestinal Permeation of Doxorubicin using Chitosan Nanoparticles. *Advanced pharmaceutical bulletin*, **8**(3), 411.
- Zhao, L. M., Shi, L. E., Zhang, Z. L., Chen, J. M., Shi, D. D., Yang, J., & Tang, Z. X. (2011). Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **28**(3), 353-362.

http-1. <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-gene-therapy>

http-2. <http://www.genetherapynet.com/types-of-gene-therapy.html>

http-3. <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-607-hdl-purification-kit.pdf>

http-4. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26620>

http-5. <https://www.polyplus-transfection.com/technologies/what-is-transfection/>

EK1.: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın 06.02.2018 Karar Tarihli, No:29 Kararı.



**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BAŞKANLIĞI**

Prof. Dr. Ömür ŞAYLIGİL
(Başkan)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı

Sayı: 80558721/G - 40
Konu: Karar - Yüksek Lisans Öğr. Rasim MASİMOV

13 Şubat 2018

Doç. Dr. Uğur BİLGE
(Başkan Yardımcısı)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Aile Hekimliği Anabilim Dalı

Doç. Dr. Özlem ÖRSAL
(Raporör)
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Eskişehir Sağlık Bilimleri Fakültesi
Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı

Sayın; Yrd.Doç.Dr.Gülay BÜYÜKKÖROĞLU
Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Setenay DİNÇER
ÖNER
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyostatistik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr.Timuçin KAŞİFOĞLU
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı /
Romatoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Altan EŞSİZÖĞLU
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Ruh Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı

Doç.Dr.Ömer KILIÇ
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları
Anabilim Dalı /
Çocuk Enfeksiyon Hast. Bilim Dalı

Doç. Dr. Batu Can YAMAN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Restoratif Diş Tedavisi
Anabilim Dalı

Prof. Dr. Bekir YAŞAR
Genel Cerrahi Uzmanı

Av. Önder CAN
Avukat

Etik Kurul Sekreterliği
Aysun SERTTAŞ
Makbule SARIÇİÇEK
Tel: 0 222 239 29 79 / 4690

Sorumlu Araştırmacısı olduğunuz *"Gen Taşıyıcı Sistem Olarak HDL (yüksek-yoğunluk lipoprotein) Mikro-ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması"* başlıklı çalışma hakkında alınan karar ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini saygı ile rica ederim.

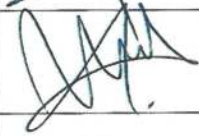
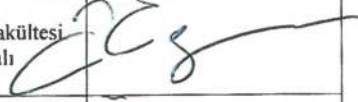
Prof.Dr.Ömür ŞAYLIGİL
Etik Kurul Başkanı
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
KARAR FORMU

Başvuru Tarihi: 15.12.2017	Çalışmanın Başlığı: "Gen Taşıyıcı Sistem Olarak HDL (yüksek-yoğunluk lipoprotein) Mikro-ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması" Çalışmacılar: Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı - Yrd.Doç.Dr.Gülay BÜYÜKKÖROĞLU (Yüksek Lisans Tez Danışmanı), Yüksek Lisans Öğr. Rasim MASİMOV (Yüksek Lisans Tez Sahibi)
Çalışmanın değerlendirildiği ilk toplantı tarihi: 09.01.2018	Sonuç: 1. Acıbadem Hastanesinde alınacak ve Anadolu Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji Laboratuvarına getirilecek kanlar ile ilişkili olarak Biyolojik Materyal Transfer Formunun doldurulması gerekmektedir.
Çalışmacılardan gelen düzeltme metni tarihi: 06.02.2018	Yrd.Doç.Dr.Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'nun yazısı 12.12.2017 Tarihinde tarafınıza yapmış olduğumuz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı için başvurumuza cevaben vermiş olduğunuz 805587221/G-33 sayılı yazınız gereği, Gen Taşıyıcı Sistem Olarak HDL (yüksek-yoğunluk lipoprotein) ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması isimli projedeki değişiklikler aşağıda belirtilmiştir. Başvurumuzda belirtilen Gönüllülerden alınacak kan örneklerinin, Acıbadem Hastanesinde alınacağı ve Anadolu Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD laboratuvarına taşınacağı bildirilmiştir. Acıbadem Hastanesi yöneticileri ile daha sonra yapılan görüşmeler sonucunda, kan örneklerinin Anadolu Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD laboratuvarında Hemşirelik Hizmeti ile alınmasının Hastane için daha uygun olacağı kararı verildiği bildirilmiştir. Bu nedenle 29.01.2018 tarihinde almış olduğunuz 805587221/G-33 sayılı görüş için gerekli olan Biyolojik Materyal Transfer Formu gerekliliği kalmadığından, sunmuş olduğumuz projeye ait 'BAŞVURU FORMLARI', 'BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU' ve 'İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI BAŞVURU FORMU (Uzmanlık Tezleri veya Akademik Amaçlı Yapılacak)' Laboratuvarımızda Hemşirelik Hizmeti alınarak yürütülecek şekilde düzenlenmiştir. Eskişehir Acıbadem Hastanesi'nin Hemşirelik Hizmeti vereceğini taahhüt eden ve aşağıdaki metni içeren onaylanmış yazısı ekte sunulmuştur. 1. Anadolu Üniversitesi Proje Biriminin adı geçen Projeyi onayladıktan ve bütçesini alımlara açmasında sonra, proje kapsamında kullanılmak üzere gönüllülerden kan alımının sağlanması için Hastanemiz Bünyesinde Görev yapan Hemşireler ile Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD laboratuvarında belirlenen ve proje bütçesinde yer alan ücret karşılığında Hemşirelik Hizmeti verilecektir. Çalışmanın ilk adımında, 2 saat içerisinde 15 gönüllüden (her bir gönüllüden 10 mL olmak kaydıyla) kan alınacaktır. Alınan kanlar Proje

