

**KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE İPEK  
PROTEİN NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SILK  
PROTEIN NANOPARTICLES TO BE USED IN CANCER  
THERAPY**

**EDA YALÇIN**

**Prof. Dr. EMİR BAKİ DENKBAŞ**  
**Tez Danışmanı**

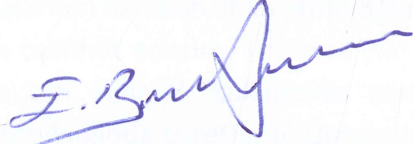
Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için öngördüğü  
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

**EDA YALÇIN**'ın hazırladığı “**Kanser Tedavisinde Kullanılmak Üzere İpek Protein Nanopartiküllerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

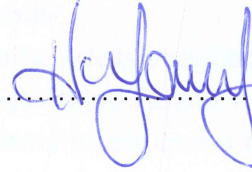
Prof. Dr. Ahmet ÇABUK  
Başkan



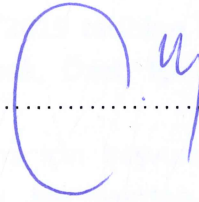
Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ  
Danışman



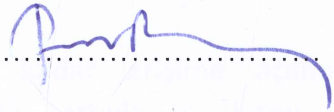
Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ  
Üye



Prof. Dr. Saadettin KILIÇKAP  
Üye



Yrd. Doç. Dr. Feray BAKAN  
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☒ Tezimin/Raporumun 26/02/2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☐ Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

26 / 02 / 2018



Eda Yalçın

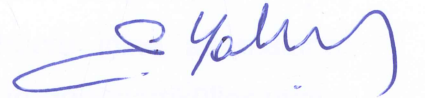
## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

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

beyan ederim.

16/02/2018



Eda YALÇIN

## **ÖZET**

# **KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE İPEK PROTEİN NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**EDA YALÇIN**

**Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ**

**Şubat 2018, 150 Sayfa**

Son yıllarda kanser tedavisinde yeni nesil bir yöntem olarak kanser hücrelerini hedeflemeye yönelik metodlar geliştirilmekte böylece sağlıklı hücrelerin zarar görmesi engellenebilmektedir. Bu yöntemlerden biri olan siRNA tedavisi, doğrudan sorunlu gene mRNA düzeyinde etkiğinden potansiyel bir terapötik yaklaşıma sahiptir. Ancak siRNA'nın sahip olduğu negatif yükün etkisiyle hücre membranından kolay geçememesi, plazma ve hücresel sitoplazmada nükleazlar tarafından hızlı bir şekilde degradasyona uğrama ihtimali ve dolayısıyla yarı ömrünün kısa olması terapötik kullanımını kısıtlayan engellerdendir. Dolayısıyla, siRNA taşınımı için etkili ve uygun bir taşıyıcı sisteminin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. DNA, RNA ya da ilaç gibi ajanların hücre içine alınmalarını kolaylaştırmak ve olası toksisiteleri minimuma indirmek için nanopartiküller uygun boyutlarıyla taşıyıcı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. İpek protein nanopartiküller toksik olmamaları, biyobozunur olmaları, vücuttan kolay atılabilmeleri, kararlılıkları ve fonksiyonel gruplar içermeleri nedeniyle hücre kültürü ve doku mühendisliği araştırmalarında kullanılan FDA onayı almış bir malzemedir. Ayrıca, genetik materyal taşıyıcısı olarak yüksek transfeksiyon etkisi ve DNaz enzimlerine karşı

Bu tez kapsamında serisin ve fibroin ipek proteinleriyle albuminin farklı oranlardaki etkileşimleriyle elde edilen dokuz farklı nanopartikül yapısı sentezlenmiş, optimizasyon ve karakterizasyonları yapılmıştır. Nanopartiküller PLL (poli-L-lizin) ile etkileştirilerek siRNA bağlanması arttırılmış ve ligand olarak hiyaluronik asit (HA) ile modifiye edilerek larinks kanseri hücrelerine seçimli nanopartiküller elde edilmiştir. CK2, ASH2L ve Siklin D1 hedefleyen siRNA'lar ile donatılan nanopartiküllerin gen susturma etkinliği HEp-2 hücre hattında *in vitro* ve fare modellerinde *in vivo* olarak incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, PLL ile dekore edilmiş, HA bağlı albumin:serisin (Alb:Ser) 2:1 w/w nanopartiküllerinin, diğer nanopartikül yapılarına göre siRNA taşınımı için daha iyi bir aday olduğu ve larinks kanseri tedavisinde umut vaat edici terapötik potansiyelin olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** ipek protein nanopartiküller, larinks kanseri, siRNA

## **ABSTRACT**

### **PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SILK PROTEIN NANOPARTICLES TO BE USED IN CANCER THERAPY**

**Eda YALÇIN**

**Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine Division**

**Supervisor: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ**

**February 2018, 150 Pages**

For the treatment of cancer in recent years, new generation methods are being developed by directly targeting of cancer cells, thereby preventing damage to healthy tissue. siRNA therapies are one of the new generation therapeutics; by acting directly at the level of problematic gene's mRNA. However, due to its negative charge, siRNA cannot easily pass across the cell membrane so have several limitations such as inability to penetrate efficiently into cells. Also, because of the siRNA's high possibility of enzymatic degradation by nucleases, their half-life is very short. An effective and suitable carrier system is needed for transportation of siRNA. Nanoparticles with appropriate sizes, are being frequently used as carriers to minimize the toxicity and to facilitate the RNA/DNA/therapeutics into the cells. FDA approved silk protein materials are being investigated for tissue engineering and cell culture with their not toxic, biodegradable, easy elimination from the body and stability properties. They are commonly used as drug delivery systems, also as a genetic material carrier as a non-viral system, due to their high transfection effects and resilience of the enzyme DNase.

In this thesis, sericin and fibroin were interacted with albumin at various ratios and nine different nanoparticles were synthesized, optimized and characterized. siRNA binding was enhanced by decorating the nanoparticles with PLL (poly-L-lysine) and targeted nanoparticles against to larynx cancer cells were obtained by modifying them with hyaluronic acid (HA) as a ligand. Nanoparticles were loaded with CK2, ASH2L and Cyclin D1 targeting siRNAs and gene silencing efficiencies were investigated in HEp-2 cell line and mouse models.

Obtained results demonstrated that PLL modified HA attached albumin:sericin (Alb:Ser) 2:1 w/w nanoparticles are better candidate for siRNA delivery among others due to their promising therapeutic potential in larynx cancer therapy.

**Key Words:** silk protein nanoparticles, larynx cancer, siRNA

## TEŞEKKÜRLER

Doktora eğitimim süresince bana tecrübeleriyle destek vererek, bana karşı her zaman hoşgörölü ve anlayışlı olan değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve her zaman yanımda olan sevgili eşi Ayşe Denkbaş ve çocuklarına;

Tez çalışmam süresince maddi manevi desteğiyle hep yanımda olan, çalışmalar sırasında gösterdiği tüm emeği için her zaman müteşekkir olacağım canım arkadaşım Göknur Kara'ya;

Bu süreçte bilgi ve birikimleri ile bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen, iyi ve kötü günlerde hep yanımda olan ve bana her zaman bunu hissettiren Dr. Ebru Erdal, Dr. Zeynep Karahaliloğlu ve Dr. Murat Demirbilek'e;

Çalışmalarım sırasında 115R018 no'lu 1001 projesi kapsamında, aynı zamanda tez dönemimde 2211-C numaralı burs programı ile maddi destek sağlayan TUBİTAK'a;

Bu proje ekibinde desteklerini ve emeklerini sunan arkadaşlarım; Ekin Çelik, Esin Yılmaz, Serhat Öztürk ve değerli hocalarım; Prof. Dr. Mehmet Hakan Korkmaz, , Ferda Alpaslan Pınarlı, Güleser Saylam, Ceren Sucularlı ve Ömer Bayır'a

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili laboratuvar arkadaşlarım; Soheil Malekghasemi, Gizem Daban, Tafun Vural, Öznur Akbal, Betül Bozdoğan, Shukran Alpdemir, Yeşim Tuğçe Yaman'a

Hayvan deneyleri çalışmalarımdaki özverili katkıları için KOBAY A. Ş. çalışanlarına,

Hayatımın her anında sevgi, sabır ve güvenleriyle beni maddi manevi destekleyen değerli ailem; babam Doğan Yalçın, annem Mesude Yalçın, ablam Ece Bakioğlu, eniştem Serdar Bakioğlu, canım yeğenim Kaan Bakioğlu ve büyük bir aile olmama vesile olan Albayrak ailesine,

Hayatıma kattığı mutluluk, sevgi ve güvenle her daim yanımda olmasını dilediğim sevgili nişanlım M. Bilge Kağan Albayrak'a

Sonsuz teşekkürler, iyi ki varsınız😊

# İÇİNDEKİLER

|                                                                               |       |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET .....                                                                    | i     |
| ABSTRACT .....                                                                | iii   |
| TEŞEKKÜRLER .....                                                             | v     |
| İÇİNDEKİLER .....                                                             | vi    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                         | viii  |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                         | xvi   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                  | xviii |
| 1. GİRİŞ.....                                                                 | 1     |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                                       | 3     |
| 2.1 Kanser .....                                                              | 3     |
| 2.1.1 Larinks Kanseri .....                                                   | 4     |
| 2.1.2 Nanoteknoloji ve larinks kanseri .....                                  | 5     |
| 2.2 Gen Susturma Stratejileri.....                                            | 7     |
| 2.2.1 siRNA'nın sistemik taşınımındaki Zorluklar ve Engeller.....             | 9     |
| 2.2.2 siRNA terapötikleri için Nanopartiküller .....                          | 10    |
| 2.3 Protein Tabanlı Nanopartiküller.....                                      | 11    |
| 2.3.1 Albumin .....                                                           | 12    |
| 2.3.2 İpek Proteinleri .....                                                  | 14    |
| 2.4 Hyalüronik Asit (Hyalüran-HA).....                                        | 19    |
| 2.5 Kendiliğinden düzenlenen sistemler .....                                  | 21    |
| 2.6 Kazein Kinaz Proteini (CK2).....                                          | 22    |
| 2.7 ASH2L .....                                                               | 23    |
| 2.8 Siklin D1 .....                                                           | 23    |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....                                                  | 25    |
| 3.1 İpek protein nanopartiküllerinin üretimi ve karakterizasyonu .....        | 25    |
| 3.1.1 İpek protein nanopartiküllerinin üretimi .....                          | 25    |
| 3.1.2 Üretilen ipek protein nanopartiküllerinin malzeme karakterizasyonu..... | 28    |
| 3.1.3 Raf Ömrü ve Bozunum Testleri .....                                      | 30    |
| 3.2 İpek protein nanopartiküllerine siRNA yüklenmesi ve Ligand Bağlanması ... | 30    |
| 3.2.1 İpek protein nanopartiküllerine siRNA yüklenmesi.....                   | 31    |
| 3.2.2 İpek protein nanopartiküllerine ligand bağlanması.....                  | 31    |

|       |                                                                                    |     |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.3 | siRNA yüklenme veriminin incelenmesi.....                                          | 32  |
| 3.3   | siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerinin in vitro etkinlik testleri .....      | 35  |
| 3.3.1 | Hücrelerin Hazırlanması ve siRNA yüklü partiküllerin hücrelere transfeksiyonu..... | 35  |
| 3.3.2 | Sitotoksosite Testleri .....                                                       | 36  |
| 3.3.3 | xCELLingence Gerçek Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi .....                      | 40  |
| 3.3.4 | Real time PCR Analizi .....                                                        | 42  |
| 3.3.5 | Akış Sitometrisi ile Annexin V-PI analizi .....                                    | 45  |
| 3.3.6 | İstatiksel Analiz .....                                                            | 46  |
| 3.4   | siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerinin in vivo etkinlik testleri .....       | 47  |
| 3.4.1 | Fare Ksenograft Larinks Kanseri Dokusunun Oluşturulması .....                      | 47  |
| 3.4.2 | Histolojik İncelemeler .....                                                       | 48  |
| 4.    | BULGULAR VE TARTIŞMA.....                                                          | 49  |
| 4.1   | Üretilen nanopartiküllerin optimizasyonu ve karakterizasyonu.....                  | 49  |
| 4.1.1 | Nanopartiküllerin boyut ve yüzey yükü incelemeleri.....                            | 49  |
| 4.1.2 | Morfolojik Analizler .....                                                         | 55  |
| 4.1.3 | Nanopartiküllerin fizikokimyasal karakterizasyonları .....                         | 56  |
| 4.1.4 | Nanopartiküllerin Raf ömrü ve Bozunum Testleri .....                               | 88  |
| 4.2   | Nanopartiküllere siRNA yüklenmesi ve siRNA bağlanma veriminin incelenmesi .....    | 91  |
| 4.3   | siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerinin in vitro etkinlik testleri .....      | 92  |
| 4.3.1 | Sitotoksosite Testleri .....                                                       | 92  |
| 4.3.2 | xCELLingence Gerçek Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi .....                      | 96  |
| 4.3.3 | Real Time PCR Analizi.....                                                         | 105 |
| 4.3.4 | Akış Sitometrisi ile Annexin V-PI analizi .....                                    | 107 |
| 4.4   | siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerinin in vivo etkinlik testleri .....       | 109 |
| 4.4.1 | Tümör boyut analizi .....                                                          | 109 |
| 4.4.2 | Histolojik İncelemeler .....                                                       | 122 |
| 5.    | SONUÇLAR.....                                                                      | 130 |
| 6.    | KAYNAKLAR .....                                                                    | 133 |
|       | ÖZGEÇMİŞ.....                                                                      | 150 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2-1 miRNA ve siRNA yolakları [48].....                                                                                                                                                                                                                                     | 8  |
| Şekil 2-2 Albuminin kimyasal yapısı ve domainleri .....                                                                                                                                                                                                                          | 13 |
| Şekil 2-3 İpek Proteinleri fiziksel yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                 | 16 |
| Şekil 2-4 İpek Fibroinin Kimyasal Formülü .....                                                                                                                                                                                                                                  | 16 |
| Şekil 2-5 İpek Fibroin Yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                              | 17 |
| Şekil 2-6 Hyalüronik Asitin kimyasal yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                | 20 |
| Şekil 3-1 Protein Nanopartiküllerin Sentez Şeması .....                                                                                                                                                                                                                          | 28 |
| Şekil 3-2 HEp-2 hücrelerinin görüntüsü .....                                                                                                                                                                                                                                     | 35 |
| Şekil 3-3 MTT yapısında tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşmesinin şematik gösterimi.....                                                                                                                                                                        | 37 |
| Şekil 4-1 Farklı desolvasyon ajanları kullanılarak elde edilen protein nanopartiküllerin boyut dağılım grafiği .....                                                                                                                                                             | 50 |
| Şekil 4-2 Farklı pH'larda sentezlenen nanopartiküllerin boyut dağılım grafiği.....                                                                                                                                                                                               | 53 |
| Şekil 4-3 Farklı çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen nanopartiküllerin boyut dağılım grafiği.....                                                                                                                                                                           | 55 |
| Şekil 4-4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri a) albümin Np b) fibroin Np c) albümin/fibroin (1:1) Np d) albümin/fibroin (2:1) Np e) albümin/fibroin (1:2) Np f) Serisin Np g) albumin/serisin (1:1) Np h) albumin/serisin (2:1) Np ı) albumin/serisin (1:2) Np ..... | 56 |
| Şekil 4-5 Albumin nanopartiküllerin FT-IR spektrumu .....                                                                                                                                                                                                                        | 57 |
| Şekil 4-6 Fibroin nanopartiküllerin FT-IR spektrumu .....                                                                                                                                                                                                                        | 57 |
| Şekil 4-7 Alb-Fib (1:1) nanopartiküllerin FT-IR spektrumu .....                                                                                                                                                                                                                  | 58 |
| Şekil 4-8 Alb-Fib (2:1) nanopartiküllerin FT-IR spektrum .....                                                                                                                                                                                                                   | 59 |
| Şekil 4-9 Alb-Fib (1:2) nanopartiküllerin FT-IR spektrumu .....                                                                                                                                                                                                                  | 59 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-10 Serisin nanopartiküllerin FT-IR spektrumu .....                                                                                                                                                                                                                            | 60 |
| Şekil 4-11 Alb-Ser (1:1) nanopartiküllerin FT-IR spektrumu .....                                                                                                                                                                                                                      | 60 |
| Şekil 4-12 Alb-Ser (2:1) nanopartiküllerin FT-IR spektrum .....                                                                                                                                                                                                                       | 61 |
| Şekil 4-13 Alb-Ser (1:2) nanopartiküllerin FT-IR spektrumu .....                                                                                                                                                                                                                      | 62 |
| Şekil 4-14 Hyaluronik asit (HA) FTIR spektrumu.....                                                                                                                                                                                                                                   | 62 |
| Şekil 4-15 Karbonat tamponunda hazırlanan HA-Alb-Ser(2:1) Np'lerin FTIR spektrumu..                                                                                                                                                                                                   | 63 |
| Şekil 4-16 Borat tamponunda hazırlanan HA-Alb-Ser(2:1) Np'lerin FTIR spektrumu .....                                                                                                                                                                                                  | 64 |
| Şekil 4-17 Hyaluronik asit, karbonate ve borat tamponunda hazırlanan nanopartiküllerin<br>çakışık FTIR spektrumu (en soldan yukardan aşağı sırasıyla; karbonat tamponunda<br>hazırlanan HA-Alb-Ser(2:1) Np, Hyaluronik asit, Borat tamponunda hazırlanan HA-Alb-<br>Ser(2:1) Np)..... | 64 |
| Şekil 4-18 Albumin nanopartiküllerin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları.....                                                                                                                                                                                                         | 66 |
| Şekil 4-19 Fibroin nanopartiküllerin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları.....                                                                                                                                                                                                         | 67 |
| Şekil 4-20 Alb-fib (1:1 w/w) partiküllerinin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları .....                                                                                                                                                                                                | 69 |
| Şekil 4-21 Alb-fib (2:1 w/w) partiküllerinin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları .....                                                                                                                                                                                                | 70 |
| Şekil 4-22 Alb-fib (1:2 w/w) partiküllerinin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları .....                                                                                                                                                                                                | 71 |
| Şekil 4-23 Serisin partiküllerinin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları.....                                                                                                                                                                                                           | 72 |
| Şekil 4-24 Alb-Ser(1:1 w/w) partiküllerinin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları .....                                                                                                                                                                                                 | 74 |
| Şekil 4-25 Alb-Ser(2:1 w/w) partiküllerinin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları .....                                                                                                                                                                                                 | 75 |
| Şekil 4-26 Alb-Ser(1:2 w/w) partiküllerinin a)1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları .....                                                                                                                                                                                                 | 77 |
| Şekil 4-27 Farklı konsantrasyonlardaki protein nanopartiküllerin mukayeseli DSC<br>sonuçları .....                                                                                                                                                                                    | 78 |
| Şekil 4-28 Albumin Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği.....                                                                                                                                                                                                                             | 79 |
| Şekil 4-29 Albumin Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği.....                                                                                                                                                                                                                            | 80 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-30 Serisin Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 81 |
| Şekil 4-31 Serisin Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 82 |
| Şekil 4-32 Albumin-Serisin (1:1 w/w) Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 83 |
| Şekil 4-33 Albumin-Serisin (1:1 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 84 |
| Şekil 4-34 Albumin-Serisin (1:2 w/w) Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 85 |
| Şekil 4-35 Albumin-Serisin (1:2 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 85 |
| Şekil 4-36 Albumin-Serisin (2:1 w/w) Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 86 |
| Şekil 4-37 Albumin-Serisin (2:1 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 87 |
| Şekil 4-38 Albumin, Alb-Ser(2:1 w/w) ve Serisin nanopartiküllerin 4 haftalık turbidimetrik absorbans grafiği .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 89 |
| Şekil 4-39 Albumin, alb-ser (2:1 w/w) ve serisin nanopartiküllerin yüzde bozunum grafiği .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 90 |
| Şekil 4-40 Hazırlanan Partiküllerin Elektroforez Testi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 91 |
| Şekil 4-41 Farklı konsantrasyondaki Albumin, Serisin ve Alb-Ser (2:1 w/w) nanopartiküllerin %canlılık (biyoyumluluk) grafiği (Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, n=8) .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 93 |
| Şekil 4-42 Farklı miktarlardaki ASH2L siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece ASH2L siRNA'ların HEp-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik toksik etkisi (siRNA1: 0,7125 $\mu$ g (2,5 $\mu$ l); siRNA2: 1,425 $\mu$ g (5 $\mu$ l); siRNA3: 2,85 $\mu$ g (10 $\mu$ l); siRNA4: 5,7 $\mu$ g (20 $\mu$ l). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, n=8) .....         | 94 |
| Şekil 4-43 Farklı miktarlardaki Cyclin D1 siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece Cyclin D1 siRNA'ların HEp-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik toksik etkisi (siRNA1: 0,7125 $\mu$ g (2,5 $\mu$ l); siRNA2: 1,425 $\mu$ g (5 $\mu$ l); siRNA3: 2,85 $\mu$ g (10 $\mu$ l); siRNA4: 5,7 $\mu$ g (20 $\mu$ l). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, n=8) ..... | 94 |
| Şekil 4-44 Farklı miktarlardaki CK2 siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece CK2 siRNA'ların HEp-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik toksik etkisi                                                                                                                                                                                                                                                      |    |

(siRNA1: 0,7125µg (2,5µl); siRNA2: 1,425µg (5µl); siRNA3: 2,85µg (10µl); siRNA4: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir, n=8) .....95

Şekil 4-45 96 kuyulu e-plaka yerleşim düzeni .....96

Şekil 4-46 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm test numunelerinin (ASHL2, CSKN, CD1, NASHL2, NCSKN, NCD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin hücre indeksi ile gösterilmesi .....97

Şekil 4-47 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm test numunelerinin (ASHL2, CSKN, CD1, NASHL2, NCSKN, NCD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20) .....98

Şekil 4-48 Plaka düzenine göre Şekil 4-46 ve Şekil 4-47 verileri için renk skalası.....98

Şekil 4-49 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm nanopartiküllü test numunelerinin (ASHL2, CSKN, CD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20) .....99

Şekil 4-50 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm nanopartiküllü test numunelerinin (ASHL2, CSKN, CD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20).....99

Şekil 4-51 Plaka düzenine göre nanopartiküllü test numunelerinin Şekil 4-49 ve Şekil 4-50 verileri için renk skalası.....100

Şekil 4-52 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm nanopartikülsüz test numunelerinin (NASHL2, NCSKN, NCD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20) ....100

Şekil 4-53 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm nanopartikülsüz test numunelerinin (NASHL2, NCSKN, NCD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20).....101

Şekil 4-54 Plaka düzenine göre nanopartikülsüz test numunelerinin Şekil 4-52 ve Şekil 4-53 verileri için renk skalası.....101

Şekil 4-55 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine nanopartiküllü (ASHL2 siRNA) ve nanopartikülsüz (NASHL2) test numunelerinin ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20).....                                                                                                                                                                                                                                                   | 102 |
| Şekil 4-56. Plaka düzenine göre nanopartiküllü (ASHL2 siRNA) ve nanopartikülsüz (NASHL2) test numunelerinin Şekil 4-55 verileri için renk skalası .....                                                                                                                                                                                                         | 102 |
| Şekil 4-57. HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine nanopartiküllü (CSKN siRNA) ve nanopartikülsüz (NCSKN) test numunelerinin ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20).....                                                                            | 103 |
| Şekil 4-58. Plaka düzenine göre nanopartiküllü (CSKN siRNA) ve nanopartikülsüz (NCSKN) test numunelerinin Şekil 4-57 verileri için renk skalası .....                                                                                                                                                                                                           | 103 |
| Şekil 4-59. HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine nanopartiküllü (CD1 siRNA) ve nanopartikülsüz (NCD1) test numunelerinin ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20).....                                                                              | 104 |
| Şekil 4-60. Plaka düzenine göre nanopartiküllü (CD1 siRNA) ve nanopartikülsüz (NCD1) test numunelerinin Şekil 4-59 verileri için renk skalası .....                                                                                                                                                                                                             | 104 |
| Şekil 4-61 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine nanopartiküllü ve nanopartikülsüz siRNA test numunelerinin ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20) .....                                                                                           | 105 |
| Şekil 4-62. Farklı miktarlardaki ASH2L siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece ASH2L siRNA'ların HEp-2 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen RT-PCR analizi (siRNA1: 2,85µg (10µl); siRNA2: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, n=3) .....         | 106 |
| Şekil 4-63. Farklı miktarlardaki Cyclin D1 siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece Cyclin C1 siRNA'ların HEp-2 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen RT-PCR analizi (siRNA1: 2,85µg (10µl); siRNA2: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, n=3) ..... | 106 |
| Şekil 4-64. Farklı miktarlardaki CK2 siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece CK2 siRNA'ların HEp-2 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen RT-PCR analizi (siRNA1: 2,85µg (10µl); siRNA2: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir, n=3) .....             | 107 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4-65. Akış sitometrisi ile elde edilen in-vitro örneklerle inkübe edilmiş HEp-2 hücrelerinin yüzdesel apoptoz, nekroz ve canlı hücre grafiği (10 ve 20, kullanılan siRNA miktarının µl olarak ifadesidir).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 108 |
| Şekil 4-66. intraperitoneal uygulama sonrasında tümör dokudan alınan örnekler .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 109 |
| Şekil 4-68. intraperitoneal uygulama sonrasında tümör dokudan alınan örnekler .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 110 |
| Şekil 4-69. Ligand ile modifiye edilmemiş boş NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 111 |
| Şekil 4-70. Ligand ile modifiye edilmiş boş NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 112 |
| Şekil 4-71. Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L siRNA yüklü NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 113 |
| Şekil 4-72. Ligand ile modifiye edilmiş CK2 siRNA yüklü NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 114 |
| Şekil 4-73. Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L ve CK2 siRNA yüklü NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 115 |
| Şekil 4-74. ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect) (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 116 |
| Şekil 4-75. CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect) (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 117 |
| Şekil 4-76. ASH2L ve CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect) (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 118 |
| Şekil 4-77. PBS ile muamele edilmiş (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 119 |
| Şekil 4-78. Tümör boyutları yaklaşık 8 x 8 mm olan hayvanların doz enjeksiyon sonrası tümör hacmi grafiği 1: Ligand ile modifiye edilmemiş boş NPs, 2: Ligand ile modifiye edilmiş boş NPs, 3: Ligand ile modifiye edilmiş CK2 siRNA yüklü NPs, 4: Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L siRNA yüklü NPs, 5: Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L ve CK2 siRNA yüklü NPs, 6: ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect), 7: CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect), 8: CK2 ve ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect) ..... | 120 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4-79. Tümör boyutları yaklaşık 4 x 4 mm olan hayvanların doz enjeksiyon sonrası tümör hacmi grafiği 1: Ligand ile modifiye edilmemiş boş NPs, 2: Ligand ile modifiye edilmiş boş NPs, 3: Ligand ile modifiye edilmiş CK2 siRNA yüklü NPs, 4: Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L siRNA yüklü NPs, 5: Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L ve CK2 siRNA yüklü NPs, 6: ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect), 7: CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect), 8: CK2 ve ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect) ..... | 121 |
| Şekil 4-80. ASH2L siRNA yüklü nanopartiküllü bazı gruplarda organ toksisitesi için H&E ile boyanan doku örneklerinin makroskopik kesitsel görünümü.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 122 |
| Şekil 4-81. CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan karaciğer dokusu (10X10 Büyütme).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 123 |
| Şekil 4-82. ASH2L siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan kalp dokusu (10X10 Büyütme).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 123 |
| Şekil 4-83. ASH2L ve CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan akciğer dokusu (10X10 Büyütme) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 124 |
| Şekil 4-84. CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan böbrek dokusu (10X10 Büyütme).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 124 |
| Şekil 4-85. ASH2L ve CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı ile tedavi edilmiş hayvan dalak dokusu (10X10 Büyütme) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 125 |
| Şekil 4-86. Boş ve siRNA ile yüklenmiş nanopartikül/ticari taşıyıcı ile tedavi edilmiş bazı farelerin tümör dokusunun h&e boyamada makroskopik kesitsel görünümü. Kırmızı okla işaretlenen koyu mavi alanlar yoğun tümör dokusunu gösterirken sarı okla işaretlenen açık mavi alanlar ise nekrotik alanları ifade etmektedir. ....                                                                                                                                                                                                 | 126 |
| Şekil 4-87. Boş nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 127 |
| Şekil 4-88. CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 128 |
| Şekil 4-89. CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 128 |
| Şekil 4-90. ASH2L siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 129 |

Şekil 4-91. ASH2L ve CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz .....129



## TABLÖLAR DİZİNİ

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 3-1. HEp-2 hücrelerinin hücre kültür ortamı.....                                                                               | 36 |
| Tablo 3-2. Hücre etkileşimlerine ait çalışma planı .....                                                                             | 38 |
| Tablo 3-3. HEp-2 hücreleri üzerine uygulanan test maddeleri, konsantrasyonları ve kontrol grupları .....                             | 42 |
| Tablo 3-4. Analiz edilecek her bir gen için hazırlanan reaksiyon ortamı.....                                                         | 45 |
| Tablo 3-5. Kullanılan ısı döngüleyici için reaksiyon koşulları .....                                                                 | 45 |
| Tablo 3-6. In vivo deney ve kontrol grupları (NPs: Nanopartiküller) .....                                                            | 47 |
| Tablo 4-1. Desolvasyon ajanı olarak aseton kullanılarak oluşturulan nanopartiküllerin boyut dağılımları ve yüzey yükü sonuçları..... | 49 |
| Tablo 4-2. Desolvasyon ajanı olarak etanol kullanılarak oluşturulan nanopartiküllerin boyut dağılımları ve yüzey yükü sonuçları..... | 50 |
| Tablo 4-3. Farklı pH'larda oluşturulan nanopartiküllerin boyut dağılımı ve yüzey yükü sonuçları .....                                | 52 |
| Tablo 4-4. Farklı çapraz bağlayıcı oranlarında oluşturulan nanopartiküllerin boyut ve yüzey yükü sonuçları .....                     | 54 |
| Tablo 4-5. Albumin Nanopartiküllerin Cp Değerleri .....                                                                              | 80 |
| Tablo 4-6. Serisin Nanopartiküllerin Cp Değerleri .....                                                                              | 82 |
| Tablo 4-7. Albumin-Serisin (1:1 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değerleri.....                                                             | 84 |
| Tablo 4-8. Albumin-Serisin (1:2 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değerleri.....                                                             | 86 |
| Tablo 4-9. Albumin-Serisin (2:1 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değerleri.....                                                             | 87 |
| Tablo 4-10. Farklı miktarlardaki siRNA'ların Alb:Ser (2:1) nanopartiküllerine bağlanma verimi sonuçları .....                        | 92 |

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tablo 4-11. Tedavi sonrası grupların Tümör Alanı/ Nekroz alanı oranı hesaplamaları..... | 126 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### KISALTMALAR

|         |                                                                           |
|---------|---------------------------------------------------------------------------|
| ALB     | Albumin                                                                   |
| BC4     | Transkriptaz Karışım Tamponu                                              |
| BSA     | Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)                               |
| BT      | Bilgisayarlı Tomografi                                                    |
| CAM     | Hücre İçi Adezyon Molekülü                                                |
| CCND1   | Siklin D1                                                                 |
| CK2     | Kazein Kinaz                                                              |
| DEPC    | Diethylpyrocarbonate (Dietilpirokarbonat)                                 |
| DLS     | Dinamik Işık Saçılması                                                    |
| DMSO    | Dimethyl Sulfoxide (Dimetilsülfoksit)                                     |
| DSC/TGA | Diferansiyel Scanning Kalorimetre /<br>Termogravimetrik Analiz            |
| dsRNA   | Double Strain DNA (Çift Zincirli RNA)                                     |
| DTA     | Diferansiyel Termal Analiz                                                |
| DTG     | Diferansiyel Termogravimetri                                              |
| EDC     | 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide<br>hydrochloride            |
| EDTA    | Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamine<br>Tetra Asetik Asit)      |
| EMEM    | Eagle's Minimum Essential Medium                                          |
| EtBr    | Ethidium Bromide (Etidyum Bromür)                                         |
| FBS     | Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serum)                                    |
| FDA     | Food and Drug Administration (Amerikan Gıda<br>ve İlaç Dairesi)           |
| FTIR    | Fourier Transform Infrared Spektroskopisi<br>(Fourier Dönüşüm Kızılötesi) |
| G.A.    | Gluteraldehit                                                             |
| HA      | Hiyaluronik Asit / Hyaluran                                               |
| HCl     | Hydrochloride Acid (Hidroklorik Asit)                                     |
| Hep-2   | Larinks Kanseri Hücre Hattı                                               |
| HSA.    | Human Serum Albumin (İnsan Serum Albumin)                                 |

|          |                                                                                  |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| IR       | İnfrared Spektroskopisi                                                          |
| M        | Molar                                                                            |
| miRNA    | mikro RNA                                                                        |
| MRI      | Magnetic Resonance İmaging (Manyetik Rezonans Görüntüleme)                       |
| mRNA     | Messenger RNA (Mesajcı RNA)                                                      |
| MTT      | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide                     |
| NaOH     | Sodium Hydroxide (Sodyum Hidroksit)                                              |
| NMR      | Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans)                           |
| PBS      | Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponu)                                       |
| PCR      | Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)                          |
| PDI      | Poly Dispersity Index (Polidispersite İndeksi)                                   |
| PET      | pozitron emisyon tomografisi                                                     |
| PLL      | Poli-L-lisin                                                                     |
| RES      | Retikoendoteryer sistem                                                          |
| RISC     | RNA-induced silencing complex                                                    |
| Rpm      | Rotation per minute                                                              |
| RT-PCR   | Real Time Polymerase chain Reaktion (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) |
| SDS      | Sodium dodecyl sulfate                                                           |
| SEM      | Taramalı elektron mikroskobu                                                     |
| SER      | Serisin                                                                          |
| shRNA    | small hairpin RNA                                                                |
| siRNA    |                                                                                  |
| TBE      | Tris/Borate/EDTA                                                                 |
| TG       | termogravimetri                                                                  |
| Tris-HCl |                                                                                  |
| w/w      | weight to weight                                                                 |
| XTT      | 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide          |

## 1. GİRİŞ

Günümüzde insanlığın önemli sağlık sorunlarından çözümü bekleyen hastalıkların başında kanser gelmektedir. Her yıl binlerce insanın yakalandığı kanserle ilgili oldukça yoğun çalışmalar halen yürütülüyor olmakla birlikte tam olarak tedavisi de yapılamamaktadır [1]. Bugüne kadar uygulanmakta olan radyoterapi, kemoterapi, ozon terapisi gibi yöntemler sadece hastanın yaşam sürecinde rahat etmesine yönelik olmakla birlikte, tümör hücrelerinin hareketliliği sebebiyle cerrahi işlemler dahi tam anlamıyla başarıyla sonuçlanamamaktadır. İnsanlığı etkileyen en önemli kanserden biri de baş ve boyun kanserleridir.

Baş ve boyun kanserleri dünyada en sık görülen 6. kanser türüdür. Bu tümörlere yapılan cerrahi işlemler bulundukları yer itibariyle komplikasyonlar için yüksek risk taşımaktadır. Ayrıca operasyonlar görünür estetik bozukluklar, yutkunma ve konuşma fonksiyonlarında bozulmalar gibi yaşam kalitesinde ciddi kötüleşmelere neden olabilmektedir [2]. Baş ve boyun kanserlerinin %90'ını dilin arasında boğazda yer alan, larinks (ses tellerinin bulunduğu gırtlak) bölgesinde oluşan tümörler oluşturmaktadır. Larinks kanseri akciğer kanserinden sonra en sık görülen solunum sistemi kanseridir [3]. Aşırı sigara ve alkol tüketiminin en sık etyolojik faktör olduğu larinks kanseri tedavisinde radyoterapi, kemoterapi, larinjektomi ya da bunların kombinasyonları uygulanmakta olup, özellikle ileri evrelerde bir tedavinin diğerine göre herhangi bir üstünlüğü henüz bildirilmemiştir. Ayrıca bu tedaviler sonucu hastaların büyük çoğunluğunda hastalığın tekrar ettiği belirlenmiştir [4].

Larinks kanserinin tam açıklanamayan oluşumu-gelişimi, mevcut cerrahi girişimlerin dezavantajları ve diğer tedavi yöntemlerinin yetersizliği bilim adamlarını terapötik modeller geliştirmeye itmiştir. Baş ve boyun bölgesi kanserleri tedavileri için kullanılan ve farklı terapötik ajanlar taşıyan nanopartikül sistemleri laboratuvar ortamında olumlu sonuçlar vermektedir [5]-[7]. Ayrıca vücutta düzenleyici olarak önemli rolü olan epigenetik mekanizmaların birçok kanser türünde olduğu gibi baş ve boyun kanserleri konusunda da etkili olabileceği farkedilmiş, bu konuda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir [8],[9]. Benzer çalışmalar larinks kanserine spesifik koşullarda da gerçekleştirilmiş, *in vitro* koşullarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir

[10]-[12]. Söz konusu yeni nesil tedavi modeli olarak siRNA temelli hedefli stratejiler bu bağlamda kanser tedavisinde önem kazanmakta ve bu metodların terapötik etkinliği gün geçtikçe artmaktadır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kanser

Kanser, vücudun belirli bir bölümündeki normal hücreler kontrol dışı çoğalmaya başladığında ortaya çıkmaktadır. Her türlü kanser hücresi ölmek yerine büyür, bölünür ve tekrar bölünmeye devam eder böylelikle yeni anormal hücreler oluştururlar. Bazı kanser türlerinde hücreler genellikle kan dolaşımı veya lenf damarları (metastaz) yoluyla vücudun diğer bölgelerine taşınır ve burada büyümeye devam ederler. Örneğin bir göğüs kanseri hücresi kan dolaşımı yoluyla karaciğere yayılırken kanser halen meme kanseri olarak adlandırılır, bu yapı karaciğer kanseri olarak adlandırılmaz [13]. Genellikle kanser hücreleri DNA hasarına bağlı olarak normal hücrelerden oluşur. DNA'sının hasar gördüğü çoğu hücre vücut tarafından onarılmaktadır. Ancak kanser hücrelerinde hasar gören DNA onarılamaz. İnsanlar kansere sebep olan DNA hasarını kalıtsal olarak anne ve babadan da alabilmektedir. Kalıtsal durumun haricinde bir kişinin DNA'sı, sigara içmek, radyasyona maruz kalmak gibi çevresel faktörlerden de hasar görebilmektedir.

Kanser genel olarak katı dokulu bir tümör oluşturmaktadır. Lösemi (kan kanseri) gibi bazı kanserler türleri tümör oluşturmazlar [14]. Bunun yerine, lösemi hücreleri kan ve kan oluşturan organlarda ve büyüdükleri diğer dokularda dolaşırlar. Tüm tümörler kanserlidir ancak bazı tümörler iyi huylu olarak tanımlanmaktadır (kanserli değildir). İyi huylu tümörler büyümemekte ve hayati tehlike oluşturmamaktadır [15],[16]. Farklı kanser türlerinin farklı gelişimleri, farklı mekanizmaları ve farklı etkileri olabilmektedir. Erken dönemde kanser tespit edilirse tedavisi daha kolay ve yıllarca yaşam şansı daha yüksek olabilmektedir [17],[18].

20. yüzyılın ortalarında, bilim adamları kimya ve biyolojinin karmaşık sorunlarını kanserin arkasında çözmeye başladılar. Watson ve Crick'in, DNA sarmal yapısının 1962'de keşfinden sonra bilim adamları, genlerin nasıl çalıştığını ve mutasyonlarla nasıl zarar görebileceklerini öğrenmişlerdir [19],[20]. Bilim insanları tarafından, kanserlerin kimyasal maddeler (kanserojen maddeler), radyasyon, virüsler ve genetik faktörler sebebiyle meydana gelebileceği tespit edilmiştir. Çoğu kanserojen DNA'ya hasar vermekte, bu da hücrelerin anormal büyümesine yol açmaktadır. Hasar gören DNA'ya sahip kanser hücreleri normal hücrelerde olduğu

gibi ölmez aksine bölünmeye devam ederek tümör dokusunu oluşturmaktadır [21]-[23].

RNA ekspresyon profillemesi, bilim insanlarının bir anda birçok RNA molekülünün göreceli miktarlarını belirlemelerine izin vermiştir. Kansere hücrede hangi proteinlerin veya RNA moleküllerinin bulunduğunu bilmek, bir hücrenin nasıl davrandığını ve çoğu zaman hangi ilaçların belirli bir tümör hücresinin yanıt vereceğini tahmin etmesine yardımcı olabilmektedir. Kanserle karşı savaş kazanmak, şu anki tıbbi araştırmanın odağı olmuştur. Birçok yeni kanser tedavi yöntemi ve baskılama hedefi keşfedilmiş olsa da, kanser için kesin çözüm olabilecek bir ilaç henüz geliştirilememiştir. Daha fazla araştırma ve farklı klinik izler kanser tedavisini bulmanın anahtarı olacaktır. Kanser hastalığının karmaşıklığı, tüm alanlarda kansere karşı savaşmak için bilimsel bir mücadele gerektirir [24]-[29].

### **2.1.1 Larinks Kanseri**

Her yıl dünya çapında yarım milyondan fazla hastaya baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom tanısı konmaktadır. Öncelikle orofarinks, ağız boşluğu, hipofarinks ve larenksi etkileyen bu hastalıkta sigara ve alkol bağımlılığı başlıca risk faktörleridir [30]. Belirtiler, tümör yerine bağlı olarak değişir ve boğaz ağrısı, disfaji, odinofaji ve ses kısıklığı içerebilmektedir. Hastalar genellikle muayene sırasında tanımlanabilir birincil bölge ve el ile hissedilebilir boyun kütlesi bulmaktadırlar. Tedavinin karmaşıklığı ve kemoterapi, radyasyon terapisi ve cerrahiden kaynaklanan akut ve uzun vadeli komplikasyonlar göz önüne alındığında, bu hastaların tedavisinde multidisipliner bir yaklaşım önemlidir. Uygun klinik ve radyografik evreleme, doğru tedavi planlaması çok önemlidir.

Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomu, klinik, patolojik, fenotipik ve biyolojik heterojenite ile karakterize kompleks bir hastalıktır [31]-[33]. Bu kanserin gelişimi ve ilerlemesinin, skuamöz epiteldeki hücreler ve moleküler yollarının kademeli olarak değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [34]-[37].

Baş ve boyun kanserlerinin %90'ını dilin arasında boğazda yer alan, larinks (ses tellerinin bulunduğu gırtlak) bölgesinde oluşan tümörler oluşturmaktadır. Larinks kanseri, akciğer kanserinden sonra en sık görülen solunum sistemi kanseridir [3].

### 2.1.2 Nanoteknoloji ve larinks kanseri

Nano ölçekteki partiküller “yüksek geçirgenlik” ve “kalış süresi” olarak adlandırılan etkileri sayesinde tümör dokusu hücreleri tarafından içlerine daha kolay alınabilmektedir. Tümör dokularındaki düzensiz vaskülerizasyon ve hücrel deformasyonlar nanopartiküllerin bu avantajlarını arttırmaktadır. Amaca uygun dizayn edilmiş nanopartiküller herhangi bir aktif hedefleyici ajan kullanmadan “pasif hedefleme” olarak adlandırılan etki ile tümör doku hücrelerinde biriktirilebilmektedir.

In vivo uygulamalarda ilaç taşıyıcı sistemlerin etkin bir profil gösterebilmesi için Retikoendoteryer (RES) sisteminden kaçışlarının sağlanması gerekmektedir. Bu sistem vücuda yabancı giren moleküllerin hızlıca mononükleer fagosit sistemi ile sistemik dolaşımdan elimine edilmesine sebep olmaktadır. Bu eliminasyonu engellemek için küçük partikül boyutunun, doğal malzemeli bileşenlerin ve daha da önemlisi yüzeylerin hidrofilik özelliğın sağlanması gerekmektedir. Bu sayede plazmada opsonizasyonu engellemek ve mononükleer fagosit sistemden kaçış sağlanabilmektedir. RES organlarına hedeflendirme etkin madde orada lokalize olduğu için avantajlıdır, ancak vücuttan atıldığından diğer organlara ulaşamadığı için dezavantajlıdır.

Nanopartikül yüzeylerinin modifikasyonu hedefli tedavinin sağlanması ve toksisitenin azaltılması için aktif hedeflendirme stratejileri daha da önem kazanmaktadır. Aktif hedefleme stratejileri kanser hücreleri üzerindeki antijenlerin sağlıklı hücreler üzerindeki antijenlerden farklı olması sayesinde işlevselleştirilebilmektedir. Onkoloji tedavisinde antikanser ilaçlarının karşılaştığı diğer bir sınırlayıcı etken p-glikoprotein kaynaklı hücrel akış sistemi ile ilişkilendirilen çoklu ilaç direncidir. Bu glikoprotein hücre membranında bulunan ve hücre içi gereksiz molekülleri hücreden dışarı atan bir pompa gibi görev üstlenmektedir. Battaglia ve Gallarate'in 2012 yılında yaptıkları çalışmada katı lipid nanopartiküller sentezlemiş ve pompa görevinin bu sınırlayıcı faktörünü elimine etmeyi başarmışlardır [38]. Graud ve arkadaşlarının 2012'de yaptıkları diğer bir

çalışmada ise lipid yapıdaki nanopartiküllerin yüzey modifikasyonunu yaparak aktif hedefleme stratejisi ile seçici bir hedeflemeyi başarmışlardır [39].

Nanoteknoloji, moleküler ve biyolojik görüntüleme yeteneğine sahip, tümörlerin seçici terapisi yapabilen ve nispeten düşük toksiklik kapasitesine sahip hassas ve spesifik anatomik sistemleri sağlamak için oldukça başarılı sonuçları doğurmuştur. Nanoyapıların fiziksel özellikleri, belli hedeflere ulaşılabilirliği ve mevcut standartlara kıyasla belirgin bir iyileşme sağlayabileceği imkanları son yıllarda yapılan çalışmalarla etkin bir şekilde gösterilmektedir.

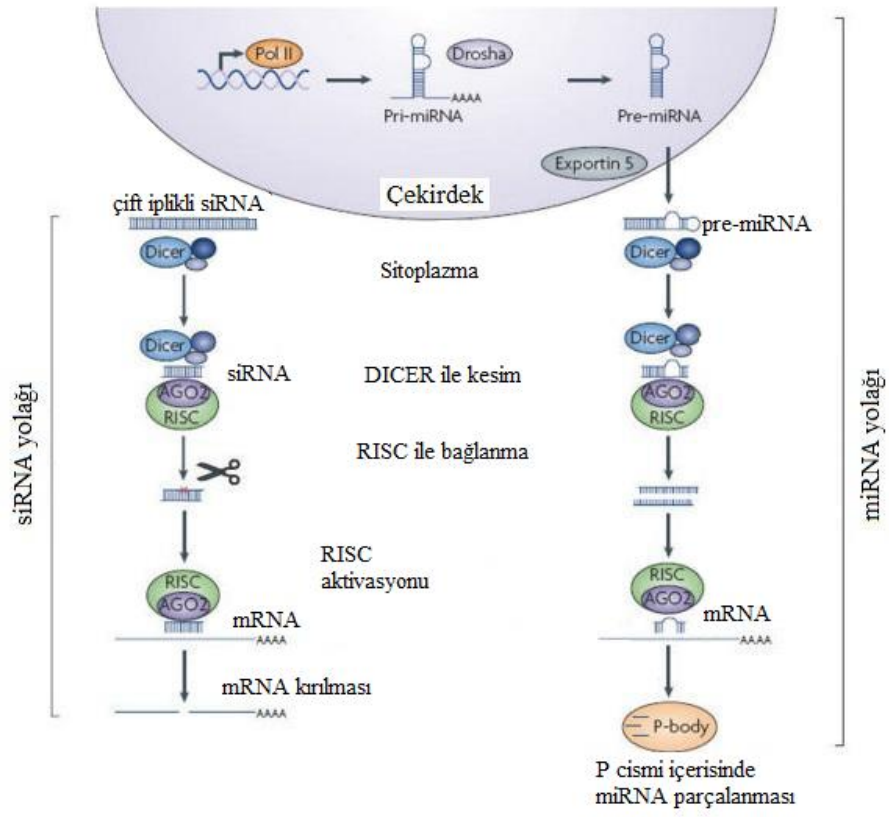
Baş-boyun kanserli hastalar için 5 yıl boyunca fiziki muayene ve rutin görüntüleme ile evreleme değerlendirmeleri, invaziv tedaviler ve tedavi sonrası izleme gerekmektedir. Baş ve boyun kanseri tanısı ve takibi için görüntüleme yöntemlerinin başlıca dayanağı MRI, BT, ultrasonografi ve pozitron emisyon tomografisi (PET) 'dir. Bu teknikler sınırlı çözünürlüğe sahiptir ve mikroskopik veya moleküler değişiklikleri tespit edememektedirler. Ayrıca, bulguların yorumlanması, zor anatomi, ödem veya enflamasyon, önceki tedaviden yaralanma ve hasta hareketi veya diş implantları nedeniyle detay kaybıyla karmaşık olabilmektedir. Üstelik, küçük yüzey lezyonlarının saptanması için görüntüleme teknikleri oldukça zayıftır. Kesin tanı hala biyopsi veya iğne aspirasyonu gerektirmektedir.