	Yürütücüsü Farmasötik Biyoteknoloji ABD Öğretim üyesi Yard.Doç.Dr. Gülay Büyükköroğlu'na aynı laboratuvar içinde teslim edilecektir. 2. İlk aşamada toplanan kanların izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilecek HDL oranına bağlı olarak, Hemşirelik Hizmeti daha sonraki aşamalarda talebe bağlı olarak, etik kurul onayında belirtilen gönüllü sayısına (70-100 gönüllü) sınırları dahilinde kalacak şekilde devam ettirilecektir. Projemiz kapsamında ihtiyaç duyulan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayının bu düzeltme göz önünde bulundurularak değerlendirilmesi için gereğini arz ederim. Ekler: 1- Eskişehir Acıbadem Hastanesi Hemşirelik Hizmeti hakkındaki yazısı 2- 29.01.2018 Tarihli ve 805587221/G-33 sayılı yazınızın kopyası 3- Düzenlenmiş Başvuru Formları 4- Düzenlenmiş Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu 5- Düzenlenmiş ilaç Dışı Klinik Araştırmaları Başvuru Formu (Uzmanlık Tezleri veya Akademik Amaçlı Yapılacak)
Çalışmanın değerlendirildiği ikinci toplantı tarihi: 06.02.2018	Sonuç: 1. Gönüllü Haklarına uyum zorunludur. 2. Çalışmada kullanılacak kan örnekleri Anadolu Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı laboratuvarında alınacak ve aynı laboratuvarda çalışılacağı öğrenildiğinden Biyolojik Materyal Transfer Formuna ihtiyaç kalmamıştır. 3. Yukarıda açıklanan değişikliği de kapsayacak şekilde başvuru formları güncellenmiştir. 4. Bilgi gizliliğinin sağlanması gereken en önemli durumlardan biri görüşmeler esnasındaki gizliliklidir. 5. Gönüllünün sağlığına ve diğer kişilik haklarına zarar verilmemesi için gereken bütün tedbirler alınmalıdır. 6. Araştırmacılar İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (2015), Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi (2013)'ni imzalamış bu imza ile sorumluluğu kabul ettiklerini beyan etmişlerdir. 7. Araştırmacıların yetkin ve bu araştırma için yeterli oldukları anlaşılmaktadır.
Karar Tarihi: 06.02.2018 Karar No: 29	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yrd.Doç.Dr.Gülay BÜYÜKKÖROĞLU (Yüksek Lisans Tez Danışmanı) sorumluluğunda yürütülen "Gen Taşıyıcı Sistem Olarak HDL (yüksek-yoğunluk lipoprotein) Mikro-ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması" başlıklı çalışmanın yapılmasının etik açıdan uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir. Araştırmacılara başarılar dileriz.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

	Unvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	İmza
1	Prof. Dr. Ömür ŞAYLIGİL (Başkan)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
2	Doç. Dr. Uğur BİLGE (Başkan Yardımcısı)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı	
3	Doç. Dr. Özlem ÖRSAL (Raportör)	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eskişehir Sağlık Bilimleri Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği Anabilim Dalı	
4	Prof. Dr. Setenay DİNÇER ÖNER	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı	
5	Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı	
6	Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
7	Prof. Dr. Tımuçin KAŞİFOĞLU	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı / Romatoloji Bilim Dalı	
8	Doç. Dr. Altan EŞSİZÖĞLU	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
9	Doç. Dr. Ömer KILIÇ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı/ Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı	
10	Doç. Dr. Batu Can YAMAN	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi Anabilim Dalı	
11	Prof. Dr. Bekir YAŞAR	Genel Cerrahi Uzmanı	
12	Av. Önder CAN	Hukuk	

EK 2.: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın adı: Gen Taşıyıcı Sistem Olarak HDL (yüksek-yoğunluk lipoprotein) Mikro-ve Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Araştırmanın Amacı: Bu çalışma, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Nanoteknoloji Bilim Dalı'nda eğitimini devam ettiren Eczacı RASİM MASİMOV'un Yüksek Lisans projesi için kullanılacaktır.