Cerrahi sınırlardaki tümörün ameliyattan önce teşhisi zor olabilmektedir. Evreleme, tarama ve intraoperatif tanı için duyarlı ve spesifik noninvaziv moleküler testlerin geliştirilmesi hasta bakımını önemli ölçüde geliştirebilecektir. Şu anda baş ve boyun kanseri için mevcut terapiler önemli sınırlamalara maruz kalmaktadır. Baş ve boyun bölgesinde, cerrahi rezeksiyon, karotid arter, göz ve beyin gibi bitişik önemli yapı bulunmaktadır. Temizlenemeyen artık tümör, hayati yapıların yakınında bırakılabilme ihtimali veya cerrahi sınırın ötesine yayılma ihtimali hastalığın iyileştirilmesi için adjuvan tedavilerini gerektirmektedir. Radyoterapi ileri tümörler için yüksek bir başarısızlık oranına sahiptir ve toksisite, tedavide verilebilecek dozu sınırlamaktadır. Baş-boyun kanserinde kemoterapi, radyasyon ile kombinasyon halinde destekleyici bir rol ile sınırlıdır. Nanoteknoloji, moleküler tanı problemleri, fototermal ve manyeto-termal sondalar, ilaç ve gen teslim vektörleri, radyasyon arttırıcılar gibi yeni tedavi edici cihazların potansiyelini sunarak klinisyenler için yeni bir çözüm sağlamaktadır [40].

## 2.2 Gen Susturma Stratejileri

RNAi mekanizması ökaryot sistemlerin sitoplazmasında gerçekleşen bir olaydır. Bu mekanizmayı sistemsel hale getirmekte görevli 2 farklı efektör molekül vardır. Bu moleküllerden ilki; çift zincirli RNA (dsRNA) molekülü olan siRNA (small interfering RNA) ikincisi ise yine çift zincirli RNA (dsRNA) molekülü olan miRNA (mikro RNA)'dır. 20 ila 23 oligonükleik asit zincirine sahip bu küçük RNA molekülleri herhangi bir protein kodlama özelliği ihtiva etmezler [41]-[42]. dsRNA'nın stoplazma içerisinde Dicer enzimi ile parçalara ayrılması ile siRNA oluşumu gerçekleşir [43]. miRNA ise çekirdekte primer olarak bulunan yapısının Drosha enzimi ile saç tokası modeli yapısına, yani öncül miRNA'ya dönüştürülür. Öncül miRNA'nın sitoplazmaya iletilmesi ile stoplazmada bulunan Dicer enzimi öncül miRNA'nın saç tokası yapısını çözerek zincir halindeki miRNA'ya dönüştürülür [44]. Gen susturma mekanizması, siRNA ve miRNA'nın RISC (RNA-induced silencing complex) kompleksine girerek tamamlayıcı özellikteki zincirin hedef mRNA ya yönlendirilmesi ile gerçekleşmektedir [45],[46].

siRNA'lar hedef mRNA ile tamamen eşleşme gösterirken miRNA'lar kısmen eşleşme gösterirler [47]. Eşleşmenin sağlanmasından sonra hedef mRNA kesilerek parçalanır ve protein sentezi bloke edilmiş olur. siRNA'lar doğrudan mRNA'yı parçalayarak gen susturulması işlevini yerine getirirken miRNA'lar çoğunlukla mRNA degradasyonuna sebep olmadan translasyonel baskılama yaparlar [47].



Şekil 2-1 miRNA ve siRNA yolları [48]

RNA girişimlerinin indüklenebilme çalışmaları, 1995 yılında sense RNA'ların antisense RNA'lar kadar etkili olmasının kanıtlanmısının [49] ardından Fire ve Melo'nun 1998'de *Caenorhabditis elegans*'ın çift sarmallı RNAsını (dsRNA) antisense mekanizması ile susturmaları ile farklı bir boyut kazanmaya başlamıştır [50]. Daha ileri araştırmalar, benzer dsRNA tetiklemeli mekanizmaların, bitkiler [51], *Drosophila* [52] ve memeli hücreleri [53],[54] gibi birçok başka türde de var olduğunu doğrulamıştır. Geçtiğimiz on yılda, farklı türlerdeki birçok küçük RNA tipine ve RNA susturma yollarının anahtar protein faktörlerinin işlevlerine ilişkin temel bir anlayış getiren küçük interfere edici RNA'lar (siRNA) üzerine araştırmalar hız kazanmıştır. RNAi teknolojisi, gen fonksiyonel çalışması için rutin bir laboratuvar araştırma aracı haline gelerek kanserler ve farklı viral enfeksiyonların tedavisi için devrim niteliğinde bir tedavi sınıfı haline gelmiştir.

### 2.2.1 siRNA'nın sistemik taşınımındaki Zorluklar ve Engeller

Terapötik bir strateji olarak RNAi, küçük moleküllü ilaçlara kıyasla pek çok avantaj sunar, zira hemen hemen tüm genler siRNA moleküllerinin hedef almasına duyarlıdır. Bununla birlikte, bu avantaj in vivo çalışmalarda dokulara oligonükleotitlerin güvenli ve etkin bir şekilde verilmesinin getirdiği güçlükleri de beraberinde getirmektedir. Bu zorlukların üstünde, siRNA'nın hedef belirleme özgüllüğü ve stabilitesi bulunmaktadır. Hedefsiz genlerin hedef dışı gen susturmasına, dolayısıyla çalışmada elde edilen verilerin yorumlanmasında ve potansiyel toksisitede sorunlara sebep olabilmektedir. Bu nedenle siRNA'ların tasarımı ve seçimi dikkatli yapılmalıdır. Buna ek olarak, in vivo siRNA uygulamalarını kısıtlayan faktörlerin başında stabilitenin sağlanması problemi gelmektedir.

Çıplak siRNA'lar, hücre dışı ortamda hızlı bozulma ile karşı karşıyadır ve etkili biçimde hücrelerle etkileşememektedir. RNA omurgası, hidrojen atomu yerine pentoz halkasının 2' konumunda bir hidroksil grubuna sahip riboz içerir, bu da RNA'yı , nükleik asitlerin fosfodiester omurgası boyunca parçalanarak serum nükleazları tarafından hidrolize duyarlı hale getirmektedir [55]. Bu sebepten ötürü dolaşıma sunulan siRNA'yı serumda bulunan bozucu mekanizmalardan koruyucu taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Ayrıca sistemik olarak insan vücuduna verilen siRNA anatomik ve fizyolojik savunma bariyerleri tarafından engellenmektedir ve dolayısıyla siRNA'nın hedef bölgeye ulaşması oldukça zorlaşmaktadır.

Bu engellerden ilki; böbrek, karaciğer, dalak, akciğer ve kemik iliğinde bulunan retiküloendotelyal sistemdir (RES). Birçok taşıyıcı sistem için hem renal hem de RES sisteminden kaçmak için optimum olduğu boyut 20 nm ile 100 nm arasındadır. Tümörlü dokudaki vasküleritenin kılcal gözenek boyutunun 100 nm ile 800 nm arasında olması sızdıran bir yapıyı oluşturmakla birlikte lenfatik drenajın olmayışı da bazı avantajları da beraberinde getirmektedir. Bu avantaj optimum boyuttaki taşıyıcıların pasif hedefleme ile tümörlü dokuya ulaşmasının sağlanmasıdır. [56],[57]. İkinci engel ise, endotelyal astar ve hücre dışı matris bariyeridir. Bu engeli aşarak başarılı bir şekilde taşınması için, siRNA ve taşıyıcılarının

ekstravazasyona hazır olması beklenmekte ve hastalıklı hücrelere ulaşmak için kompleks hücre dışı matris boyunca sorunsuz hareket edebilmesi gerekmektedir. Yüzey modifikasyonları ile taşıyıcının dolaşımında uzun süre taşınım sağlaması beklenmektedir [58],[59]. Dokuların çoğunu astarlayan normal endotel tabakası malzemelerin yaklaşık 45 angstrom çapındaki bol gözeneklere ve yaklaşık 250 angstromluk nispeten az gözeneklerine nüfuz etmesini sağlamaktadır. Bu küçük gözenek sistemi, 4 veya 5 nanometre'den daha büyük maddelerin geçirgenliğini sınırlamaktadır [60],[61]. Bununla birlikte, geniş gözenekli endotele sahip bazı belirli tümör tiplerine siRNA'yı hedefleyebilmek için nanotaşıyıcılar bir fırsat oluşturmaktadır.

Üçüncü engel, ise hücre içi etkilerdir. Hücreye başarılı bir şekilde hedeflenen siRNA'nın endozomdan serbest bırakılma süresi de önemlidir çünkü endozom içerisinde kalan siRNA kaçınılmaz bir şekilde bozunacaktır. Bu nedenle taşıyıcı sistemlerin endozom yapısından kısa süreli ve kolaylıkla serbest kalabileceği bir yapı göstermesi gerekmektedir [62]-[64].

### **2.2.2 siRNA terapötikleri için Nanopartiküller**

Nanopartiküler sistemler, tıbbın ileri tanı ve tedavi uygulamaları için alternatif bir materyal olarak son yıllarda ortaya çıkmıştır. Moleküler tıp ile karşılaştırıldığında, nanopartiküller bir önceki bölümde özetlenen çeşitli zorlukların ve engellerin üstesinden gelinmesinde birçok avantaj göstermektedir. Özellikle de terapötik maddelerin biyoyararlanımı ve biyolojik dağılımlarında önemli etkiler sağlamaktadır. Nanopartiküllerin ilk dikkat çekici özelliği, retikülo-endotel sistemlerinin (RES) fagositleri tarafından enzimatik bozunmayı ve sekestrasyonun azaltılmasıyla in vivo çalışmalarda üstünlük sağlamasıdır [65]. Bu üstünlükleri biyolojik çevrede temas halinde immünokimyasal olarak inert olmasıyla sağlanabilmektedir.

Aynı zamanda nanopartiküllerin boyut avantajına sahip olması, bozulmuş vaskülerizasyona sahip hastalıklı dokulardaki yüksek geçirgenlik ve birikme etkisi ile bölgelerde etkinliğe katkıda bulunmasını arttırmaktadır [64]. Uygulama alanlarına göre nanopartiküllerin boyut, şekil, yüzey yükü, yoğunluk, kompozisyon ve yüzey kimyası gibi çeşitli diğer özellikleri bir çok araştırma konusu olmuştur

[66]. Araştırma verileri incelendiğinde tüm bu morfolojik, ve kimyasal özellikler arasında ilginç korelasyonlar ortaya çıkarmıştır. Araştırma, nanopartiküllerin tasarım ve sentezini optimum koşullarda kontrol edilebilir oluşumlarına odaklanılmıştır [67]. Kanseri alanında yapılan çalışmalar da siRNA'lerin amaçla uygun partiküllerle paketlenerek hedef dokuya ulaştırılması yönünde oluşumları beraberinde getirmiştir [68]-[73]. Bu çalışmalarda amaç siRNA moleküllerinin nanopartiküllerle istikrarlı bir şekilde birleşmesi ve bunların dolaşımda tutulmasını sağlamak olmuştur. siRNA'ların terapotik ajan olarak dizayn edilen çalışmalar arasında kolesterol ve uzun zincirli yağ asitleri gibi diğer biyouyumlu moleküllerle etkileştirilmesi de görülmektedir [74],[75]. Yapılan diğer çalışmalarda siRNA nanopartiküllere enkapsüle edilmekte ya da kovalent olmayan etkileşimler ile bağlanması sağlanmıştır. siRNA taşıma sistemlerinde bugüne kadar yapılan çalışmalarda halen bir çok aşamadaki zorlu engellerin aşılması çalışmaları halen devam etmekte olup oluşturulan komplekslerin in vivo toksisite ve stabilitesi hakkında da veriler alınmaya devam edilmektedir [76]-[78]. Farklı nanopartiküller sistemler bileşimine, fiziksel ve kimyasal özelliklerine dayanan çeşitli avantajlar ve dezavantajlar sunmaktadır. Oligonükleotidler ve DNA iletimi için nispeten başarılı birçok teknoloji, siRNA taşınımında aynı etkiyi göstermemektedir. Bu, siRNA'ların diğer moleküllere göre daha zorlu engellerin de aşılması zorunluluğunu doğurmaktadır. Bunun en güzel örneği transfeksiyon için uyarlanmış ve literatürde yaygın şekilde kullanılan katyonik lipid-gen kompleksleridir fakat bu sistemle bile hücre içi yollar sırasında siRNA salımı büyük bir engel oluşturmaktadır.

### **2.3 Protein Tabanlı Nanopartiküller**

Protein tabanlı nanopartiküller biyobozunurlukları ve vücuttan kolay elimine olabilmeleri nedeniyle ilaç ve gen taşıyıcı sistemler için etkin malzemelerdir. İlaç taşıyıcı sistemlerde, nontoksik oluşları, kararlılıkları ve fonksiyonel gruplar ihtiva etmeleri nedeniyle protein tabanlı nanopartiküller şimdiye kadar sıklıkla sığır serum albümin, jelatin ve insan serum albümininden yapılmıştır [79],[80]

### 2.3.1 Albumin

Plazmada en fazla bulunan protein olan insan serum albumini (HSA), plazma onkotik basıncının ana belirleyicisini ve vücut bölmeleri arasındaki sıvı dağılımının ana modülatörünü temsil eden monomerik çok alanlı makromoleküldür. HSA olağanüstü bir ligand bağlama kapasitesi sergiler ve birçok endojen ve eksojen bileşik için bir depo ve taşıyıcı sağlamaktadır. Nitekim HSA, yağ asitleri için ana taşıyıcıyı temsil eder, birçok ilacın farmakokinetiğini etkiler, bazı ligandların metabolik modifikasyonunu sağlar, potansiyel toksinler zararsız hale getirerek insan plazmasının antioksidan kapasitesinin çoğunu oluşturmaktadır [81].

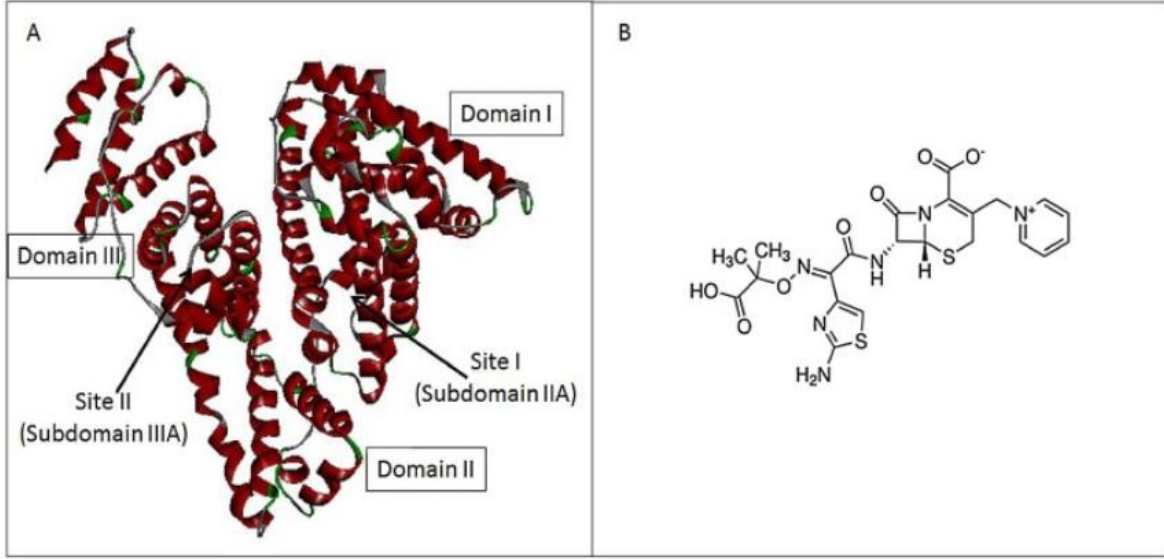
HSA, kanser, romatoid artrit, iskemi, postmenopausal obezite, ciddi akut graft-versus-host hastalığı ve glisemik kontrolün izlenmesi gereken hastalıklar gibi birçok hastalığın değerli bir biyolojik işaretidir. Ayrıca HSA, hipovolemi, şok, yanıklar, cerrahi kan kaybı, travma, kanama, kardiyopulmoner baypas, akut solunum sıkıntısı sendromu, hemodiyaliz, akut karaciğer yetmezliği, kronik karaciğer hastalığı, beslenme desteği, resüsitasyon gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde klinik olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Son zamanlarda, implante edilebilir biyomalzemeler başta olmak üzere cerrahi yapıştırıcılar, dolgu macunları, biyokromatografi çalışmaları, ligand yakalama ve füzyon proteinleri dahil bir çok biyoteknolojik uygulamalardaki başarılı sonuçlar HSA'yı etkin bir malzeme olarak karşımıza çıkarmaktadır.

Biyopolimer albümin, seyreltik tuz solüsyonlarında çözünürlük ve nispeten düşük sıcaklıkta çökme ile karakterizedir, 55-65 °C'de ısıtma çoğu proteini denatürlemek için yeterlidir [82]. Kristalize albüminin kimyasal formülü ise  $H_{1134}N_{218}S_5O_{248}$ 'dir. Albuminler ticari olarak, yumurta beyazı (ovalbümin), sığır serumu (sığır serum alüminyum, BSA) ve insan serumundan (insan serum albümini, HSA) elde edilir [83]. Soya fasulyesinde, sütte ve tahıllarda da önemli miktarda mevcuttur.

Albumin (69 kDa), insan plazmasının ana proteinlerinden biridir (3,4 - 4,7 g / dL) ve toplam plazma proteinlerinin yaklaşık% 60'ını oluşturur [84]. Karaciğer, günde yaklaşık 12 g albümin üretir ki bu miktar toplam karaciğer sentezinin yaklaşık %

25'ini temsil etmektedir ve bu miktarın % 40'ı plazmada,% 60'ı ise hücre dışı boşlukta bulunur [85].



Şekil 2-2 Albuminin kimyasal yapısı ve domainleri

### 2.3.1.1 Albumin Tabanlı Uygulamalar

İnsan kanının bir bileşeni olan albumin, birçok formülasyonda klinik bir eksipyan olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Abraxane örneğinde olduğu gibi klinik nanotıp alanındaki başarılı uygulamaları ile kanıtlandığı üzere albümin, yeni nanotıp geliştirilmesi için en çekici malzemelerden biri olmuştur [86]. Albumin aşağıdaki sıralanacak sebeplerden ötürü birçok medikal uygulamada başarıyla kullanılabilecek potansiyele sahiptir:

- 1) Albumin, insan kanının bir bileşenidir. Endojen bir protein olarak immünojeniklik göstermemekle birlikte albümin tabanlı malzemeler için biyoyumluluğu garanti etmektedir [87].
- 2) İnsan kanındaki albüminin yarılanma ömrü yaklaşık 19 gündür. Serbest ilaçlardan farklı olarak albumin taşıyıcılar uzun bir yarılanma ömrü sunarak dolaşımda kalım süresini de olumlu etkilemektedir [88].

3) Albumin, katı nanoprotein için mükemmel bir liyoprotektandır ve kurutulmuş nanoparçacıkların enjekte edilebilir çözeltilerde kolaylıkla yeniden dispersiyonunu sağlamaktadır [89].

Bu avantajlar göz önünde bulundurulduğunda, klinik kullanımını kısıtlayan ilaç salınımı ve çökelti oluşumu problemlerinin üstesinden gelineceği için rafa dayanıklı taşıyıcı sistemlerin gelişmesini destekleyeceği düşünülmektedir.

Genellikle nanopartikülerin oluşturulmasında kullanılan iki tür albumin vardır: insan serum albümin (HSA) ve sığır serum albümin (BSA). Her iki albümin tipi de serum albümin proteini (sırasıyla insan serumu ve inek serumundan) olup suda yüksek çözünürlük, kanda uzun yarılanma ömrü, benzer moleküler ağırlık (65-70 kDa), benzer sayı amino asit dizilimlerine (HSA için 585 amino asit ve BSA için 583 amino asit) sahiplerdir [90].

Albumin tabanlı biyomedikal uygulamalar preparat teknolojileri, hibrid albumin malzemeleri, yarılanma ömrü uzatma, biyokonjugat kimyası, terapötik uygulamalar da dahil olmak üzere bir çok farklı yönlerden araştırma konusu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Albümin, gen transfeksiyonu veya gen terapisi için oligonükleotitler sunmak için kullanılabilir [91]. Geleneksel polietilenimin-DNA polipekslerindeki albumin'lerin basitçe eklenmesi, transfeksiyon verimliliğini önemli ölçüde etkiler [92]. Kanseri hedefli arginineglycine-aspartat ve transdüksiyon sekansının hücreye nüfuz etmiş HIV-1 transaktivatörü ile ikili peptid modifikasyonu, gen transfeksiyon verimliliğini geliştirmiştir [93]. Altın nanorodlarla yüklü albumin nanopartiküller ve siRNA, sinerjik fototermal / gen terapilerinde etkin bir şekilde kullanılabileceği literatürde yer almaktadır [94].

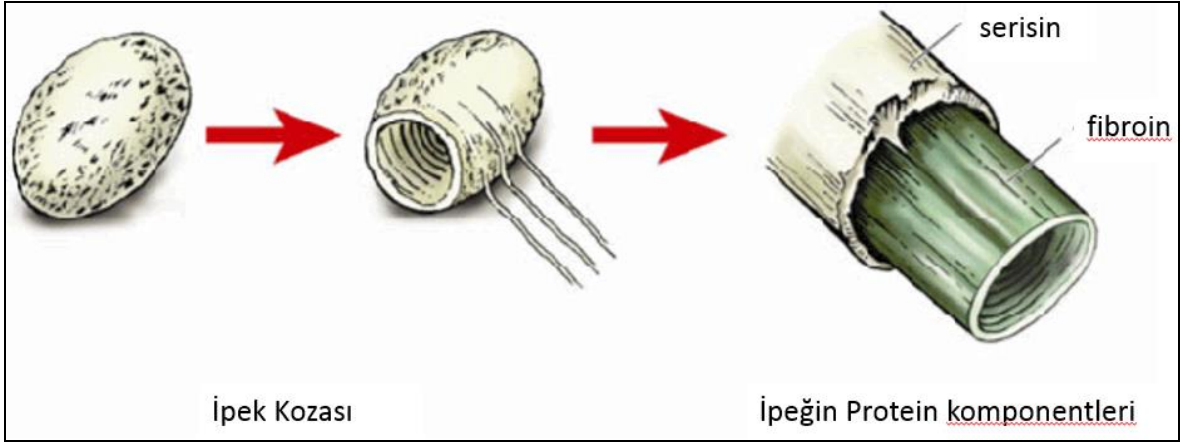
### **2.3.2 İpek Proteinleri**

Biyomedikal mühendisliği ve sağlık alanındaki temel ve uygulamalı çalışmalar, başarılı tedavilerin geliştirilmesine yönelik talepleri karşılamak için çok disiplinli alanları entegre etmektedir. Mühendislik, malzeme tasarımı, malzeme sentezi,

biyokimyasal ve biyofiziksel karakterizasyon gibi çeşitli alanlar, biyolojik fonksiyonu korumak, iyileştirmek, onarmak veya değiştirmek için bir araya gelir. Bu disiplinler arası ilerlemenin anahtarlarından biri, biyolojik sistemler ile etkileşime girebilecek fonksiyonel materyallerin geliştirilmesidir. Bu tür malzemeler direk olarak doğadan elde edilebileceği gibi, sentetik polimerler, metaller, alaşımlar ve seramikler şeklinde laboratuarda sentezlenebilmektedir [95]. Olağanüstü potansiyele ve çeşitliliğe sahip olmalarına rağmen sentetik polimerler, uygulamaları biyouyumluluk, biyolojik bozunabilirlik ve biyolojik-absorpsiyon gibi zorluklar sebebiyle sınırlı kalmıştır. Bunun tersine doğal malzemeler, biyomedikal mühendisliğinde bu gibi uygulamalar için uygun alternatifler olarak ortaya çıkmıştır [96],[97].

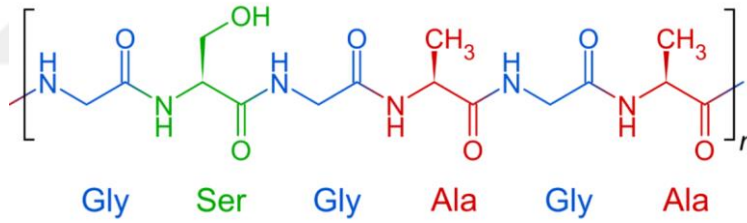
Doğal olarak elde edilen materyaller arasında benzersiz bir yapısal özellik gösteren ipek proteinleri biyomedikal uygulamalarda öne çıkmaktadır. Lifli bir protein ailesinin üyesi olan ipekler etkileyici mekanik kuvvete sahip olması sebebiyle biyomalzemeler arasında özellikle yara tedavilerindeki dikiş olarak kullanımı ile geniş kullanım alanı bulmuştur [98]. Yüksek mekanik kuvvet özelliğinin yanı sıra mükemmel biyouyumluluğu, mevcut olmayan veya minimal immünojenitesi [99],[100] sınırlı bakteri yapışması [101],[102] ve kontrol edilebilir biyobozunabilirliği [103] sayesinde çok çeşitli biyomedikal uygulamalarda uygun bir profil göstermektedir.

İpek, Arachnida sınıfı üyelerinden ve Lepidoptera cinsinin pek çok türünün özelleşmiş epitel hücrelerinin salgı ürünüdür [104]. Yapısında iki farklı proteini ihtiva etmektedir. Bunlardan birincisi fibröz yapıdaki fibroin proteini, diğeri ise serisin proteindir. Serisin proteini yapışkan yapıda olup fibroin proteinlerini kaplayan bir formda bulunur. Serisin proteini fibroin proteinin mekanik özelliğine göre daha kırılgan ve daha az elastikiyete sahiptir [105].

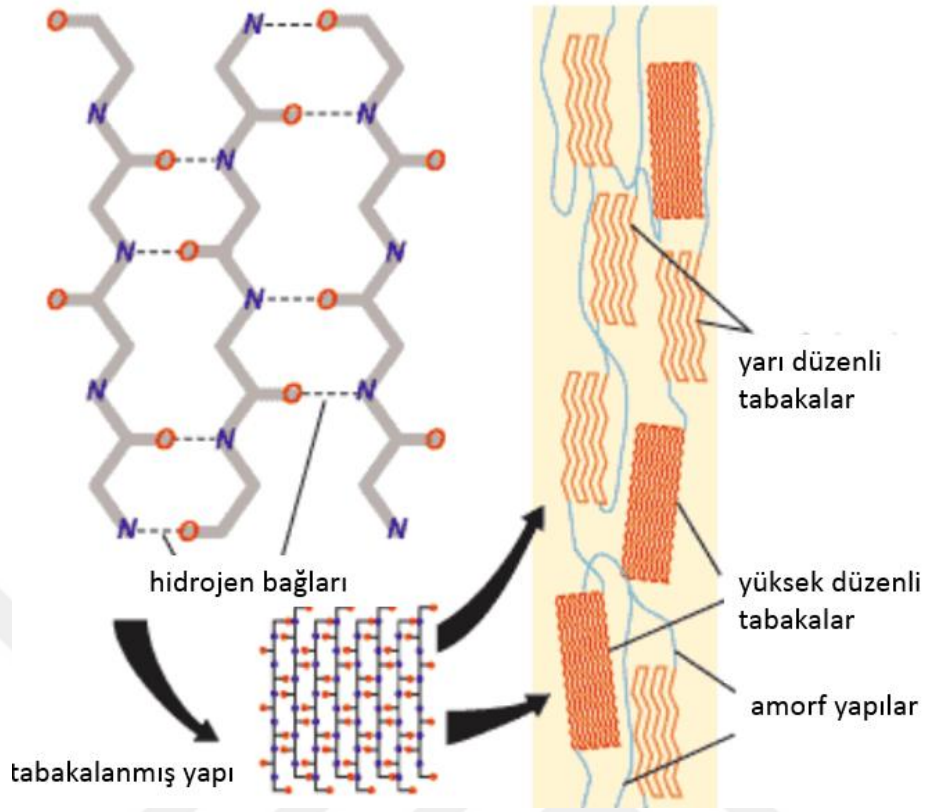


Şekil 2-3 İpek Proteinleri fiziksel yapısı

İpek fibroin proteini kimyasal olarak Alanin, Glisin, Serin aminoasitlerinin tekrar eden sekanslarından oluşan bir birincil yapıya sahiptir. Kısa zincirindeki aminoasitlerin kuvvetli hidrofobik etkileşimleri ile beta tabakalı yapıda bulunmaktadır. Beta tabakalı yapısı zincirlerin antiparalel şekilde dizilmesine ve böylelikle gergin bir yığın olarak durmasını sağlamaktadır [106].



Şekil 2-4 İpek Fibroinin Kimyasal Formülü



Şekil 2-5 İpek Fibroin Yapısı

İpekböcekleri, solucanlar için gıda kaynaklarına bağlı olarak sınıflandırılırlar. *Bombyx mori* (*B. mori*), Bombycidae ailesinin en ünlü üyesi olup oluşturduğu ipek biyomedikal uygulamalarda sık kullanılan bir proteindir. B. Mori ipek fibroinlerinin birincil yapısı 4 kısımda incelenebilir. Tekrar ede sekansları içeren ilk üç bölüm kristal yapısını oluşturmaktadır. Birinci bölüm en yüksek kristaliniteye sahip düzenli tabakalardan oluşur ki bu yapı kristal yapıların %94'ünü oluşturmaktadır. İkinci bölüm ise hidrofobik etkileşimlerin fazla olduğu yarı kristal yapıyı oluşturmaktadır. Dördüncü bölüm yapıya negatiflik, polarlık, hidrofobiklik ve aromatik özellik kazandıran amorf bölgedir [107]. Hidroksil, karboksil ve amino gruplarına sahip polar yan zincirleri olan bu yapı biyolojik olarak parçalanabilir bir malzeme meydana getirmek üzere kolay çapraz bağlanma, kopolimerizasyonu sağlama ve diğer polimerler ile karıştırma özelliklerine sahiptir [108]-[110]. Serisin ise hidrofilik özelliğe sahip suda çözünebilir bir protein olup yapışkan özelliktedir. Yüksek alkali ortamda çözülerek fibroin yapısından kolaylıkla ayrıştırılabilmektedir.

### 2.3.2.1 İpek Proteinlerinin Uygulama Alanları

İpek proteinlerinin sahip oldukları özelliklerinden dolayı biyomedikal uygulamalar dahil bir çok alanda kullanım olanağı bulunmaktadır. Son yıllarda immobilizasyon ve ilaç taşıma/salım kabiliyetlerinden dolayı ipek fibroin tabanlı nanopartiküller ile uygulamalara literatürde rastlanmaktadır. İpek proteinleri yıllardır dikişler gibi biyomedikal alanda başarıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda işleme ve biyouyumluluk gibi özelliklerinin yanı sıra mükemmel mekanik özellikleri ile hücre kültürü ve doku mühendisliği için biyomalzeme olarak araştırılan FDA onayı almış bir malzemedir [98].

Bugüne kadar ilaç taşıyıcı sistemler olarak çalışılan ipek protein nanopartiküller başarılı sonuçlar vermiştir. Subia ve Kundu'nun (2013) yaptıkları çalışmada metotreksat yüklü albümin-fibroin karışım nanopartikülleri yaklaşık 200 nm boyutunda sentezlemiş ve in vitro çalışmalarda başarılı sonuçlar elde etmişlerdir [111]. İpek proteinlerinin albümin ile benzer kimyasal yapılar sahip oluşları karboksil grupları arasında oluşacak sinerjik etkileşim sayesinde iyi bir karışım oluşturabilecekleri yapılan çalışmada gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, doksorubisin yüklü ipek fibroin nanopartiküllerinin nanotip uygulamalarında lisosomotropik antikanser etki gösterdiğini ve çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek için bu nanopartiküllerin etkili olduğunu belirlemişlerdir [112]. Yapılan son çalışmalarda ipek serisin proteininin immunojenik olarak inert oluşu in vitro ve in vivo deneylerle gösterilmiştir [113]-[115]. Bir diğer çalışmada ise serisin nanopartikül fabrikasyonu ve biyofiziksel karakterizasyonu sunulmuş ve in vitro hücre alımı, sitotoksik deneyleri de gösterilmiştir [110]. Vishal Gupta ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada kurkumin yüklü ipek fibroin nanopartiküllerini yaklaşık 100 nm boyutunda sentezlemiş ve biyobozunur bir sistem olarak göğüs kanseri hücrelerine yüksek etkinlik gösterdiğini sunmuşlardır [116].

Gen taşıyıcı sistemler olarak ipek tabanlı nanopartiküller biyobozunur, biyouyumlu, yüksek transfeksiyon etkisi ve DNAaz enzimlerine karşı dirençliliği nedeniyle non viral gen taşıyıcı sistemlerde son yıllarda tercih edilen cazip malzemeler haline gelmeye başlamıştır [117]. Numata ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları

çalışmada rekombinant ipek proteinleri ile plasmid DNA komplekslerini 150-250 nm arasındaki boyutlarda sentezlemişler ve spesifik tümör hücrelerine hedeflemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, ipek tabanlı nanoyapıların transfeksiyonu arttırdığı ve non viral taşıyıcı olarak avantajlı ve çok amaçlı kullanıma uygun olduğu gösterilmiştir [118].

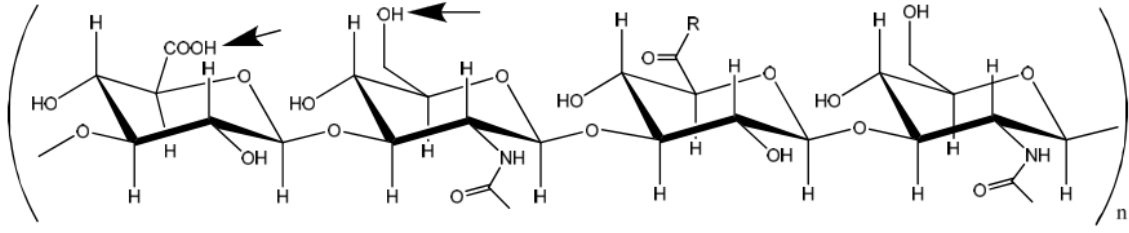
Gen taşıyıcı sistem olarak rekombinan örümcek ipek fibroin protein tabanlı ince film yapıları ve ipek fibroin-DNA nano kompleksleri çalışılan konular arasındadır [117],[118]. Das ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada ise 100-150 nm arasında serisin nanopartikülleri hazırlamışlardır. Yüzey modifiye yöntemleri ile anyonik yükten katyonik hale getirdikleri partiküllerde optimum DNA bağlanmasını sağlayarak partiküllerinin teröpatik DNA taşıyıcı sistem olarak kullanımının başarılı sonuçlarını sunmuşlardır [119].

Shahbazi ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada boyutları 250-450 nm arasında değişen siRNA yüklü ipek fibroin/oligokitosan nanopartiküllerini sentezlemişlerdir. Çalışmalarında, nanopartiküllerdeki fibrion miktarının artmasıyla yükleme verimliliğinin arttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda oligokitsan polimerleri ile kıyaslandığında sığır fetus serumu ve heparin varlığında yüksek stabilite gösterdiğini ve nanopartiküllerin hücresel alım analizlerinde daha verimli olduğunu sunmuşlardır [120].

İpek fibroin partiküllerinin sahip olduğu yüksek kristalizasyonu nedeniyle enkapsüle edilcek maddenin yavaş salımı söz konusudur [121]. Bunu önleyebilmek için ipek fibroin proteinin doğal yada sentetik polimerler ile karışım halinde kullanılmasını daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olup böylelikle daha iyi bir degradasyon sağlandığı vurgulanmıştır [122].

## **2.4 Hyalüronik Asit (Hyalüran-HA)**

Hyalüronik asit tekrar eden  $\beta$ 1,3 N-acetyl glukozamin- $\beta$ , 1,4 glukuronid disakkaritlerinden oluşan ve yüksek moleküler ağırlıklı ( $10^6$ - $10^7$  Da) bir glikosaminoglikan polimeridir.



Şekil 2-6 Hyalüronik Asitin kimyasal yapısı

HA, hücre dışı matrisin ana bileşeni olmak üzere her yerde bulunur ve uygun hücre büyümesi, organların yapısal kararlılığı ve doku organizasyonu için gereklidir. Farmasötik açıdan HA, umut verici bir bileşendir çünkü biyolojik olarak parçalanabilir, biyolojik olarak uyumlu, toksik olmayan, hidrofilik ve non-immünojeniktir [123].

HA başka bileşenler konjuge edilebilir çeşitli kimyasal gruplar içerir. HA'nın yapısı Şeki 6'da gösterilmekte olup, burada olası kimyasal modifikasyon alanları da ok ile gösterilmektedir. Glukuronik asit, N-asetilglukosamin hidroksil ve indirgeyici fosfat üzerindeki karboksilat, ilaçlarla konjugasyon reaksiyonlarında başarıyla kullanılmıştır. Asetil grup N-asetilglukozaminden enzimatik olarak uzaklaştırılabilir ve bu nedenle de ilaç konjugasyonunda potansiyel bir yapı oluşturmaktadır [124]. Kimyasal modifikasyon yöntemleri, HA türevlerini elde etmek için sentetik yollar ve bunların karakterizasyonu hakkında kapsamlı bir incelemeler yapılmıştır [125],[126].

Hiyalüran vitröz yapı, sinoviyal sıvı ve dermis gibi erişkin dokularda hem hidrodinamik özelliklerine hem de diğer hücre dışı matris bileşenleri ile olan etkileşimlerinde yapısal bir rol oynar. Bununla birlikte, hiyalüronan, hücre bölünmesinin ve istilasının yüksek olduğu bölgelerde (embriyonik morfogenez, enflamasyon, yara onarımı ve kanser sırasında) yoğunlaşmıştır. Hiyalüronik asit de bu nedenle tümör oluşumu ile ilgilidir.

İki farklı HA reseptörü (CD44 ve RHAMM) kanser başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkili hücre sinyalleri basamaklarında güçlü bir reseptör olarak rol oynar

[127],[128]. Dahası HA, ICAM-1 (hücre içi adezyon molekülü-1), TLR-4 (toll benzeri reseptör-4), HARE (endositoz için HA reseptörü) ve LYVE-1 (lenfatik damar endositik reseptörü) [129] ile etkileşmektedir .

Hücre adezyon moleküllerine (CAM) ait olan CD44 reseptörü, adezyon, göç, istila ve sağkalım da dahil olmak üzere habis hücre faaliyetlerinde kritik bir rol oynayan yaygın olarak bulunan bir transmembran glikoproteindir. CD44, HA'nın içselleştirilmesine ve metabolizmasına aracılık eder ve normal dokulardaki çeşitli hücre tiplerinde düşük seviyelerde endojen olarak eksprese edilir [130]. Ancak HA'ya bağlanmadan önce aktivasyona ihtiyaç duyar. Hücresel aktivasyon, CD44'ün HA'yı bağlama yeteneğine sahip yüksek afiniteli bir duruma geçmesine neden olabilir. Aktif olmayan, düşük affiniteli durumdan aktif, yüksek afiniteli CD44 durumuna geçiş, antijen reseptörlerinin ligasyonu [131] sülfasyon veya sitokinlerin etkisiyle indüklenebilmektedir [132]. Normal primer hücrelerin aksine, tümör türevi hücreler CD44'ü HA'yı bağlama ve içselleştirme yeteneğine sahip yüksek afiniteli bir durumda eksprese eder. Ayrıca, CD44'ün HA ile 6-8 sakkarit minimum uzunluk birimi ile etkileşime geçtiği bildirilmiştir [133].

İlaçları CD44'e hedefleyerek, ilaçları HA matrisine hedefleyerek veya HA matriks-CD44 etkileşimine müdahale ederek CD44-HA etkileşimine müdahale, kanser tedavisi için son zamanların olası stratejilerinden olmuştur.

## **2.5 Kendiliğinden düzenlenen sistemler**

Doğa, zarif bir şekilde, nanometre ölçeğinde yapı taşlarının hiyerarşik olarak düzenlenmesiyle, kompleks biyolojik yapıların kendi kendine kurulumlarını sağlamaktadır. Buna basit örneklerden bazıları, peptid zincirlerinin proteinlere katlanması, proteinlerin virüs kabuklarına kendi kendine montajı, hücrelerin dokulara spontan montajı ve nükleotidlerin karmaşık bir DNA yapısına dönüştürülmesidir. Moleküler kendiliğinden düzenlenme, moleküllerin spontan montajında küçük ölçekli yapıların tasarımı için potansiyel verimliliği nedeniyle akıllı bir süreçtir [134]-[139]. Esasen, kovalent olmayan etkileşimler, protein / peptitleri kullanarak akıllı materyalleri oluşturmak için kendi kendine kurulmuş

düzenlemelerde ince geçişlere yol açar. Kendiliğinden birleştirilmiş materyalin şeklini, konfigürasyonunu ve özelliklerini belirlemek için monomerik birimlerin mekansal özellikleri veya topolojisi özünde yer alır. Peptidin veya proteinin amino asit sekansına veya yapısına bağlı olarak, çeşitli kendi kendine düzenlenme tipleri üretilir. Düzenlenme tiplerinden bazıları, bunlarla sınırlı olmamak üzere, boru şekilli, halka şeklinde, kafes benzeri, çok yüzlü, kombine veya kompleks yapıları içermektedir [140].

Nano ölçekli yapıların sentezlenmesinde kullanılan iki temel yaklaşım aşağıdan yukarı (bottom up) ve yukarıdan aşağı (top down) stratejileridir. Kendiliğinden düzenlenme mekanizmaları aşağıdan yukarı üretim stratejilerine en güzel örneklerden bir tanesidir. Bu düzenlenme süreci kovalent olmayan ve zayıf etkileşimli bağlar tarafından gerçekleşmektedir. Nano ölçekli yapıların sentezinde ve tasarımında uygulama kolaylığı bakımından kendiliğinden düzenleme mekanizmaları en pratik yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu mekanizmanın bize sunduğu en büyük avantajlardan bir tanesi istenilen boyutta yapıların oluşturulabilmesidir. Bunun için moleküllerin kimyasının, sentez ortamının (pH, desolvasyon ajanları, sıcaklık vb.) ve diğer kinetiklerin değiştirilmesi ile ayarlanabilmektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde birçok peptit yapılarının (siklik, amfifilik, amiloid türevli) kendiliğinden düzenlenme mekanizması sayesinde nano ölçekli yapılara dönüştürülebildiği rapor edilmiştir [141]-[146].

Tez kapsamında kendiliğinden düzenlenebilen en başarılı örneklerden biri olan İnsan Serum Albumini (HSA) ile ipek proteinlerinin karışımları ile nanopartiküller üretilmiştir.

## **2.6 Kazein Kinaz Proteini (CK2)**

Kazein kinaz proteini (CK2) serin ve treonin aminoasitlerinin fosforillenmesinde görev alan bir kinazdır. Organizmaların hepsinde bulunan bu protein, ck2a ve ck2b olmak üzere iki parçadan oluşan tetramerik kompleksler halinde bulunmaktadır. CK2 enzimi canlılık, programlı hücre ölümü, hücre döngüsü, transkripsiyonel kontroller ve bir çok biyolojik fonksiyonda önemli göreve sahiptir [147]. Bu proteinin meme ve kolorektal kanserlerde de arttığı ve baskılanmasının hücrelerin apoptozuna sebep olduğu gösterilmiştir [148].

Larinks kanserinde de arttığı bilinen CK2, 2014 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada small hairpin RNA (shRNA) ile baskılanmış, in vitro koşullarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir [3]. Literatürde plazmidlerle veya farklı nanopartiküllerle taşınan siRNA modelleri denenmiş olmakla birlikte, ipek protein nanopartikülleriyle siRNA taşınımına rastlanamamıştır.

## **2.7 ASH2L**

ASH2L Kromozom 8p11.23 'te yer alır. Biyokimyasal verilere göre ASH2L, bünyesinde farklı domainler içeren metiltransferaz enziminin çekirdek kompleksinde bulunur. Ayrıca birçok ek faktör ile de ilişkili olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir [149]. Son çalışmalar ASH2L'nin farklı proteinlerle kombinasyonu H3K4 metiltransferaz aktivitesini oluşturduğunu göstermektedir. ASH2L nin siRNA kullanılarak baskılanması ile H3K4 trimetilasyonu düşüş göstermektedir [150]. Histon 3 lizin 4 (H3K4) tri-metilasyonu ökaryotlarda promotör bölgelerini belirlemektedir. ASH2L ve H3K4 metilasyonu birlikte onkojenesiste önemli role sahiptir [151].

ASH2L birçok kanser hücre hatlarında fazlasıyla bulunmaktadır. Bir çok kanser hücre hatlarında ve aynı zamanda tümör örneklerinde ASH2L proteinin ekspresyonu artış göstermektedir. Skamöz hücreli karsinomaya bağlı larinks kanserinde, serviks melanoma, pankreatik adenokarsinoma ve akinar ve duktal breast kanseri dahil olmak üzere tümör hücre çekirdeklerinde ASH2L proteinlerin artışı boyamada gözlenen artış ile gösterilmiştir. Hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan ASH2L proteinin baskılanması ile tümör hücresi proliferasyonunu ve dolayısıyla tümörigenezi önlenebileceği düşünülmektedir [152]. Jarvinen ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada ilk defa 8p11-p12 kromozumda bulunan ASH2L geninin laringeal skamöz hücre karsinoma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [153].

## **2.8 Siklin D1**

Kromozom 11q13'te yer alan ve CCND1 geni tarafından kodlanan Siklin D1, hücre siklusunun ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Siklin D1, G1 fazı süresince retinoblastoma proteini (Rb) fosforillemek için, siklin-bağımlı kinazlardan (CDKs)

CDK2, CDK4, CDK5 ve CDK6 ile ilişkide bulunur [154]. Ayrıca siklin D1'in bir takım transkripsiyon faktörlerinin ve histon deasetilazın (HDAC3) aktivitelerini regüle ederek transkripsiyonel düzenleyici olarak da fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir [155]. Birçok kanser çeşidinin, hücre siklusunun düzenlenmesinde ve büyüme faktörü bağımlı hücre içi yollarda meydana gelen hatalardan kaynaklı ortaya çıkması, hücre siklusunun kontrolü ve büyüme faktörü sinyallenmesinde önemli olan Siklin D1'i olası bir onkogen olarak hedef molekül haline getirmiştir. Normal hücrelerde Siklin D1 (CCND1)'in çok fazla üretilmesi, G1 fazı boyunca maksimum düzeyde kalıp tümör baskılayıcı genler (p16, p21 ve p27 gibi) tarafından inhibe edilmesi Siklin D1'in büyüme faktörü sinyalleşmesinde önemli olduğunun kanıtıdır. Aynı şekilde bu düzenlenmedeki bir aksaklık, kanser hücrelerinde büyüme düzenlemesinin eksik olmasından sorumlu olabilir [156].

Geçmiş yıllardaki çalışmalar Siklin D1'in normal dokularda ya hiç ya da çok az bulunduğunu ancak bir çok kanser türünde oldukça fazla eksprese olduğunu göstermiştir. Özellikle baş-boyun (% 18-% 58) ve larinks kanserlerinde Siklin D1'in aşırı ekspresyonunun gözlenmesi ve bu durumun nüks, nadal, metastaz ve ölümle ilişkilendirilmesi ile bu kanser çeşitlerine özgü olarak Siklin D1 prognostik belirteç olarak tanımlanmıştır [157]. Siklin D1'in potansiyel hedef onkogen olarak tanımlanmasından beri, in vitro koşullarda çok sayıda terapötik ajanın Siklin D1 degradasyonunu indüklediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Dolayısıyla kanser hücrelerinde Siklin D1 degradasyonu ve seviyesinin azalması, terapötik müdahale için elverişli bir yol olacaktır. Spesifik genlerin inhibisyonundan sorumlu siRNA mekanizması bu hedef için vazgeçilmezdir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu tez kapsamında siRNA ile gen seviyesinde tedaviye yönelik bir yaklaşım sergilenmiştir. Bu amaçla yürütülen çalışmalar hedef hücreye siRNA gönderebilmek için ipek protein bazlı biyouyumlu taşıyıcı nanopartiküllerin sentezlenmesi, elde edilen nanopartiküllere ligand ve siRNA yüklenmesi ve siRNA yüklü nanopartiküllerin kanser hücreleriyle etkileşiminin *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmesi şeklinde özetlenebilir.

#### 3.1 İpek protein nanopartiküllerinin üretimi ve karakterizasyonu

Bu çalışma kapsamında, öncelikle ipek proteinlerinden olan fibroin üretilmiş ve daha sonra da serisin ve albümin ile farklı kompozisyona sahip ipek protein nanopartikülleri sentezlenmiştir.

##### 3.1.1 İpek protein nanopartiküllerinin üretimi

###### **Fibroin Üretimi**

İlk aşamada İpek fibroini elde edebilmek amacıyla ipek kozaları küçük parçalar halinde kesilmiş ve 0.02 M sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) solüsyonunda 110 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Otoklavdan çıkartılan ve bu sayede serisinin uzaklaştırılan fibroin distile su ile birkaç kez yıkandıktan sonra kurutulmuştur. Kurutulmuş ipek fibroini 9.2 M LiBr ile çözülmüş ve diyaliz membranında 48 saat bekletilmiştir. Tuzlarından diyaliz sayesinde arınan fibroin çözeltisi 9.000 rpm de 15 dk santrifüj edilerek 3 gün +4°C'de bekletilmiş ve fibroin çözeltisi elde edilmiştir.

Çalışmada 3 farklı protein yapısından partiküller ve bu proteinlerin harmanlanması ile oluşturulan nanopartiküller sentezlenmiştir. Nanopartikül sentezi için desolvasyon tekniği kullanılmıştır. Partikül boyutu, yüzey yükü gibi optimizasyon çalışmaları; farklı desolvasyon ajanları, farklı pH'lar, farklı çapraz bağlayıcı yüzdeleri ve farklı çözücü özellikleri ile denenmiştir.

1. Albumin Nanopartikül:

0,04 gr. insan serum albumini 2ml distile suda çözülerek 1M NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik G.A (gluteraldehit) solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.

2. Fibroin Nanopartikül:

0,571 ml fibroin solüsyonu 1,429 ml distile su ile seyreltilir ve 1M NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik G.A solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.

3. Albumin-Fibroin (1:1 w/w) Nanopartikül:

0,02 gr HSA 1ml distile suda çözülür. 0,285 ml fibroin solüsyonu 0,715 ml d.su ile seyreltilir. Bu iki solüsyon karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik G.A solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.