Bu proje kapsamında, tarafınızdan alınacak yaklaşık 10 mL kan, kanınız içeriğinde bulunan HDL ve ApoA-I proteininin eldesi için kullanılacaktır. Bu ürünler, diğer gönüllülerden elde edilenlerle birlikte toplanacak ve öğrencinin tezi için gen taşıyıcı sistemlerin formülasyonunda kullanılacaktır. Bu formülasyonlar sadece araştırma için kullanılacak olup Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Laboratuvarında hazırlanacaktır.

HDL insan kanında bulunan doğal bir yağlı maddedir. ApoA-I proteini bu HDL ile birleşme ve karaciğer tarafından emilimi artırma özelliğindedir. Kanınızdan elde edilen bu iki ürünle hazırlanacak formülasyonlar, karaciğer kanser hücrelerini ölüme götürecek bir geni taşıyacak şekilde hazırlanacaktır. Sonrasında, laboratuvar ortamında bu formülasyonların karaciğer kanser hücreleri üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

- Bu çalışmaya katılımınız gönüllülük esasına dayanmaktadır.
- Çalışmanın amacı doğrultusunda, sizden sadece 10 mL kadar kan alınacaktır. Vücudunuza herhangi bir maddenin enjeksiyonu söz konusu değildir ve yukarıda bahsedilen laboratuvar çalışmalarına dahil edilmeyeceksiniz.
- Kan alma işleminiz, Eskişehir'de bulunan bir hastanenin Kan Alma Servisi'nde ve uzman kişiler tarafından yapılacaktır. Çalışmaya bağlı olarak maruz kalacağınız herhangi bir risk ya da rahatsızlık yoktur. Oluşabilecek muhtemel risk ve rahatsızlıklar, sadece hastanede kan alma sırasında karşılaşılabileceğiniz durumları kapsamaktadır.
- Çalışma süreçlerinde size rahatsızlık verebilecek herhangi bir soru/talep olmayacaktır. Yine de katılımınız sırasında herhangi bir sebepten rahatsızlık hissederseniz kan verme işleminden istediğiniz zamanda vazgeçebilirsiniz.
- Kanınız alındıktan hemen sonra ayrıştırma işlemine tabi tutulup diğer gönüllülerin ayrıştırma ürünleri ile birleştirileceğinden, kanınız alındıktan sonra çalışmanın dışında kalma talebiniz geçerli olmayacaktır.

Gönüllü katılım formunu okumak ve değerlendirmek üzere ayırdığınız zaman için teşekkür ederim.

Çalışma hakkındaki sorularınızı, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji ABD Öğretim Üyesi Yard.Doç.Dr. Gülay Büyükköroğlu'na 0 222 335 05 80/3737 telefon numarası ve gbuyukko@anadolu.edu.tr mail adresi ile yönleltebilirsiniz.

Bu çalışmaya tamamen kendi rızamla, istediğim takdirde çalışmadan ayrılabileceğimi bilerek verdiğim bilgilerin bilimsel amaçlarla kullanılmasını kabul ediyorum. (Lütfen bu formu doldurup imzaladıktan sonra veri toplayan kişiye veriniz.)

Gönüllüye Ait Bilgiler

İsim Soyad	Tarih	İmza	Telefon
	----/----/----		

Araştırmacı: Yard.Doç.Dr. Gülay Büyükköroğlu

İmza:

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı :Rasim MASIMOV
Doğum tarihi ve yeri :24.06.1994, Azerbaycan, Shaki
Uyruğu :AZERBAYCAN
E-posta :masimov.rasim@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise :2009-2011, Shaki şehir Fizik ve Matematik lisesi
Lisans :2011-2015, Azerbaycan Tıp Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Bölümü.
Yüksek lisans : 2016- 2019 Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri teknolojiler Anabilim Dalı, Nanoteknoloji Bölümü
Yabancı Diller :İngilizce
Katılan Kurslar ve Eğitim Programları
2017, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programı,
2017, Erasmus Staj Programı Gabriel D'Annunzio University of Chieti Pescara İtalya,
2018, Uluslararası İvek Bio Kongresi
2019, CRISPR/CAS9 Gen Düzenleme Çalıştayı.