4. Albumin-Fibroin (2:1 w/w) Nanopartikül:

0,027 gr HSA 1ml distile suda çözülür. 0,186 ml fibroin solüsyonu 0,814 ml d.su ile seyreltilir. Bu iki solüsyon karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik G.A solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.

5. Albumin-Fibroin (1:2 w/w) Nanopartikül:

0,013 gr HSA 1ml distile suda çözülür. 0,386 ml fibroin solüsyonu 0,614 ml d.su ile seyreltilir. Bu iki solüsyon karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlaması

yapılır. Daha sonra desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik G.A solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.

6. Serisin Nanopartikül:

0,04 gr serisin 2 ml distile suda çözülür. 1M NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik G.A solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.

7. Albumin-Serisin (1:1 w/w) Nanopartikül:

0,02 gr HSA 1ml distile suda çözülür. 0,02 gr Serisin 1ml distile suda çözülür. Bu iki solüsyon karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik G.A solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.

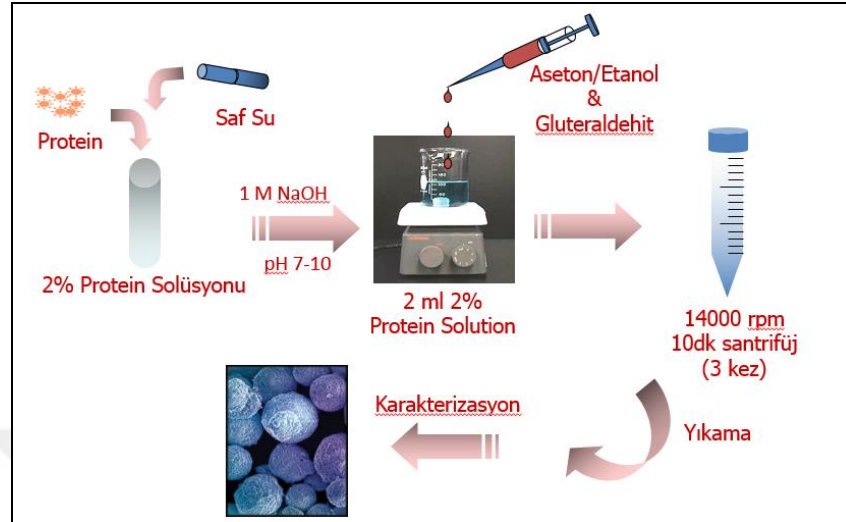
8. Albumin-Serisin (2:1 w/w) Nanopartikül:

0,027 gr HSA 1ml distile suda çözülür. 0,013 gr serisin 1 ml d.suda çözülür. Bu iki solüsyon karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra Desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik G.A solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.

9. Albumin-Serisin (1:2 w/w) Nanopartikül:

0,013 gr HSA 1ml distile suda çözülür. 0,027 gr serisin 1 ml d.suda çözülür. Bu iki solüsyon karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlaması yapılır. Daha sonra desolvasyon ajanı (aseton, etanol gibi) renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılır. (Aseton 5 ml, etanol 8 ml). Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik

G.A solüsyonundan 25 µl damlatılır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılır.



Şekil 3-1 Protein Nanopartiküllerin Sentez Şeması

Hazırlanan partiküllerin optimizasyon çalışmaları için farklı desolvasyon ajanı, farklı pH değeri, farklı çapraz bağlayıcı oranları denenmiştir. Nanopartiküllerin boy-boy dağılımları ve yüzey yükleri Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) ile belirlenmiştir. Hazırlanan nanopartiküller deionize su ile seyreltilecek ve yaklaşık 1 ml örnek çözeltisi polistiren küvet içerisine konulmuş, çözelti içerisinden lazer ışığının geçirilmesi ile partikül boyutu belirlenmiştir. Her bir basamakta çalışılan boyut ve yük analizleri 3'er tekrarlı yapılmıştır.

### 3.1.2 Üretilen ipek protein nanopartiküllerinin malzeme karakterizasyonu

Farklı yapıdaki dokuz nanopartikülün yapısını belirlemek için Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) kullanılmış olup, morfolojik ve yüzey özelliklerini belirlemek için ise Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Zeta Potansiyeli Ölçümü ve Dinamik Işık Saçılması teknikleri kullanılmıştır. Ayrıca partiküllerin termal bozunma davranışının incelenmesinde Diferansiyel Scanning Kalorimetre/Termogravimetrik Analiz (DSC/TGA) tekniği kullanılmıştır.

Yapısal Özellikler: Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) atom çekirdeğinin bazı manyetik özelliklerini kullanılarak yapı içerisindeki

atomların/moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla kullanılır. Hidrojen, Karbon, Azot, fosfat ve potasyum gibi atomların belli bir manyetik alana maruz bırakıldığında oluşturdıkları spin hareketlerinin tespiti ile birlikte birçok yapının da kimyasal ve fiziksel özelliklerinin anlaşılmasında önemli bir yöntemdir. Organik molekül yapılarında genellikle hidrojen ve karbon atom içeriğinin fazla olması dolayısıyla yapının tayininde çok kolaylık sağlamaktadır. Son yıllarda yapısal analiz yöntemleri arasında en yaygın kullanılanı NMR yöntemidir.

Bağ Özellikleri: FTIR analizi moleküllerin IR ışığını (0,78–1000  $\mu\text{m}$  dalga boylu veya 12800–10  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayılı) absorpsiyonuyla titreşim ve dönme enerji seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanan titreşimsel bir spektroskopi tekniği olup bu yöntem ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılabilmektedir.

Morfolojik Özellikler: SEM, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ile görüntü elde edildiği sistemdir. Gerek ayırım gücü (resolution), gerek odak derinliği (depth of focus) gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskobunun kullanım alanını genişletmektedir.

Boyut, Boyut Dağılımı, Polidispersivite İndeksi (PDI), Zeta Potansiyeli: Nanopartiküllerin fiziksel olarak stabil olduklarını anlayabilmek için partikül boyutu ve partiküllerin dağılımına bakılması gerekmektedir. Bu amaçla, ölçüm tekniğinin dinamik ışık saçılması olduğu bir sistem kullanılmıştır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Dinamik Işık Saçılması (DLS) yöntemiyle partiküllerin boyut ve boyut dağılımlarının yanısıra elde edilecek en önemli parametre PDI (Poly dispersity index) değeridir. PDI değeri 0.1- 0.25 arasında olduğunda istenilen dar dağılım elde edilebilir. Zeta potansiyeli, taneler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Zeta potansiyeli ölçümü dağılma mekanizmaları ile ilgili ayrıntılı bilgi verir ve elektrostatik dağılma kontrolünün anahtarıdır. Ayrıca zeta potansiyelinin ölçülmesi, kolloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak vermektedir. Tanelerin polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki

elektrik yükü değil, zeta potansiyel değerleri belirler. Bu amaçla yürütülen çalışmalarda Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi'nde bulunan Malvern Nano ZS Zetasizer cihazı kullanılmıştır.

Termogravimetrik Özellikler: DTG, bir malzemenin sıcaklık artışı ile bünyesinde meydana gelen termal ve gravimetrik değişimleri belirlemekte kullanılır. Malzeme bünyesinde meydana gelen ağırlık değişimleri (su kaybı, organik madde uzaklaşması gibi) termogravimetri (TG), ekzotermik ya da endotermik reaksiyonlar sonucu meydana gelen sıcaklık değişimleri diferansiyel termal analiz (DTA) cihazı ile tespit edilir.

### **3.1.3 Raf Ömrü ve Bozunum Testleri**

Tedavi amaçlı kullanılacak partiküller için en önemli kriterlerden biri olan raf ömrü (stabilite) çalışması fosfat tamponu (pH 7.2) ile turbidimetrik yöntem ile yapılmıştır. Partiküller +4°C'de bekletilerek her hafta turbidimetrik absorbansları 3'er tekrarlı olarak alınmış ve 4 haftalık süreçte bozunum yüzdeleri çıkartılmıştır.

Degradasyon çalışmaları yine turbidimetrik yöntem ile elde edilmiştir. Partiküller vücut sıvısı taklidi için pH 7.2, endozom ve lizozom mikroçevre taklidi için pH 5.5 10µg/ml lizozim enzimi ihtiva eden fosfat tamponunda +37 °C'de bekletilmiş ve turbidimetrik absorbansları alınmıştır. Turbidimetrik absorbans ölçümler bir hafta boyunca belirli periyotlarda 3'er tekrarlı olarak alınmıştır.

## **3.2 İpek protein nanopartiküllerine siRNA yüklenmesi ve Ligand Bağlanması**

Tez kapsamında ASH2L, CK2 ve Siklin D1 genlerinin susturulması için ticari olarak tasarlanmış siRNA'lar hazırlanan nanopartiküllere yüklenmiş ve hedefli bir taşıyıcı özelliğine sahip olabilmesi için Hiyaluronik asit ile modifiye edilerek in vitro ve in vivo çalışmalar sürdürülmüştür.

### 3.2.1 İpek protein nanopartiküllerine siRNA yüklenmesi

Bu tezde ASH2L, CK2 ve Siklin D1 genlerinin susturulması için ticari olarak tasarlanmış ve etkinliği kanıtlanmış olan siRNA'lar (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Literatürde siRNA taşıyıcısı olarak ipek protein nanopartiküllerine çok fazla rastlanmamıştır. Dolayısıyla etkin siRNA konsantrasyonunu optimize etmek adına hedef siRNA'ların değişen oranlarda kullanımı ve bunların mukayeseli incelenmesi yapılmıştır.

0,027 gr albumin ve 0,013 gr serisin 1'er ml nükleaz-free suda çözölmüş ve bu iki solüsyon 30 dk süreyle karıştırılmıştır. 1M NaOH ile pH ayarlaması (pH 9) yapılmıştır. Negatif yüke sahip olan siRNA'ların, negatif yüklü protein nanopartiküllere daha yüksek verimde bağlanabilmesi için partikül yüzeylerinin modifiye edilmesi gerekmiştir. Bunu için katyonik yüklü bir polimer olan Poli-L-lisin kullanılmıştır [158],[159]. Nanopartiküllere yüklenecek olan siRNA farklı konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10 ve 20µl = 0,7125µg, 1,425µg, 2,85µg, 5,7µg siRNA) toplam hacim 500 µl olacak şekilde %0,1'lik Poli-L-lisin (PLL) solüsyonu ile 2 saat boyunca rotatörde sabit bir hızda, mini santrifüj tüplerinde inkübe edilmiştir. Diğer yandan partiküllere, daha önce sunulduğu gibi desolvasyon yöntemi baz alınarak, desolvasyon ajanı renk bulanıklaşmaya kadar damla damla damlatılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik gluteraldehit solüsyonundan 25 µl damlatılmıştır. 2 saat sonra PLL ile inkübe edilen siRNA solüsyonları manyetik karıştırıcıda 600 rpm'de karışmakta olan partikül süspansiyonunun içerisine damla damla olarak damlatılmıştır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılmıştır.

### 3.2.2 İpek protein nanopartiküllerine ligand bağlanması

Çalışmada siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerin in vitro larinks kanseri hücrelerinde daha etkin olmaları ve in vivo hayvan modelinde oluşturulacak tümör dokusunu hedefleyebilmeleri için partiküller siRNA'lar ile donatıldıktan sonra larinks kanseri hücre reseptörlerine spesifik, uygun ligandlardan biri olan anti-CD44, hiyaluronik asit (HA) kullanılmıştır. Farklı ligand bağlama teknikleri denemiş ve en uygun yöntemle çalışmaya devam edilmiştir.

1) HA-nanopartikül bağlanması için 2mg/ml konsantrasyonunda HA koloidal nanopartikül solüsyonunda çözölmüştür [160]. 37°C'de 2 saat karıştırılan solüsyon 14.000 rpm de 15 dk santrifüj edilmiştir.

2) 0,1 M Sodyum asetat (0,082gr Sa. +10 ml d.su) pH 4.5'e ayarlanmıştır. 2ml hazırlanan solüsyonda 0,008 gr HA çözönmüştür. Uçların aktifleşmesi için EDC eklenmiştir. 37 °C'de 2 saat boyunca rotatörde karıştırılmıştır [161]. Hazırlanan nanopartiküllerin aktifleşmesi için ise farklı tomponlar kullanılmıştır.

#### **Farklı tamponlar:**

Borate tamponu: 0,15gr Sodium per borate 10 ml dsuda çözönmüş ve pH 9'a ayarlanmıştır.

Sodyum karbonat tamponu: 0,073 gr NaHCO<sub>3</sub> + 0,03 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 ml d.suda çözönererek pH 9'a ayarlanmıştır.

1'er ml tamponlarda, hazırlanan nanopartiküller süspanse edilmiştir. Sodium acetatta çözönmüş 1 ml HA solüsyonu, 1 ml tamponlarda süspanse edilen nanopartiküller ile birleştirilmiş ve 1 gün boyunca 37 °C'de rotatörde bekletilerek santrifüj edilmiş ve yıkanmıştır. Liyafilize edilen HA-nanopartiküllerin karakterizasyonu için FTIR kullanılmıştır.

#### **3.2.3 siRNA yüklenme veriminin incelenmesi**

siRNA'ların nanopartiküllere yüklenme verimini incelemek amacıyla hazırlanan nanopartikül-siRNA formölasyonları santrifüjde çöktürölmüş ve süpernatant kısmındaki partiküllere tutunmayan siRNA'ların derişimi 260 nm'de Nanodrop (Thermo Scientific) cihazıyla öölölmüştür. siRNA içermeyen nanopartiküllerden elde edilen süpernatant kör olarak kullanılmıştır. Ancak protein yapıdaki nanopartiküllerin süpernatantında bulunan yapılar siRNA absorbanları ile girişim yaptığı için net sonuçlar elde edilememiştir. Bundan dolayı çalışma Quant-iT™ RiboGreen® RNA ajan kiti ile devam ettirilmiştir. Bahsi geçen kit polipeptid ve nükleikasit yapılarının ayrı absorbanlar vermesi olanağı sağlayacaktır.

### Quant-iT™ RiboGreen® RNA ajan kiti Protokolü

Nanopartiküllere siRNA bağlanma verimini hesaplayabilmek için Quant-iT™ RiboGreen® RNA ajan kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Kitteki Ribogreen florosan boyası sadece RNA yapılarına bağlanarak spektrofloreometre ile ölçüm alınabilmesi olanağı sağlayacaktır.

Ribogreen protokolündeki amaç kit içerisinde sunulan E. Coli den izole edilen standart ribozomal RNAların spektrofloreometre'deki değerlerinden bir eğim oluşturarak çalışmada kullanılan partiküllerün içerisinde hapsolmayan siRNA değerinden yükleme verimini elde etmektir.

Stok tampon için 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA toplam hacim 25 ml olacak şekilde pH 7.5'de RNaz içermeyen suda (20XTE tamponu) hazırlanmıştır. Daha sonra 750 µl 20XTE tamponu 14.250 µl RNaz içermeyen suda toplam 15 ml olacak şekilde seyreltilmiştir.

Quant-iT RiboGreen RNA ajanı 1ml DMSO'da çözülmüştür. 30 µl bu boya stoğundan alınarak 5.970 µl stok Tamponda seyreltilmiştir.

Standart eğimi oluşturmak için 5 farklı konsantrasyonda RNA solüsyonları hazırlanmıştır;

1. 5 µl E. coli siRNA+ 995 µl stok tamponda seyreltilmiştir.
2. 10 µl E. coli siRNA+ 990 µl stok tamponda seyreltilmiştir.
3. 15 µl E. coli siRNA+ 985 µl stok tamponda seyreltilmiştir.
4. 20 µl E. coli siRNA+ 980 µl stok tamponda seyreltilmiştir.
5. 25 µl E. coli siRNA+ 975 µl stok tamponda seyreltilmiştir.

Farklı miktardaki (2.5, 5, 10 ve 20µl = 0,7125µg, 1,425µg, 2,85µg, 5,7µg siRNA) siRNA ile etkileştirilen nanopartikül-siRNA formülasyonlarından elde edilen 3 santrifüj ve yıkama ile elde edilen süpernatantlardan 1'er ml alınarak 1 ml boya solüsyonu ile karanlık ortamda etkileştirilmiş ve yukarıda gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 1ml hacme sahip RNA standart solüsyonları 1ml boya solüsyonu etkileştirilmiş ve bu çözeltilerin florometrik şiddetleri spektrofloreometre (AquaFluor, USA) ile ölçülmüştür. Ölçümde Ribogreen Kiti esas

alınmıştır ve buna göre Ribogreen ajanının RNA'ya bağlanmasında maksimum uyarmanın olduğu dalga boyu 500 nm (excitation) ve maksimum emisyonun olduğu dalga boyu da 525 nm (emission) olarak girilmiştir. Standart RNA'ların florometrik şiddeti ölçülmüş ve elde edilen verilerden yararlanılarak standartların konsantrasyonlarına karşın florometrik şiddet baz alınarak bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon grafiğinin denkleminde yararlanılarak, nanopartikül-siRNA (süpernatant) örneklerinin verdiği florometrik şiddet denklemde yerine konularak, örneklerdeki siRNA miktarı hesaplanmıştır. Bulunan sonuç nanopartiküllere bağlanmayan siRNA miktarıdır. Başlangıç siRNA miktarından bağlanmayan miktar çıkarılıp % bağlanma verimi elde edilmiştir.

### Agaroz Jel Elektroforezi

siRNA'ların nanopartiküllere başarılı bir şekilde bağlandığını kit ile gösterdikten sonra başka bir yöntemle de teyit etmek amacıyla elektroforez kullanılmıştır.

### Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Yüklenmesi

Elektroforez deneyi için öncelikle gereken tampon çözeltisi (TBE: Tris/Borate/EDTA) hazırlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; 108 g Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) ve 55 g borik asit 800 mL DEPC (Diethylpyrocarbonate) içeren distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözülmüştür. Üzerine 40 mL EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) çözeltisi eklendikten sonra, toplam hacim DEPC içeren suyla 1lt'ye tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan 10X TBE çözeltisi, yine DEPC içeren su ile 1X'e seyreltilmiştir. %1 olarak planlanan agaroz jel için, 0,3 g agarozun 30 mL 1X TBE buffer içerisinde mikrodalgada ısıtılarak çözünmesi sağlanmıştır. Agaroz çözündükten sonra çözeltiliye son konsantrasyonu 0,5 µg/mL olacak şekilde EtBr (Ethidium bromide) çözeltisi eklenmiştir. 15 taraklı 7cmx7cm tank içerisinde jelin donması sağlanmıştır. 2:1 oranında örnek/boya çözeltisi (bromofenol blue boyası) hazırlanarak, jeldeki kuyucuklara örnekler ve kontrol grubu olarak siRNA yüklenmiştir. Üzerine tampon çözeltisi tamamlanarak 17V'da 3.30 saat ve 10V güçte 5 saat, sabit akım kullanılarak yürütülmüştür ve görüntüleme yapılmıştır.

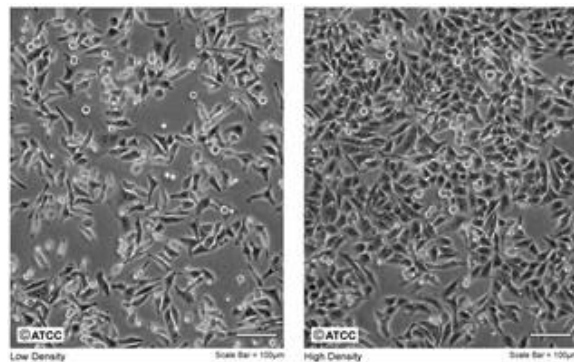
### 3.3 siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerinin in vitro etkinlik testleri

Bu çalışmada insan larinks skuamoza hücre karsinomu olan HEp-2 hücre hattı kullanılmıştır. siRNA-nanopartikül yapılarının hücre etkileşimini belirlemek için aşağıdaki incelemeler yapılmıştır. Ayrıca taşıyıcı için pozitif kontrol olarak ticari siRNA transfeksiyon ajanı HiperFect (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır.

#### 3.3.1 Hücrelerin Hazırlanması ve siRNA yüklü partiküllerin hücrelere transfeksiyonu

##### Hücrelerin Hazırlanması

Dondurulmuş şekilde -80°C de derin dondurucuda bulunan kriyotüplerdeki HEp-2 hücreleri derin dondurucudan alınarak çözülür. %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyeri ortamı hazırlanır. Çözülen HEp-2 hücreleri falkon tüp içerisine konularak üzerine 3 mL hazırlanan besi yerinden koyulur ve 3500 rpm'de 5 dk santifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılır ve pellet 4'er mL besi yeri ile süspanse edilip 25 cm<sup>3</sup> lük flasklara aktarılır. Flaskların kapağı hafif gevşetilir ve 37°C de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre koyulur. Mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her 24 saatte bir flask yüzeyinde hücrelerin çoğalmaları mikroskopik olarak incelenir. Hücrelerin çoğalmalarına bağlı olarak yüzey kaplaması tamamlandığında kültürler tripsin enzimiyle muamele edilerek 1/4 pasaj yapılır ve hücreler yeni flasklara aktarılır.



Şekil 3-2 HEp-2 hücrelerinin görüntüsü

Tablo 3-1. HEp-2 hücrelerinin hücre kültür ortamı

|                   |                                                                        |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Hücre Türü        | Larinks Kanseri Hücre Hattı (HEp-2)                                    |
| Kültür Kabı       | 25 cm <sup>3</sup> lik polistren flask, yüzeyi hücre tutunmasına uygun |
| Kültür Vasatı     | %10 Fetal sığır serumu içeren EMEM                                     |
| Rutin sub-kültür  | 1/4                                                                    |
| Kültür Özelliği   | Monolayer                                                              |
| Toplam Hacim      | 5 mL                                                                   |
| pH                | 7,2-7,5                                                                |
| Sıcaklık          | 37±0,5°C                                                               |
| İnkübasyon Ortamı | % 5'lik CO <sub>2</sub> etüvü                                          |

#### siRNA yüklü partiküllerin hücrelere transfeksiyonu

HEp-2 kanser hücreleri flasklarda çoğaltılıp %70-80 oranında yüzeyi kapladıktan sonra hücre vasatı atılır, 3 mL PBS ile hücreler yıkanır. Daha sonra hücrelere 1,5 mL tripsin-EDTA eklenir ve flask 3-4 dakika inkübatörde bekletilir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin mikroskopik olarak flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edilir. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak incelendikten sonra, flaska 3 mL taze besi yeri eklenip hücreler falkon tüpe aktararak 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL taze besi yeri eklenir ve süspanse edilerek hücre sayımı yapılır. Hücre sayımı için hücreler tripan mavisi ile boyanıp thoma lamında sayılır. Bu sayımda mavi boyanmış hücreler ölü, parlak ve boyanmamış hücreler canlı hücreleri göstermektedir.

#### **3.3.2 Sitotoksosite Testleri**

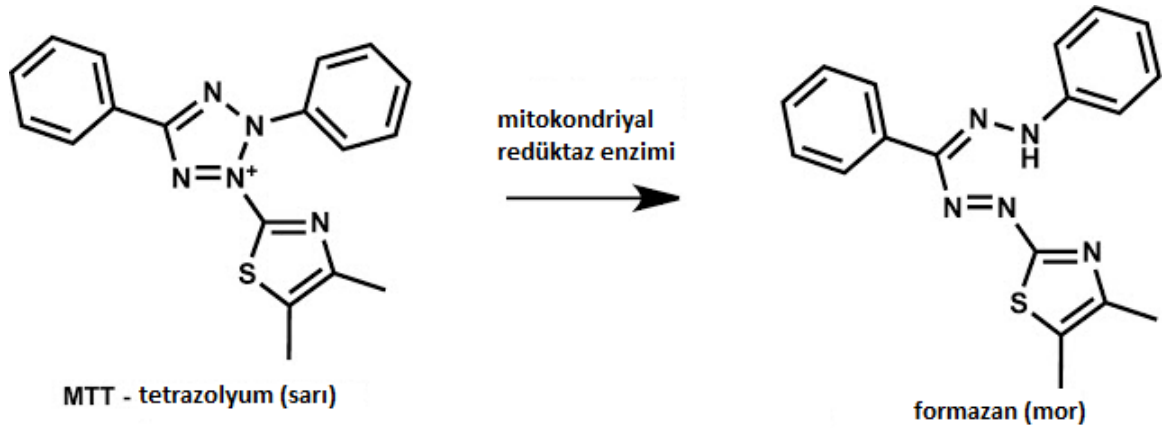
Hazırlanan nanopartiküllerin hedef siRNA'lar ile etkileşiminden önce sitotoksitelerinin tespiti için XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide) testi kullanılmıştır. Hücre canlılığının değerlendirilmesi için L929 fibroblast hücreleri (4x10<sup>3</sup> konsantrasyonlu) kullanılmış

ve hücreler 96 kuyucuklu plaklarda kültüre (30 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde) edilmiştir. Vasatı atılan hücreler farklı konsantrasyonda nanopartikül içeren hücre kültür vasatı ile inkübe (24 saat) edildikten sonra tüm deney grupları %20 XTT solüsyonu (1mg/ml, steril PBS) ile 4 saat muamele edilerek formazan kristalleri oluşturması sağlanmıştır. Oluşan formazan ürünü uygun bir çözücü ile çözüldükten sonra bu mor renkli çözeltinin absorbands değeri, 450 nm aralığındaki bir dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak hesaplanmıştır. XTT testi her deney grubu ve kontrol grubu için 6 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

### MTT Testi

MTT testi, hücre canlılığının tesbiti için kullanılan testlerden biridir. Antiproliferatif ajanların sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksosite oranları bu test ile saptanabilir.

Genel olarak, mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin tetrazolyum boyasını indükleme kapasitelerini ölçmeye dayalı kolorometrik bir yöntemdir. Sadece canlı hücreler tarafından sarı renkli tetrazolyum mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür [162].



Şekil 3-MTT yapısında tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşmesinin şematik gösterimi.

Oluşan formazan ürününü çözmek için genellikle DMSO (Dimethyl sulfoxide), asitlenmiş etanol çözeltisi ya da seyrelmiş HCl (Hydrochloride acid) içeren SDS (Sodium dodecyl sulfate) veya izopropanol alkol çözeltisi eklenir. Bu mor renkli

çözeltinin absorbans değeri, 500-600 nm aralığındaki bir dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak hesaplanır. MTT, hücrelerin aktivitelerini, proliferasyon ve canlılıklarını ölçmede etkin, hassas, güvenilir, kantitatif bir sitotoksikite yöntemidir.

İpek protein NPs-siRNA'ların HEP-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması

Tez kapsamında hazırlanan Albümin-Serisin (2:1) formülasyonundaki nanopartiküller larinks kanserinde prognostik belirteç olarak tanımlanan kazein kinaz 2 (CK2), Absent, Small, or Homeotic-Like (ASH2L) ve Siklin D1 genlerine spesifik siRNA moleküllerinin farklı miktarlarında yüklenmiş ve bu sistemlerin HEP-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Ayrıca söz konusu siRNA'lar ticari taşıyıcı olan HiperFect ile etkileştirilip ve aynı zamanda hiçbir taşıyıcı sistem ile etkileştirilmeden direkt olarak hücrelerle muamele edilmiştir. Aşağıdaki tabloda hücrelerle etkileştirilen farklı deney grupları yer almaktadır.

Tablo 3-2. Hücre etkileşimlerine ait çalışma planı

|                                    | CK2 siRNA | ASH2L siRNA | SiklinD1 siRNA |
|------------------------------------|-----------|-------------|----------------|
| Alb-Ser (2:1) + siRNA1 (0,7125 µg) | ✓         | ✓           | ✓              |
| Alb-Ser (2:1) + siRNA2 (1,425 µg)  | ✓         | ✓           | ✓              |
| Alb-Ser (2:1) + siRNA3 (2,85 µg)   | ✓         | ✓           | ✓              |
| Alb-Ser (2:1) + siRNA4 (5,7 µg)    | ✓         | ✓           | ✓              |
| HiperFect + siRNA1 (0,7125 µg)     | ✓         | ✓           | ✓              |
| HiperFect + siRNA2 (1,425 µg)      | ✓         | ✓           | ✓              |
| Hiperfect + siRNA3 (2,85 µg)       | ✓         | ✓           | ✓              |
| HiperFect + siRNA4 (5,7 µg)        | ✓         | ✓           | ✓              |
| siRNA1 (0,7125 µg)                 | ✓         | ✓           | ✓              |
| siRNA2 (1,425 µg)                  | ✓         | ✓           | ✓              |
| siRNA3 (2,85 µg)                   | ✓         | ✓           | ✓              |
| siRNA4 (5,7 µg)                    | ✓         | ✓           | ✓              |

HEp-2 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara  $5 \times 10^4$  hücre/mL derişimde ekilmiştir. Hücreler 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra yukarıda yer alan tüm deney grupları ile etkileştirilmiştir.

- Sadece siRNA ile muamele edilecek hücre grupları için siRNA'lar son hacim 100 µL besi yerinin içinde 4 farklı derişimde olacak şekilde 20 µM stok siRNA'dan sırasıyla 2,5, 5, 10 ve 15 µl siRNA (0,7125µg, 1,425µg, 2,85µg, 5,7µg siRNA) alınarak RNAz içermeyen su ve serumsuz besi yeri ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
- siRNA-HiperFect ile muamele edilecek hücreler için, serumsuz besiyerinde farklı miktarlarda hazırlanan siRNA'lara (2.5, 5, 10 ve 20µl = 0,7125µg, 1,425µg, 2,85µg, 5,7µg siRNA) 5 µL taşıyıcı ilave edilip nazıkçe pipetaj yapılmıştır. siRNA ve taşıyıcının kompleksleşmesi için yarım saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve çözeltiler hücrelere pipetlenmiştir.

Alb-Ser-siRNA formülasyonları için Alb:Ser (2:1) nanopartiküllerine rutin siRNA yükleme prosedürü uygulanmıştır. Bunun için, 0,027 gr albumin ve 0,013 gr serisin 1'er ml nükleaz-free suda çözülmüş ve bu iki solüsyon 30 dk süreyle karıştırılmıştır. 1M NaOH ile pH ayarlaması (pH 9) yapılmıştır. Negatif yüke sahip olan siRNA'ların, negatif yüklü protein nanopartiküllere daha yüksek verimde bağlanabilmesi için partikül yüzeylerinin modifiye edilmesi gerekmiştir. Bunu için katyonik yüklü bir polimer olan Poli-L-lisin kullanılmıştır [158],[159]. Nanopartiküllere yüklenecek olan siRNA farklı konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10 ve 20µl = 0,7125µg, 1,425µg, 2,85µg, 5,7µg siRNA) toplam hacim 500 µl olacak şekilde %0,1'lik Poli-L-lisin (PLL) solüsyonu ile 2 saat boyunca rotatörde sabit bir hızda, mini santrifüj tüplerinde inkübe edilmiştir. Diğer yandan partiküllere, daha önce sunulduğu gibi desolvasyon yöntemi baz alınarak, desolvasyon ajanı renk bulanıklaşınca kadar damla damla damlatılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak %8'lik gluteraldehit solüsyonundan 25 µl damlatılmıştır. 2 saat sonra PLL ile inkübe edilen siRNA solüsyonları manyetik karıştırıcıda 600 rpm'de karışmakta olan partikül süspansiyonunun içerisine damla damla olarak damlatılmıştır ve üzeri delinmiş alimünyum folya ile kapatılmıştır. 24 saat sonunda 14.000 rpm'de 10 dk 3 kez santrifüj edilmiş ve her santrifüjde bağlanmayan siRNA'ları gidermek amacıyla

süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet serumsuz besiyeri ile seyreltilerek hücrelere pipetlenmiştir.

- siRNA, Hiperfect-siRNA ve Alb-Ser-siRNA gruplarıyla etkileştirilecek hücrelere serumsuz besiyeri ile hazırlanan örneklerden önce 90 µL pipetlenip, etüvde 4 saat etkileşim yapılmıştır. Bu sürenin sonunda aynı kuyucuklara 10'ar µL serum ilave edilmiş ve plaka inkübasyona bırakılmıştır. 96'lık plaklar bu andan itibaren 24 saat olmak üzere 37°C, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiş ve sürelerin sonunda MTT testi uygulanmıştır.

İnkübasyon sürelerinin sonunda plaktaki vasat atılmış ve kuyucuklara 100 µL taze vasat ve 13 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL, PBS ile seyreltilmiştir) pipetlenmiştir. Plaklar 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki vasat ve MTT çözeltisi dikkatlice alınmış ve kuyucuklara 100 µL HCl içeren izopropanol çözeltisi pipetlenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildikten sonra plaklar 570 nm'de Mikro plate okuyucuda okutulmuştur.

Yapılan MTT testinde, 96 kuyucuklu plakların ilk sütunundaki sekiz kuyucuk kontrol çalışması olarak kullanılmıştır ve hücreler besi yerinin haricinde herhangi bir aktif ajan ile muamele edilmemiştir. Diğer tüm gruplar sekiz tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kontrol plağından alınan absorbanların ortalaması %100 kabul edilmiş olup, test kuyucuklarından alınan absorbanların ortalamaları ile kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

### **3.3.3 xCELLingence Gerçek Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi**

xCELLingence® RTCA MP cihazı, elektriksel empedans teknolojisi ile her bir kuyucuk içindeki iyonik konsantrasyon ve hücrelerin elektrodla bağlanıp bağlanmadığına dayanarak ölçüm yapan, hücre bazlı mikroelektronik biyosensör sistemidir. Hücre canlılığı, hücre sayısı, hücre morfolojisi ve yapışma derecesinin tümü elektrod empedansını etkiler. Hücre proliferasyonunu ve morfoloji değişimini, işaretçi kullanmadan saptama, fizyolojik temas gerektirmeksizin gerçek zamanlı izleme ile otomatik ölçümler yapabilme, yüksek duyarlılık ve doğrulukta görüntüleme için kullanılan bir sistemdir. Geleneksel hücre tabanlı testlerin zaman,

çözücülü boyalarla etkileşimi ve iş gücü yoğunluğunu ortadan kaldırarak büyük ölçüde verimlilik sağlamaktadır. Sistemin merkezi, özel üretilmiş 96 kuyucuklu plakaların (E-plaka 96) alt kısmında entegre edilmiş mikroelektronik hücre sensörü dizisidir. Bu sensör; elektrodların elektronik empedansının ölçülmesi, elektrodlar üzerindeki değişikliklerin saptanması ve izlenmesini sağlar. Birimsiz olarak ifade edilen hücre indeksi (cell index; CI); hücre durumunu gösteren elektrik empedansındaki göreceli değişikliğin ölçülmesi için kullanılır. Hücre indeksinin artışı ve azalışına bağlı olarak sistemin elde ettiği veriler, cihazın kullanıcı dostu yazılımı ile otomatik olarak grafiksel ve sayısal anlamda değerlendirilir.

Yöntemin Uygulanışı: Hücreler, açıklamalar kısmındaki gibi plakaya ekildikten sonra literatürde “hücre indeksi” olarak geçen birimsiz ifadenin uygun düzeye gelmesi için inkübasyona bırakılmıştır. Hücre indeksi uygun değere (~2.5) ulaştığında hücrelere test numuneleri uygulanmıştır. (Uygun hücre indeks zamanı için Eskişehir Anadolu Üniversitesi AÜBİBAM merkezinde önceden çalışılmış hücrelerin ikiye katlanma sayıları baz alınmaktadır. Analizlerde test numunelerinin uygulama başlangıç süresi için bir hücre indeksi belirlenir ve bu değere ulaşıldığı an test numunelerinin uygulanması için başlangıç saati olarak belirlenir. Ancak analiz isteğinde bulunan kişilerin isteği ve sorumluluğunda sonuçlarda görünen hücre indeks değeri başlangıç saati için kullanılmıştır. Başlangıç hücre indeks değeri ~2.5'tir.)

Hücrelere analiz numune ve konsantrasyonları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- 200 µL'lik besiyeri (serum ve antibiyotik içeren besiyeri) üzerinden e-plaka tabanına temas etmeden 150 µL besiyeri çekilmiştir (minimum miktar plaka tabanında bırakılmıştır). Önceden analizi isteyen kişilerce hesaplanarak besiyeri içinde hazır halde elden uygun koşullarda getirilmiş test numunelerinin farklı konsantrasyonları 150 µL besiyeri (serum ve antibiyotik içermeyen) içerisinde olacak şekilde tarafımızdan plakadaki hücrelere uygulanmıştır.

Hücrelere kontrol grupları aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

- Normal kontrol: Uygun besiyeri + Hücre
- Besiyeri kontrol (kör): Hücresiz uygun besiyeri

### Test numunelerinin uygulanması ve veri değerlendirilmesi:

- Sisteme hücre ekiminden önce besiyeri ile doldurulmuş e-plaka yerleştirilerek kör okuma yaptırılmıştır. Plakada hata gözlemlenmediği için plaka çıkartılarak hücreler ekilmiş ve bir süre hücrelerin e-plaka tabanına yerleşmeleri beklenmiş ve ardından analiz başlatılmıştır.
- Sistem, her saat başı veri alacak şekilde otomatik programlanmıştır.
- Analiz n=4 tekrarlı veriler hesaplanarak sonuçlar elde edilmiştir. Analiz değerlendirmesi gerçekleştirilirken test numunelerinin verileri arasından herhangi bir kuyu verisi (sapma değeri) çıkartılmamıştır.
- Test numunelerinin plakadaki son konsantrasyonları ve kıyaslama için de kontrol grupları aşağıda Tablo 3-3'de gösterildiği gibi plakalara uygulanmıştır:

Tablo 3-3. HEp-2 hücreleri üzerine uygulanan test maddeleri, konsantrasyonları ve kontrol grupları

| Sıra | Test numunesi          | ( $\mu$ M SiRNA) | Sıra | Test numunesi                   | ( $\mu$ M SiRNA) |
|------|------------------------|------------------|------|---------------------------------|------------------|
| 1    | ASHL2 (NP*)            | 0,14             | 11   | ASHL2 (Naked**)                 | 0,14             |
| 2    | ASHL2 (NP)             | 0,28             | 12   | ASHL2 (Naked)                   | 0,28             |
| 3    | ASHL2 (NP)             | 0,56             | 13   | ASHL2 (Naked)                   | 0,56             |
| 4    | CSKN (NP)              | 0,14             | 14   | CSKN (Naked)                    | 0,14             |
| 5    | CSKN (NP)              | 0,28             | 15   | CSKN (Naked)                    | 0,28             |
| 6    | CSKN (NP)              | 0,56             | 16   | CSKN (Naked)                    | 0,56             |
| 7    | CD1 (NP)               | 0,14             | 17   | CD1 (Naked)                     | 0,14             |
| 8    | CD1 (NP)               | 0,28             | 18   | CD1 (Naked)                     | 0,28             |
| 9    | CD1 (NP)               | 0,56             | 19   | CD1 (Naked)                     | 0,56             |
| 10   | Hücreli Normal Kontrol | 0                | 20   | Hücresiz Besiyeri Kontrol (Kör) | 0                |

\*NP: Nanopartiküllü test numunesi / \*\*Naked: Nanopartikül içermeyen test numunesi

#### 3.3.4 Real time PCR Analizi

Hedef genlerin hücrelere verilen siRNA ile inhibe edildiğini göstermek amacıyla Real Time RT-PCR analizi yapılmıştır. Bu amaçla önce Hep-2 larinks kanseri hücreleri 6 kuyucuklu plaklara  $1.25 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir. 24

saatlik inkübasyonun ardından hücreler çeşitli deney grupları ile 48 saat muamele edilmiştir. (ipek protein nanopartikül-siRNA formülasyonunun, HiperFect-siRNA siteminin ve siRNA'ların hazırlama prosedürü ve tüm deney gruplarının hücrelere transfeksiyonu MTT analizinde detaylı olarak anlatılmıştır). Ardından tüm kuyucuklardaki hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır.

**RNA izolasyonu:** Her bir deney grubuyla 48 saat inkübe edilen kanser hücrelerinden RNA izolasyonu yapmak için aşağıdaki RNeasy Mini Kit (Qiagen, Almanya) protokolü takip edilmiştir.

- Kuyucuklardaki hücre süspansiyonları 15 mL'lik falkon tüplerine alınmış, 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Üzerine 350 µl lizis çözeltisi olan Buffer RLT ilave edilmiş ve 30 saniye boyunca vortekslenmiştir. Aynı şekilde kuyucukların tabanında yapışmış halde olan hücrelerin üzerine de 600 µl (daha yoğun hücre olduğu için) lizis çözeltisi eklenmiş ve plaka aşağı yukarı hareket ettirilmiştir.
- Lizat çözeltileri, gDNA ayırıcı kolonlara aktarılmış ve 30 saniye 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bir sonraki adım için ayırıcı kolonlar atılmış ve kolondan aşağıya gelen sıvı ile devam edilmiştir.
- Söz konusu sıvının üzerine 600 µl % 70'lik etanol ilave edilip iyi bir şekilde pipetaj yapılmıştır.
- Elde edilen çözelti, RNeasy kolonlarına aktarılmış ve 15 saniye 9800 rpm'de santrifüj edilmiş ve aşağıya gelen sıvı atılmıştır.
- Kolona 700 µl Buffer RW1 eklenmiş ve 15 saniye 9800 rpm'de santrifüj edilmiş ve aşağıya gelen sıvı tekrar atılmıştır.
- Bu kez kolona 500 µl Buffer RPE eklenmiş ve 15 saniye 9800 rpm'de santrifüj edilmiş ve aşağıya gelen sıvı atılmıştır.
- Kolona 500 µl Buffer RPE eklenmiş ve bu kez 2 dakika 10200 rpm'de santrifüj edilmiş ve aşağıya gelen sıvı atılmıştır.

- Kolon yeni bir tüpe aktarılmış ve boş halde 1 dakika boyunca 10200 rpm'de santrifüj edilmiş ve aşağıya gelen sıvı atılmıştır.
- Kolon yeni bir 1.5 mL'lik tüpe aktarılmış ve 40 µl RNase-free su direkt olarak kolona aktarılıp 1 dakika 10200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Aşağıya gelen sıvı total RNA çözeltisidir.

**cDNA Sentezi:** Her bir gruptan izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlemek için aşağıdaki RT<sup>2</sup> HT First Strand Kit (Qiagen, Almanya) protokolü takip edilmiştir. Reaksiyonlar PCR kullanımına özgü tüplerde gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerin RNA konsantrasyonlarının eşit olması gerekmektedir. Bunun için, tüm tüplerdeki RNA derişimi en küçük değerdeki RNA konsantrasyonu olacak şekilde uygun miktardaki RNaz içermeyen su ilave edilerek eşitlenmiştir. Isı döngüleyici (Thermal Cycler) kullanılarak geri transkripsiyon mekanizması koşulları uygulanmış ve cDNA'lar elde edilmiştir.

- RNA konsantrasyonları eşitlenen örneklerden 6 µl PCR tüplerine alınıp, üzerine 2 µl RNase-free su ilave edilmiştir. Ardından tüplere 6 µl genomik DNA'yı uzaklaştırma tamponu (Buffer GE2) eklenir.
- Tüplerdeki çözelti pipetaj yapılarak karıştırılır ve spin down edilerek tüplerin çeperlerinde kalan sıvıların da toplanması sağlanır.
- Daha sonra tüpler 5 dakika 37 °C'de inkübe edilir ve ardından hızlı bir şekilde buzun üzerine alınarak 1 dakika boyunca bekletilir.
- Tüm tüplere 6 µl geri transkriptaz karışım tamponu (BC4) ilave edilir, pipetaj yapılır, spin down edildikten sonra tüpler c-DNA sentez için gerekli koşullar altında (42 °C'de 60 dk ve 95 °C'de 5 dk) ısı döngüleyiciye bırakılır. Ve c-DNA'lar sentezlenir.

**Gen Ekspresyon Analizi:** Çalışılan gruplarda siRNA ile baskılanan genlerinin ifadenmesinin inhibe edildiğini göstermek amacıyla çalışmanın son kısmı olan gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Hedef genlerin ekspresyon analizleri için bu genlere spesifik primerler (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Referans gen olarak  $\beta$ -Actin geni seçilerek ona özgü primerler (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. RT-PCR

cihazı olarak Applied Biosystems ViiA 7 (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmış ve analiz cihaza özgü PCR tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Analiz edilecek her bir gen için Tablo 4'te gösterilen reaksiyon hazırlanmıştır ve Tablo 5'te verilen koşullar kullanılmıştır.

Tablo 3-4. Analiz edilecek her bir gen için hazırlanan reaksiyon ortamı

| Bileşen                | Hacim (µL) |
|------------------------|------------|
| SYBR Green Mastermix   | 12.5       |
| RNAz içermeyen su      | 8.3        |
| ROX                    | 0.2        |
| Primer                 | 1.0        |
| cDNA sentez reaksiyonu | 3.0        |
| Toplam Hacim           | 25.0       |

Tablo 3-5. Kullanılan ısı döngüleyici için reaksiyon koşulları

| Döngüler | Zaman | Sıcaklık |
|----------|-------|----------|
| 1        | 10 dk | 95°C     |
| 45       | 15 sn | 95°C     |
|          | 1 dk  | 60°C     |

### 3.3.5 Akış Sitometrisi ile Annexin V-PI analizi

Hedef genleri susturmak üzere hazırlanan ipek protein nanopartikül-siRNA formülasyonlarının, sadece siRNA'ların ve HiperFect-siRNA sistemlerinin HEp-2 hücreleri üzerindeki ölüm yollarının apoptotik ve/veya nekrotik mi olduğunu araştırmak için Annexin-V-PI analizi yapılmıştır. Bunun için Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (ThermoFisher Scientific, ABD) prosedürü takip edilerek sonuçlar Akış Sitometri (BD FACSCanto) cihazında incelenmiştir.

- Hep-2 hücreleri, 24 kuyucuklu plaklara  $2,5 \times 10^5$  hücre /kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Ertesi gün nanopartiküller ile hedef siRNA'lar etkileştirilmiş ve hazırlanan tüm deney grupları ile hücreler transfekte edilmiştir (ipek protein nanopartikül-siRNA formülasyonunun, HiperFect-siRNA sisteminin ve

siRNA'ların hazırlama prosedürü ve tüm deney gruplarının hücrelere transfeksiyonu MTT analizinde detaylı olarak anlatılmıştır).

- Hücreler ve deney grupları muamele edildikten sonra etüvde 48 saat boyunca etkileşimleri için inkübasyona bırakılmıştır. 48 saat sonra, her bir kuyucukta bulunan deney grubu tripsin aktivasyonu ile kaldırılmış, 750 µl PBS kuyucuklara eklenerek tüm hücreleri alacak şekilde yıkama yapılarak her bur deney grubundaki hücreler buzun üzerindeki akış sitometri tüplerine alınmıştır.
- Tüm tüpler 300 g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır.
- Dipte çöken hücrelere 100 µl 1X annexin-bağlanma tamponu eklenmiştir.
- Buzun üzerine tüpler yerleştirilmiş ve her bir tüpe 5 µl Alexa Fluor® annexin V boyasından ve 1 µl PI (100 µg/mL) boyasından ilave edilmiştir,
- Tüplerdeki hücreler oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir ve ardından hücreler 300 g'de 5 dk santrifj edilerek süpernatantları atılmıştır.
- Son olarak tüplerdeki hücrelerin üzerine 400 µl 1X annexin-bağlanma tamponu ilave edilerek, yavaşça pipetaj yapılmıştır.
- Buzun üzerine tüpler konarak, Akış sitometri cihazına gidilmiş ve analize kadar tüpler buzda bekletilmiştir.

### 3.3.6 İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen sonuçlar ortalama  $\pm$ Standart Sapma (Standart Deviation=SD) olarak verilmiştir. Deneylerin kaç tekrarlı çalışıldığı  $n$  değeri ile gösterilmiştir.

### 3.4 siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerinin in vivo etkinlik testleri

#### 3.4.1 Fare Ksenogreft Larinks Kanseri Dokusunun Oluşturulması

Tez kapsamında 80 adet, yaklaşık 6-8 haftalık ve 20 g ağırlığında Nude BALB/c tipi fareler KOBAY DHL A.Ş.'nin 03.08.2017 tarihli ve 135 protokol no'lu etik kurul onayı alınarak kullanılmıştır. KOBAY DHL A.Ş.'nin standart kuralları gereğince deney süresince fareler aseptik koşullarda ve sabit nem ve sıcaklıkta yetiştirilmiştir. *In vivo* kanser modeli oluşturmak için farelere larinks kanseri hücre hattı HEP-2 hücreleri ( $4 \times 10^6/150 \mu\text{l}$ ) deri altından sırt bölgesine enjekte edilmiştir. Her bir hayvana 100mcl (50mcl PBS+50mcl matrigel) solüsyonunda süspansiyon edilen 4 milyon hücre enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra farelerde oluşması beklenen tümör hacmi ( $\text{boy} \times \text{genişlik}^2 \times 0.5236$ ) kaliper ile haftada iki kez ölçülmüştür [163]. Tümör hacmi ovalite hesaplaması aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [164].

$$\text{Tümör Hacmi} = 4\pi \left[ \left( \frac{\text{kısa kenar}}{2} \right) \left( \frac{\text{uzun kenar}}{2} \right)^2 \right] / 3$$

Oluşturulan tümör hacimleri belli bir büyüklüğe geldiğinde hazırlanan örnekler (tablo 6 da gösterilmiştir.) PBS'de dilue (100  $\mu\text{L}$ ) edildikten sonra farelere intravenöz ve intraperitoneal olarak haftada bir kez, 3 hafta boyunca enjekte edilmiştir. 0., 5., 13., ve 27. günlerde her bir gruptaki farelerin tümör boyutları ölçülmüştür. Fareler tüm gruplarla muamele edildikten sonra 27. günde öldürülecek ve farelerin tümörleri alınarak histolojik incelemeleri yapılmıştır [163].

Tablo 3-6. In vivo deney ve kontrol grupları (NPs: Nanopartiküller)

| Grup No | <i>In vivo</i> deney ve kontrol grupları                 | Hayvan adedi |
|---------|----------------------------------------------------------|--------------|
| 1       | Ligand ile modifiye edilmemiş boş NPs                    | 8            |
| 2       | Ligand ile modifiye edilmiş boş NPs                      | 8            |
| 3       | Ligand ile modifiye edilmiş CK2 siRNA yüklü NPs          | 8            |
| 4       | Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L siRNA yüklü NPs        | 8            |
| 5       | Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L ve CK2 siRNA yüklü NPs | 8            |
| 6       | CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect)              | 8            |
| 7       | ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect)            | 8            |
| 8       | CK2 ve ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect)     | 8            |
| 9       | PBS                                                      | 8            |
| 10      | Hiçbir ajan ile muamele edilmeyen kontrol grubu          | 8            |

### 3.4.2 Histolojik İncelemeler

Uygulamadan sonra fareler servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmiştir. Hayvanların tümör dokusu, kalp, akciğer, karaciğer, dalak ve böbrekleri alınmış ve sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra 80 °C'de saklanmıştır. Frozen cihazında kesit alındıktan sonra çözündürülen dokular formalinde fikse edilmiş ve hematoksilin eosin ile dokular boyanarak mikroskop altında inceleme yapılmıştır [163]. Organ Toksisite çalışmaları ile Tümör dokusu incelemeleri histolojik olarak yapılmıştır.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Üretilen nanopartiküllerin optimizasyonu ve karakterizasyonu

#### 4.1.1 Nanopartiküllerin boyut ve yüzey yükü incelemeleri

Hazırlanan tüm partiküllerin optimizasyon çalışmaları için farklı desolvasyon ajanı, farklı pH değeri, farklı çapraz bağlayıcı oranları denenmiştir. Nanopartiküllerin boy-boy dağılımları ve yüzey yükü Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) ile belirlenmiştir. Hazırlanan nanopartiküller deionize su ile seyreltilerek yaklaşık 1 ml örnek çözeltisi polistiren küvet içerisine konulmuş, çözelti içerisinde lazer ışığının geçirilmesi ile partikül boyutu belirlenmiştir. Her bir parametre için boyut ve yüzey yükü analizleri 3'er tekrarlı yapılmıştır.

#### Desolvasyon Ajanının Etkisi

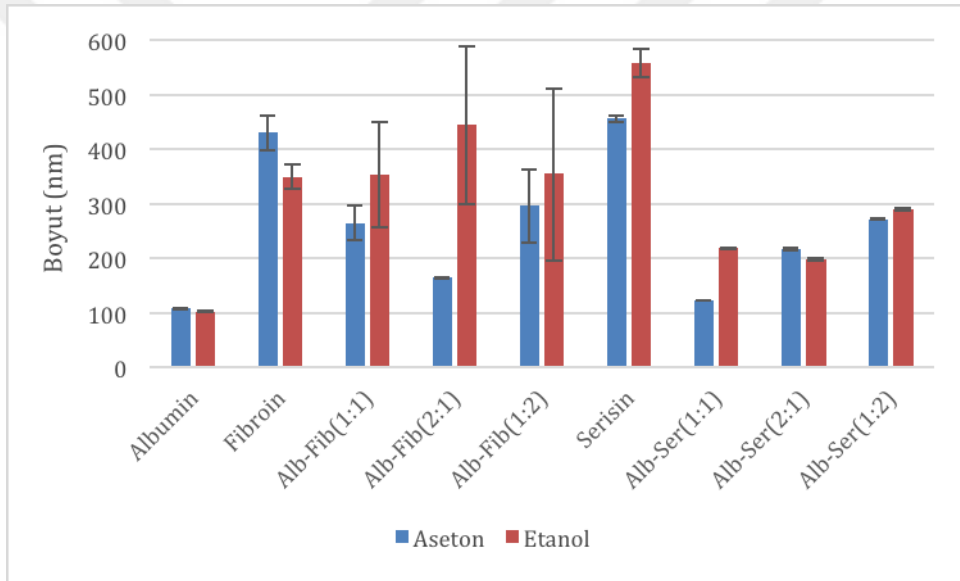
Protein nanopartiküllerin kendiliğinden oluşma (self-assembly) özellikleri desolvasyon ajanlarının etkisiyle oluşturulmaktadır. Desolvasyon ajanları olarak etanol ve aseton kullanılmış ve Zeta-Sizer'dan elde edilen ortalama partikül boyutları ve yük dağılımları Tablo 4-1 ve 4-2'de sunulmuştur. Bu doğrultuda Fibroin, Alb-Fib(1:2 w/w), Serisin, Alb-Ser(1:1 w/w) ve Alb-Ser(1:2 w/w) partikülleri aseton, diğer partiküller ise etanol ile en optimum boyutlarına ulaşmıştır. Yüzey yükü dağılımları incelendiğinde ise tüm partiküller için -14mV ile -23mV arasında değişen bir yük dağılımı tespit edilmiştir.

Tablo 4-1. Desolvasyon ajanı olarak aseton kullanılarak oluşturulan nanopartiküllerin boyut dağılımları ve yüzey yükü sonuçları

| Partikül     | Boyut(nm) |       |       | Zeta(mV) |       |       | pDI   |       |       |
|--------------|-----------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Albumin      | 108,7     | 106,7 | 109,5 | -18,9    | -18,9 | -19,3 | 0,214 | 0,205 | 0,206 |
| Fibroin      | 456,5     | 395,6 | 438,4 | -14,2    | -14,2 | -12,8 | 0,7   | 0,491 | 0,68  |
| Alb-Fib(1:1) | 274,1     | 289,4 | 227,7 | -14,9    | -15,0 | -14,4 | 0,662 | 0,619 | 0,587 |
| Alb-Fib(2:1) | 161,6     | 164,5 | 165,5 | -14,5    | -15,2 | -16,6 | 0,287 | 0,307 | 0,309 |
| Alb-Fib(1:2) | 373,2     | 254,3 | 260,3 | -15,6    | -14,8 | -14,7 | 0,538 | 0,513 | 0,573 |
| Serisin      | 448,9     | 456,6 | 460,8 | -13,1    | -14,0 | -13,1 | 0,108 | 0,184 | 0,196 |
| Alb-Ser(1:1) | 123,3     | 122,6 | 122,1 | -14,7    | -15,3 | -14,9 | 0,046 | 0,042 | 0,052 |
| Alb-Ser(2:1) | 214,6     | 217,6 | 218,3 | -17,9    | -16,5 | -17,3 | 0,15  | 0,166 | 0,155 |
| Alb-Ser(1:2) | 273,8     | 271,6 | 270,2 | -22,7    | -22,7 | -23,4 | 0,189 | 0,201 | 0,192 |

Tablo 4-2. Desolvasyon ajanı olarak etanol kullanılarak oluşturulan nanopartiküllerin boyut dağılımları ve yüzey yükü sonuçları

| Partikül     | Boyut(nm) |       |       | Zeta(mV) |       |       | pDI   |       |       |
|--------------|-----------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Albumin      | 102,7     | 101,4 | 99,3  | -15,0    | -16,0 | -15,1 | 0,149 | 0,156 | 0,123 |
| Fibroin      | 369,8     | 352   | 325,1 | -13,4    | -12,2 | -12,0 | 0,624 | 0,701 | 0,715 |
| Alb-Fib(1:1) | 325,1     | 460,4 | 274   | -14,1    | -14,3 | -15,2 | 0,595 | 0,569 | 0,847 |
| Alb-Fib(2:1) | 275,9     | 534,3 | 521,5 | -12,0    | -11,4 | -13,2 | 0,758 | 1     | 1     |
| Alb-Fib(1:2) | 316,9     | 527,2 | 218,6 | -12,3    | -11,2 | -11,5 | 0,948 | 0,893 | 0,93  |
| Serisin      | 528,7     | 564,4 | 579,9 | -15,2    | -19,6 | -16,6 | 0,311 | 0,278 | 0,249 |
| Alb-Ser(1:1) | 218       | 219,3 | 216,5 | -15,6    | -18,4 | -19,5 | 0,008 | 0,002 | 0,037 |
| Alb-Ser(2:1) | 196,7     | 200,9 | 196,4 | -15,2    | -15,0 | -18,6 | 0,082 | 0,085 | 0,087 |
| Alb-Ser(1:2) | 286,4     | 291,8 | 287,4 | -13,0    | -12,2 | -13,1 | 0,054 | 0,093 | 0,076 |



Şekil 4-1 Farklı desolvasyon ajanları kullanılarak elde edilen protein nanopartiküllerin boyut dağılım grafiği

Bu sonuçlar doğrultusunda her bir partikül sentezi için farklı desolvasyon ajanı ile ilerlenmiştir. Alb-Fib örneklerine etanol, Alb-Ser örneklerine ise asetona devam edilmiştir.

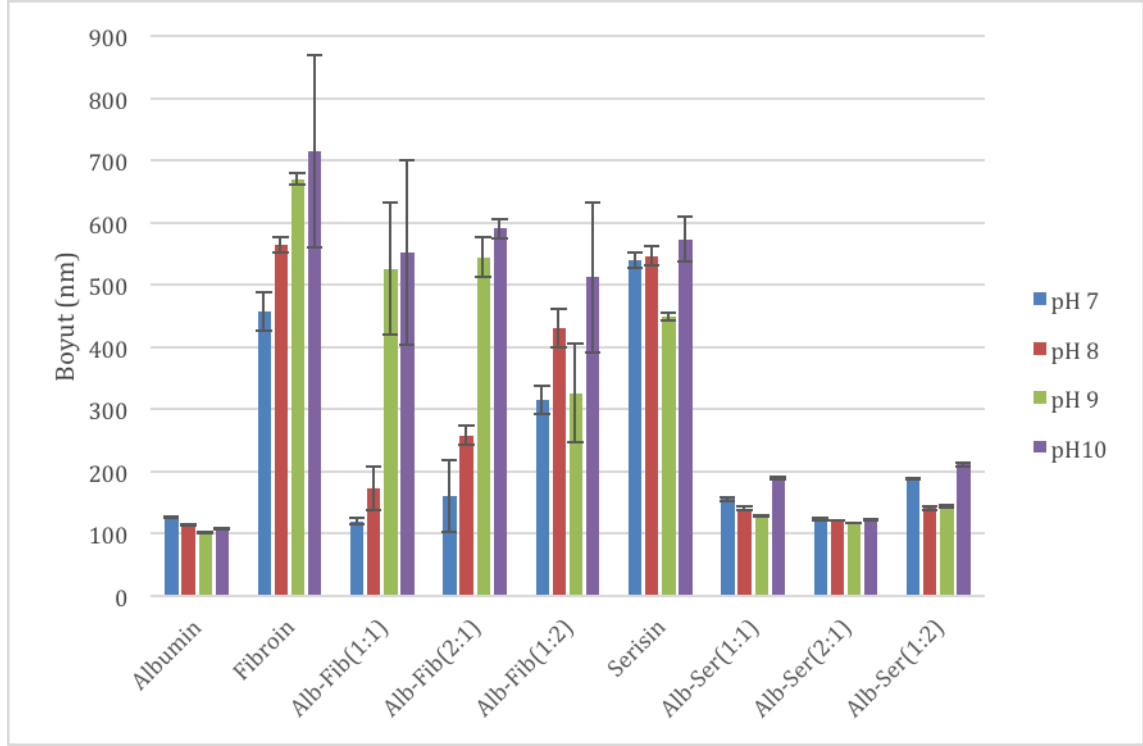
## pH Etkisi

Proteinlerin izoelektrik noktaları yapıların kararlılığını etkilemekte ve farklı pH'larda karakteristik özellikleri değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle partikül sentezi sırasında desolvasyon ajanı eklenmeden önce protein solüsyonlarının pH parametresi 1M NaOH çözeltisi kullanılarak 7 ve 10 arasında değiştirilmiştir. pH parametresinin 7'den düşük seçilmemesinin sebebi ise örneğin albümin izoelektrik noktasının 4.7 civarında olması ve bu seviyeye yaklaşıldıkça protein-protein etkileşimlerinin artmasına sebep olmasıdır. Protein-protein etkileşimleri ise yapıda agregat oluşmasına ve daha büyük partikül boyutlarına sebebiyet vermektedir [165].

Ancak bu pH'dan daha yüksek değerlerde protein molekülleri ile çözücü molekülleri etkileşimleri arasındaki elektrositatik itme kuvvetleri agregasyonu azaltmaktadır. Farklı pH'lardaki boyut ve yük dağılımları Tablo 4-3'de sunulmuştur. Zeta Sizer sonuçları incelendiğinde Albumin, Serisin ve Alb-Ser kombinasyonlu partiküller pH 9-10 arasında [165]. Fibroin ve Alb-Fib kombinasyonlu partiküller ise pH 7'de en iyi boyut dağılımı göstermiştir [166].

Tablo 4-3. Farklı pH'larda oluşturulan nanopartiküllerin boyut dağılımı ve yüzey yükü sonuçları

| Partikül     | pH | Boyut(nm) |       |       | Zeta(mV) |       |       | pDI   |       |       |
|--------------|----|-----------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Albumin      | 7  | 127,3     | 127,4 | 126,2 | -20,3    | -21,2 | -20,7 | 0,07  | 0,065 | 0,107 |
|              | 8  | 115,1     | 115,6 | 114   | -16,2    | -15,8 | -15,4 | 0,116 | 0,116 | 0,157 |
|              | 9  | 102,8     | 101,8 | 101   | -19,2    | -20,1 | -20,1 | 0,12  | 0,116 | 0,133 |
|              | 10 | 108,6     | 107,5 | 107   | -16,8    | -17,7 | -16,0 | 0,121 | 0,147 | 0,122 |
| Fibroin      | 7  | 456,5     | 395,6 | 438,4 | -14,2    | -14,2 | -12,8 | 0,7   | 0,491 | 0,68  |
|              | 8  | 564       | 540   | 555   | -12,9    | -13,3 | -14,0 | 0,653 | 0,567 | 0,59  |
|              | 9  | 670       | 665   | 683   | -13,7    | -13,7 | -13,8 | 0,419 | 0,262 | 0,316 |
|              | 10 | 713,7     | 996,4 | 745,5 | -13,9    | -15,6 | -15,0 | 0,882 | 0,695 | 0,724 |
| Alb-Fib(1:1) | 7  | 119,8     | 120   | 128,9 | -14,9    | -14,8 | -17,6 | 0,162 | 0,152 | 0,144 |
|              | 8  | 172,6     | 152,8 | 220,4 | -13,9    | -15,3 | -15,1 | 0,533 | 0,513 | 0,506 |
|              | 9  | 525,9     | 653,5 | 441,9 | -15,5    | -15,6 | -15,8 | 0,667 | 0,826 | 0,586 |
|              | 10 | 551       | 434,5 | 256,2 | -14,1    | -13,1 | 15,8  | 0,559 | 0,463 | 0,399 |
| Alb-Fib(2:1) | 7  | 160,8     | 241,3 | 273,8 | -19,0    | -19,0 | -17,5 | 0,517 | 0,548 | 0,568 |
|              | 8  | 258,3     | 280,1 | 289,1 | -16,7    | -14,8 | -19,6 | 0,562 | 0,519 | 0,533 |
|              | 9  | 543,9     | 485,5 | 492,4 | -13,8    | -16,1 | -16,3 | 0,64  | 0,714 | 0,605 |
|              | 10 | 590,2     | 599,7 | 567,8 | -19,9    | -15,4 | -16,0 | 0,559 | 0,523 | 0,394 |
| Alb-Fib(1:2) | 7  | 314,5     | 271,1 | 279,5 | -18,8    | -18,4 | -18,5 | 0,541 | 0,732 | 0,691 |
|              | 8  | 431,3     | 397,2 | 369,8 | -13,6    | -15,0 | -14,8 | 0,563 | 0,531 | 0,416 |
|              | 9  | 325,4     | 237,7 | 396,4 | -11,4    | -11,6 | -10,6 | 0,949 | 1     | 1     |
|              | 10 | 512,1     | 612,7 | 372,7 | -14,5    | -14,8 | -13,9 | 0,852 | 0,75  | 0,747 |
| Serisin      | 7  | 540,5     | 523   | 547,3 | -21,8    | -21,5 | -20,9 | 0,379 | 0,351 | 0,348 |
|              | 8  | 546,4     | 554,5 | 524,6 | -25,4    | -25,1 | -25,0 | 0,202 | 0,188 | 0,241 |
|              | 9  | 448,9     | 456,6 | 460,8 | -13,1    | -14,0 | -13,1 | 0,108 | 0,184 | 0,196 |
|              | 10 | 573,5     | 591,7 | 644,3 | -26,7    | -27,9 | -27,6 | 0,232 | 0,205 | 0,238 |
| Alb-Ser(1:1) | 7  | 155,6     | 153,6 | 149,2 | -16,2    | -17,0 | -16,1 | 0,239 | 0,179 | 0,144 |
|              | 8  | 140,7     | 135,1 | 134,5 | -13,1    | -13,9 | -13,9 | 0,205 | 0,181 | 0,169 |
|              | 9  | 128,3     | 127,6 | 125,4 | -18,0    | -17,6 | -18,7 | 0,113 | 0,121 | 0,117 |
|              | 10 | 190,2     | 189,5 | 186,3 | -20,4    | -21,3 | -20,0 | 0,045 | 0,023 | 0,038 |
| Alb-Ser(2:1) | 7  | 123,7     | 121,2 | 119,5 | -16,7    | -19,4 | 18,5  | 0,132 | 0,109 | 0,107 |
|              | 8  | 120,6     | 120,4 | 120   | -19,5    | -19,2 | -19,2 | 0,141 | 0,139 | 0,169 |
|              | 9  | 117,9     | 117,7 | 117,2 | -17,1    | -17,6 | -15,6 | 0,126 | 0,131 | 0,169 |
|              | 10 | 122,8     | 121,6 | 121,8 | -17,8    | -16,6 | -17,6 | 0,087 | 0,078 | 0,08  |
| Alb-Ser(1:2) | 7  | 188,4     | 187,1 | 187,5 | -19,9    | -19,7 | -20,3 | 0,064 | 0,043 | 0,088 |
|              | 8  | 143,5     | 144,1 | 147,6 | -16,2    | -16,9 | -16,7 | 0,061 | 0,031 | 0,056 |
|              | 9  | 141,1     | 145,5 | 140,3 | -14,5    | -15,5 | -15,4 | 0,11  | 0,151 | 0,073 |
|              | 10 | 211,3     | 216,9 | 214,9 | -25,3    | -24,4 | -24,6 | 0,04  | 0,018 | 0,054 |



Şekil 4-2 Farklı pH'larda sentezlenen nanopartiküllerin boyut dağılım grafiği

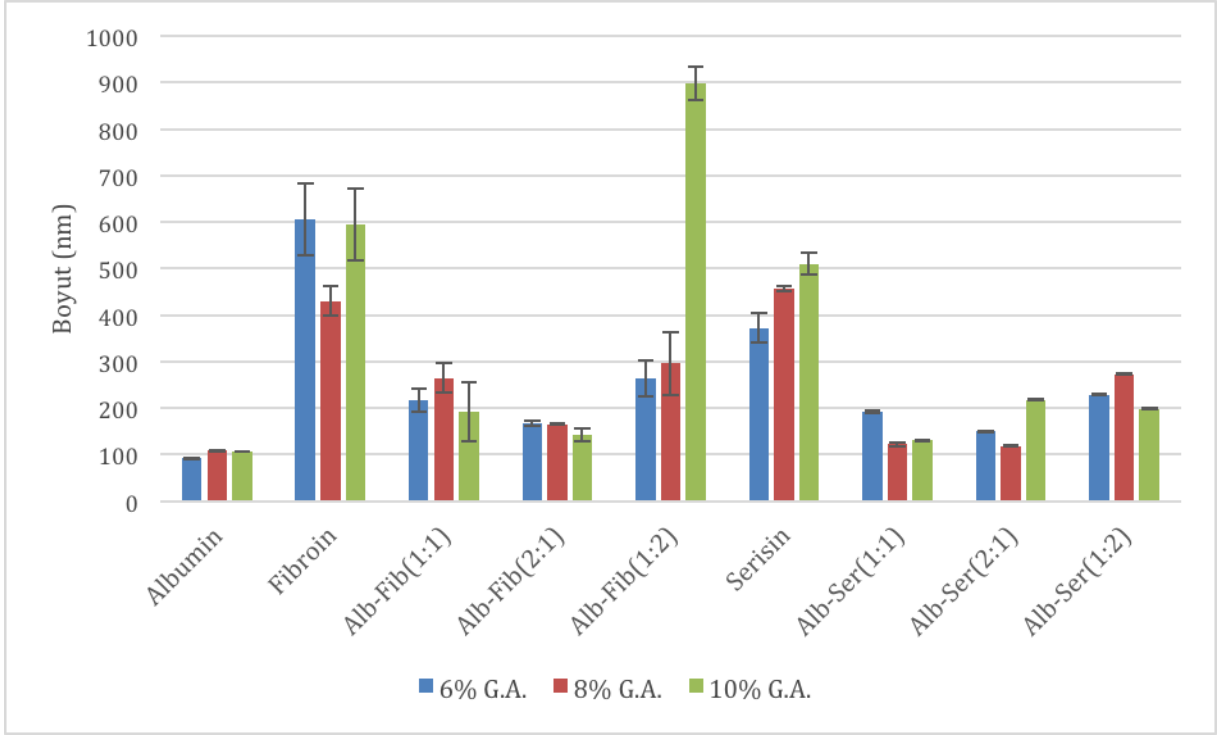
#### Çapraz Bağlayıcı Ajanın (%) Etkisi

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan Gluteraldehit (G.A) miktarı ise %6, %8 ve %10 olarak değiştirilmiş ve yine boyut analizleri Zeta sizer ile ölçülmüştür (n=3) (Tablo 4-4).

Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan gluteraldehit miktarı farklı formülasyonlarda farklı boyutlar göstermiştir (Tablo 4-4, Şekil 4-3). %6 lık G.A. hızlı bozunum sergilerken %10 G.A. ile çapraz bağlanan örneklerde toksisite sorunu ile birlikte salım sorunları yaşanacağı görülmüştür. Bu sebeple %8 G.A çapraz bağlayıcı oranı ile çalışma devam edilmiştir.

Tablo 4-4. Farklı çapraz bağlayıcı oranlarında oluşturulan nanopartiküllerin boyut ve yüzey yükü sonuçları

| Partikül      | G.A | Boyut(nm) |       |       | Zeta(mV) |       |       | pDI   |       |       |
|---------------|-----|-----------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Albumin       | %6  | 92,5      | 92,36 | 91,09 | -16,6    | -17,6 | -17,3 | 0,304 | 0,295 | 0,28  |
|               | %8  | 108,7     | 106,7 | 109,5 | -18,9    | -18,9 | -19,3 | 0,214 | 0,205 | 0,206 |
|               | %10 | 107,3     | 107,3 | 105,4 | -23,1    | -21,6 | -21,7 | 0,311 | 0,313 | 0,311 |
| Fibroin       | %6  | 590,9     | 538,6 | 689,4 | -14,1    | -14,5 | -14,5 | 0,74  | 0,688 | 0,624 |
|               | %8  | 456,5     | 395,6 | 438,4 | -14,2    | -14,2 | -12,8 | 0,7   | 0,491 | 0,68  |
|               | %10 | 636,8     | 505,5 | 643,9 | -14,3    | -13,9 | -13,8 | 0,809 | 0,681 | 0,967 |
| Alb-Fib (1:1) | %6  | 217,5     | 191,9 | 241,9 | -15,7    | -17,3 | -17,3 | 0,568 | 0,617 | 0,601 |
|               | %8  | 274,1     | 289,4 | 227,7 | -14,9    | -15,0 | -14,4 | 0,662 | 0,619 | 0,587 |
|               | %10 | 141,5     | 264,5 | 170,6 | -12,8    | -13,4 | -13,6 | 0,452 | 0,438 | 0,265 |
| Alb-Fib (2:1) | %6  | 162,4     | 172,2 | 166,2 | -16,3    | -16,3 | -15,5 | 0,476 | 0,564 | 0,483 |
|               | %8  | 161,6     | 164,5 | 165,5 | -14,5    | -15,2 | -16,6 | 0,287 | 0,307 | 0,309 |
|               | %10 | 129,6     | 142,3 | 157   | -16,9    | -17,4 | -17,0 | 0,385 | 0,416 | 0,379 |
| Alb-Fib (1:2) | %6  | 289,8     | 219   | 281,9 | -16,5    | -17,4 | -16,9 | 0,423 | 0,553 | 0,564 |
|               | %8  | 373,2     | 254,3 | 260,3 | -15,6    | -14,8 | -14,7 | 0,538 | 0,513 | 0,573 |
|               | %10 | 857,2     | 928,1 | 907,8 | -17,7    | -17,9 | -17,5 | 0,695 | 0,852 | 0,807 |
| Serisin       | %6  | 347       | 362,6 | 407,5 | -17,0    | -17,7 | -16,3 | 0,325 | 0,262 | 0,228 |
|               | %8  | 448,9     | 456,6 | 460,8 | -13,1    | -14,0 | -13,1 | 0,108 | 0,184 | 0,196 |
|               | %10 | 484,2     | 516,3 | 529,6 | -20,6    | -22,9 | -22,1 | 0,305 | 0,283 | 0,321 |
| Alb-Ser (1:1) | %6  | 188,3     | 195   | 193,4 | -20,4    | -21,5 | -17,7 | 0,003 | 0,002 | 0,009 |
|               | %8  | 123,3     | 122,6 | 122,1 | -14,7    | -15,3 | -14,9 | 0,046 | 0,042 | 0,052 |
|               | %10 | 130       | 130,4 | 128,9 | -14,0    | -13,7 | -13,7 | 0,042 | 0,062 | 0,064 |
| Alb-Ser (2:1) | %6  | 149,1     | 150,5 | 151,1 | -16,1    | -17,7 | -16,8 | 0,031 | 0,002 | 0,044 |
|               | %8  | 116,6     | 119,9 | 117,7 | -14,8    | -16,2 | -16,4 | 0,063 | 0,086 | 0,072 |
|               | %10 | 214,6     | 217,6 | 218,3 | -17,9    | -16,5 | -17,3 | 0,15  | 0,166 | 0,155 |
| Alb-Ser (1:2) | %6  | 227,9     | 228,1 | 230,4 | -26,0    | -25,4 | -25,7 | 0,004 | 0,026 | 0,04  |
|               | %8  | 273,8     | 271,6 | 270,2 | -22,7    | -22,7 | -23,4 | 0,189 | 0,201 | 0,192 |
|               | %10 | 198       | 198,9 | 196,3 | -27,0    | -26,6 | -26,2 | 0,052 | 0,035 | 0,002 |

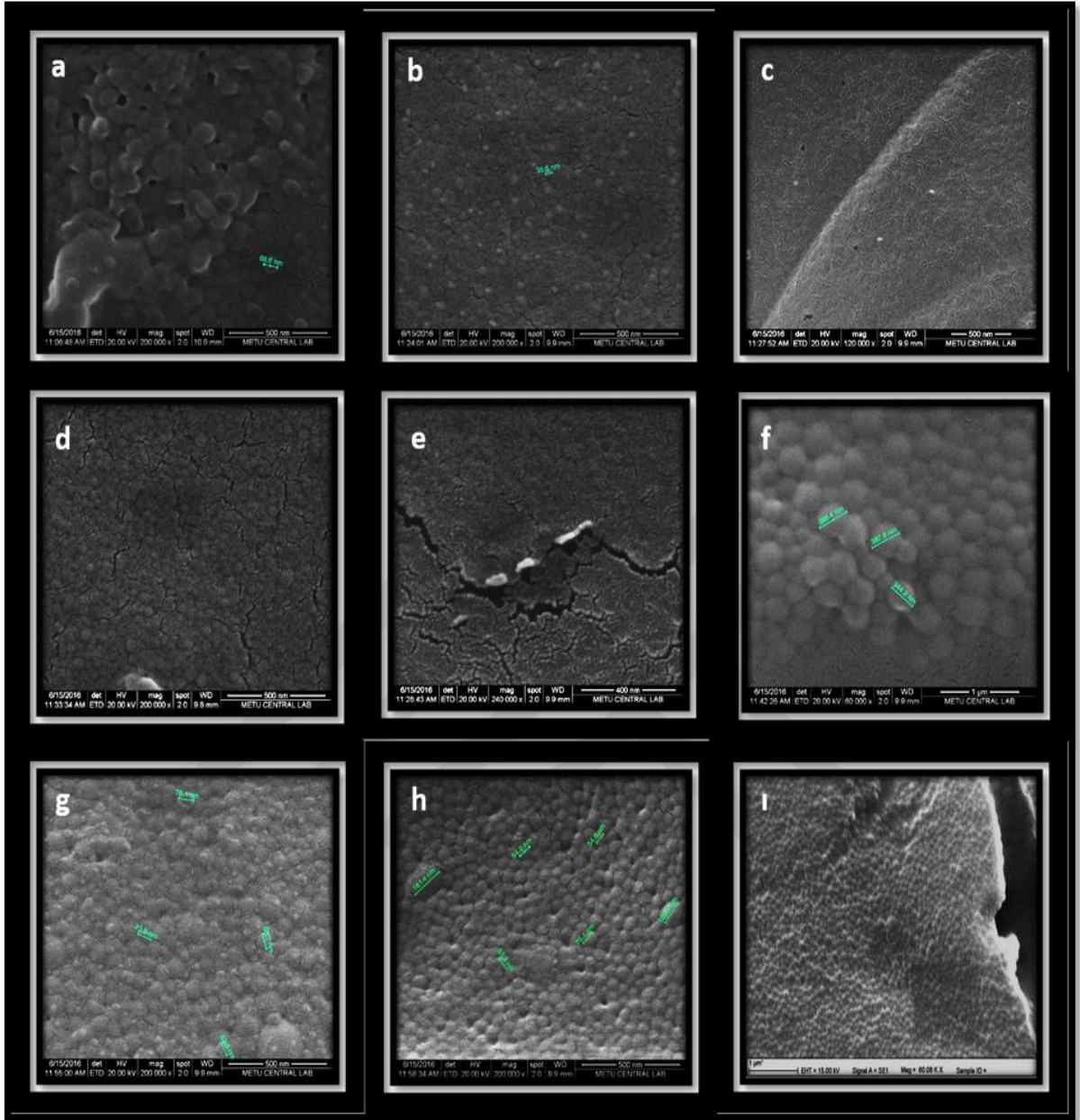


Şekil 4-3 Farklı çapraz bağlayıcı oranlarında sentezlenen nanopartiküllerin boyut dağılımı grafiği

#### 4.1.2 Morfolojik Analizler

Oluşturulan nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniğinden yararlanılmıştır. Elde edilen SEM görüntüleri, partiküllerin yüzey yapısının yanı sıra kesit yapısının da incelemesine imkân vermiştir.

Hazırlanan nanopartiküllerin SEM görüntüleri incelendiğinde, zeta sizer ile elde edilen boyutlar ile kıyaslandığında daha küçük partikül boyutları gözlenmiştir. Bunun nedeni Zeta sizer ölçümlerinin sıvı ortamda belirlendiği, SEM için ise kurutularak analizinden kaynaklanmaktadır. İki sonuç arasındaki en büyük farkın görüldüğü fibroin nanopartiküller yapısı itibari ile şişme özelliğinin baskın olmasındandır. SEM incelemesinde en iyi partikül yapılarının; albümin, serisin ve albümin-serisin formülasyonlu nanopartikülleri olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-4).

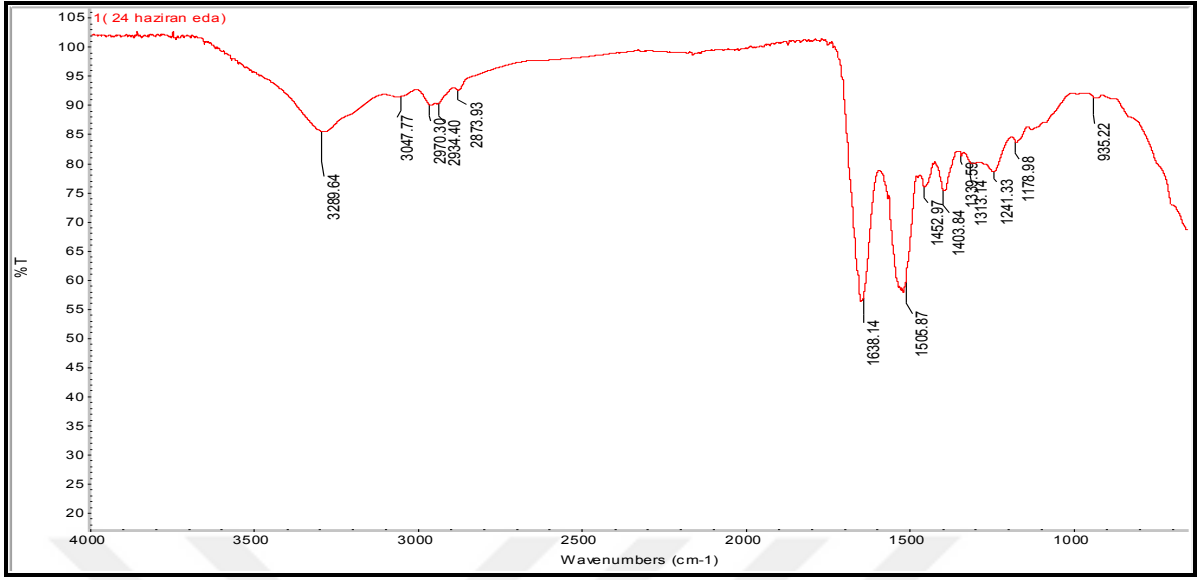


Şekil 4-4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri a) albümin Np b) fibroin Np c) albümin/fibroin (1:1) Np d) albümin/fibroin (2:1) Np e) albümin/fibroin (1:2) Np f) Serisin Np g) albumin/serisin (1:1) Np h) albumin/serisin (2:1) Np i) albumin/serisin (1:2) Np

#### 4.1.3 Nanopartiküllerin fizikokimyasal karakterizasyonları

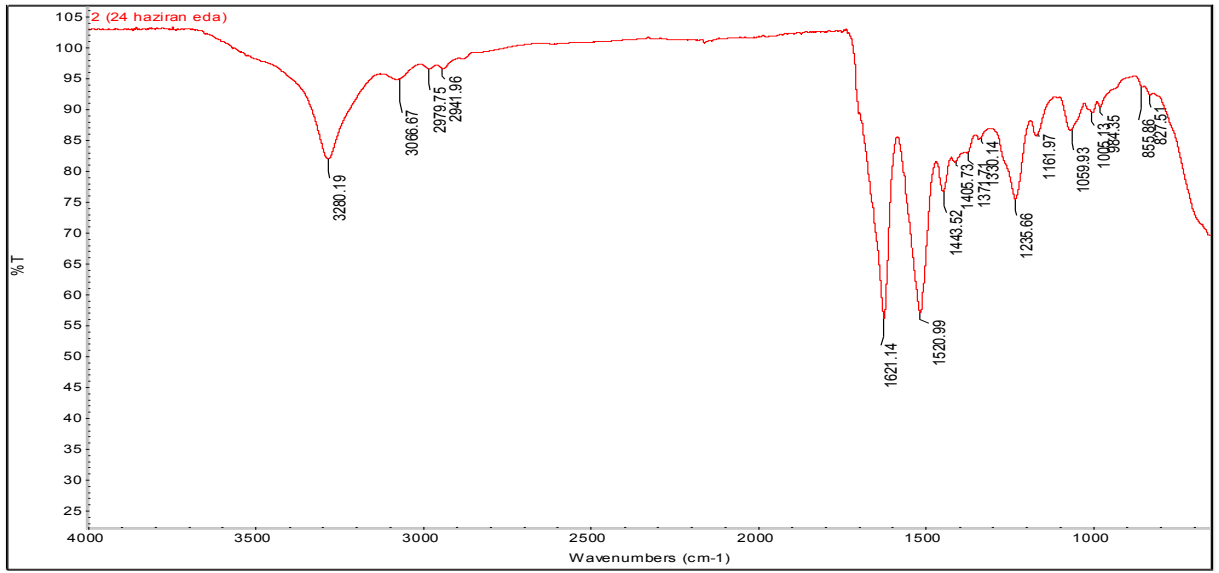
##### FTIR Analizi

Nanopartiküllerin sahip oldukları kimyasal yapıları belirlemek için Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR) (Nicolet iS10, ABD) ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları değerlendirilmiş, test edilen örneklerin içerdikleri fonksiyonel gruplar ve yapıdaki bağların durumu belirlenerek planlanan kimyasal yapıya ulaşip ulaşmadığı incelenmiştir.



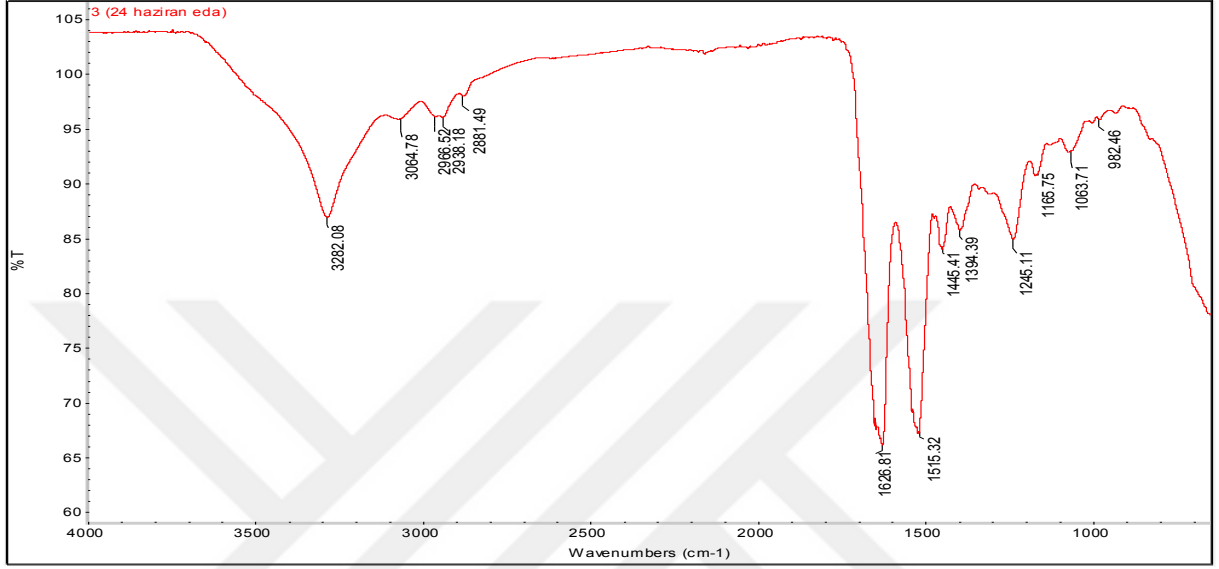
Şekil 4-5 Albumin nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

Şekil 4-5'deki albumin nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda 3289 cm<sup>-1</sup>'de görülen pik NH gerilme pikidir. Amin-amid grupları 3300-3500 cm<sup>-1</sup> arasında orta şiddetli pikler vermektedir. 1640cm<sup>-1</sup>'deki pik C=O gerilemesine ait ve amid-I bantlarında görülen pike karşılık gelmektedir. 1600-1400cm<sup>-1</sup> arasında bulunan pikler aromatik yapılara ya da NO<sub>2</sub> ye ait piklerdir. Protein ve polipeptitlerin karakteristik yapılarında amid-I ve amid-II bantları mevcuttur ve bu iki bant örnekte görülmektedir.



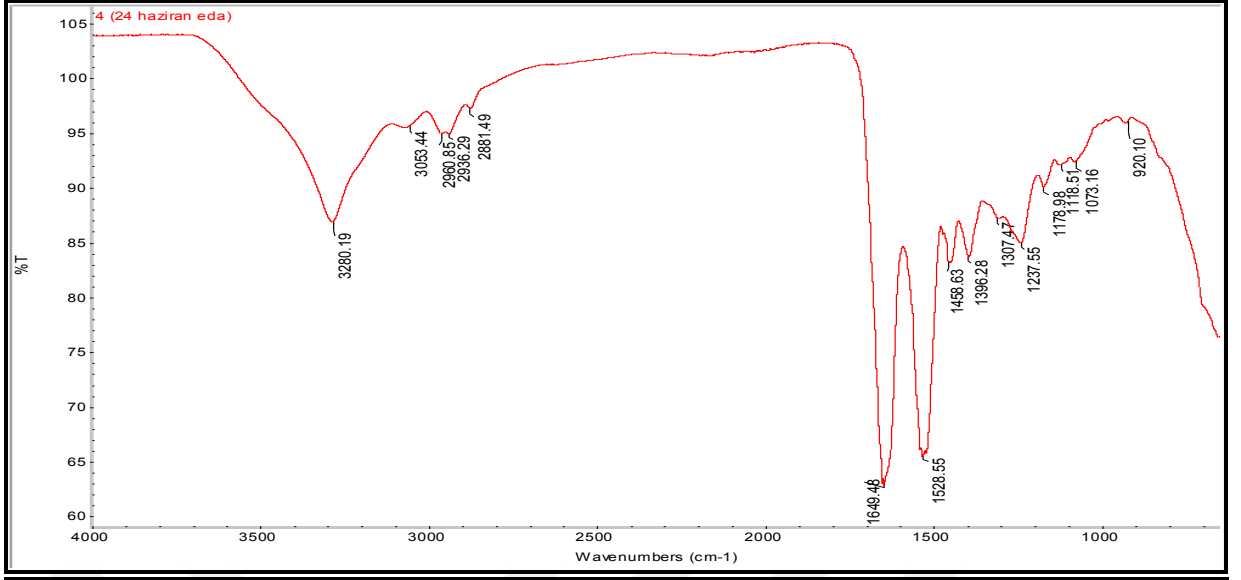
Şekil 4-6 Fibroin nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

Şekil 4-6'da görülen Fibroin nanopartiküllerin FT-IR spectrumundaki  $1620\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik amide-I'e,  $1520\text{ cm}^{-1}$ 'deki amid-II ye ve  $1235\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik ise amid-III e aittir.  $3280\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik N-H bağından gelen gerilme pikidir. Buna göre yapıda fibroinin karakteristik pikleri tespit edilmiştir.



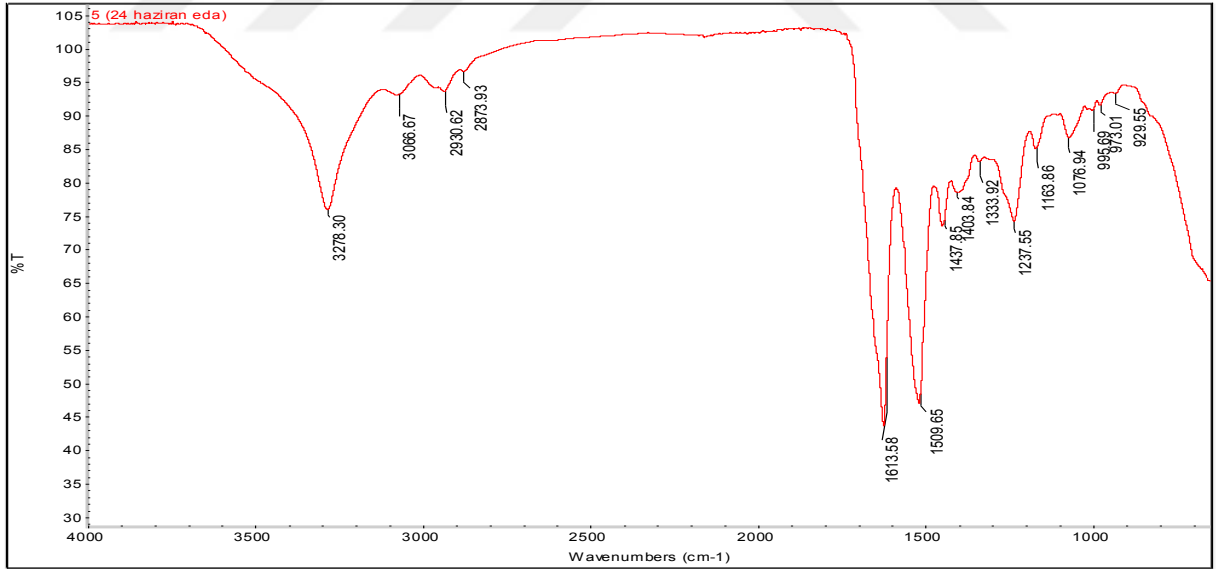
Şekil 4-7 Alb-Fib (1:1) nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

Albumin ve fibroin nanopartiküllerin FT-IR spektrumlarına (Şekil 4-7) bakılarak alb-fib (1:1 w/w) nanopartiküllerin spektrumları karşılaştırdığımda  $1621\text{ cm}^{-1}$ 'deki bandın  $1626\text{ cm}^{-1}$ 'ye,  $1235\text{ cm}^{-1}$  teki pikin ise  $1245\text{ cm}^{-1}$ 'e ve  $3282\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikin  $3280\text{ cm}^{-1}$ 'e kayması albumin ve fibroinin etkileştiği sonucunu getirmiştir.



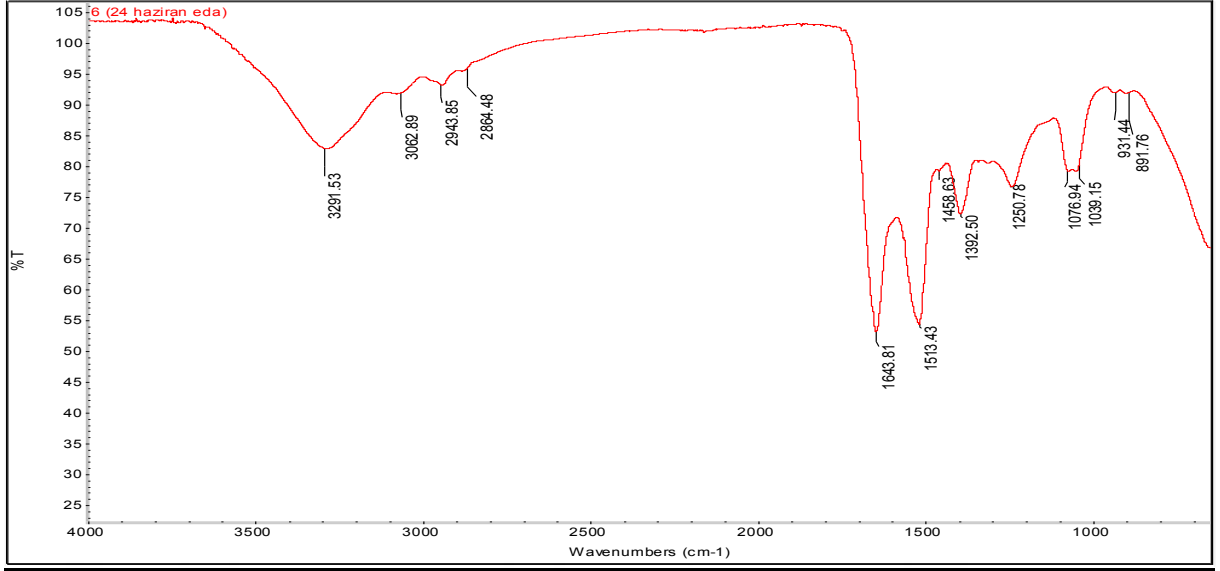
Şekil 4-8 Alb-Fib (2:1) nanopartiküllerin FT-IR spektrum

1600-400  $\text{cm}^{-1}$  aralığındaki piklerin ortalama 10-13  $\text{cm}^{-1}$  kaydı olduğu gözlemlenmiştir. Bunun nedeni albümine bağlanmanın daha etkili olması olarak yorumlanmıştır (Şekil 4-8).



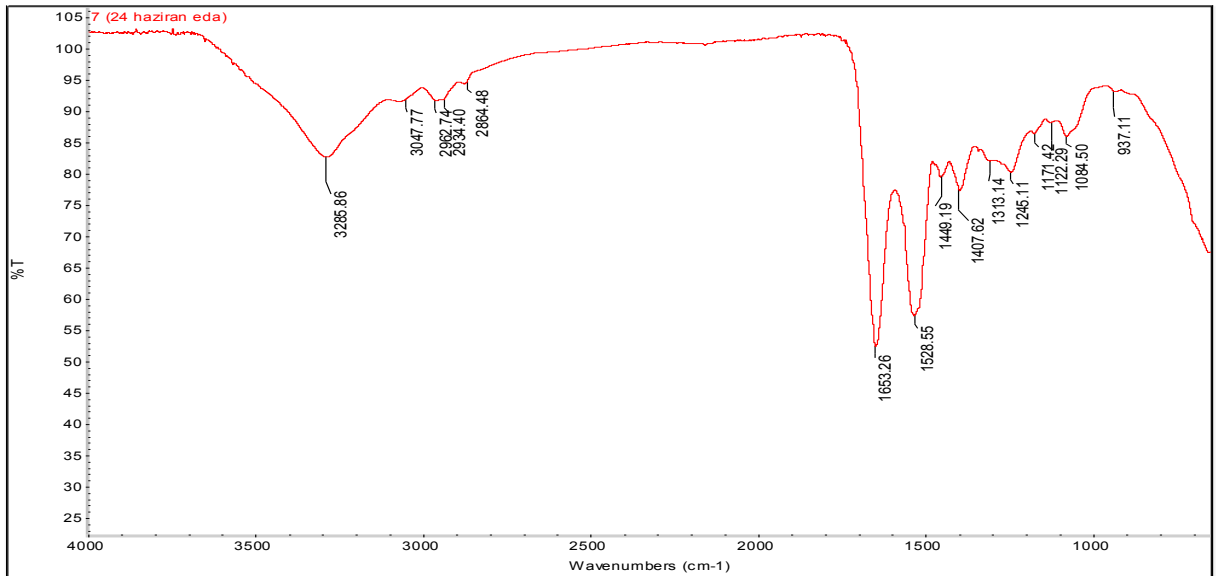
Şekil 4-9 Alb-Fib (1:2) nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

Farklı kombinasyonlardaki albümin- fibroin (1:1, 1:2, 2:1 w/w) nanopartiküllerde görülen bant kaymaları çoğunlukla amid-I bölgesinde gözlenlemiştir. En şiddetli pik ise alb-fib (2:1 w/w) oranlı nanopartiküllerde gözlenmiştir.



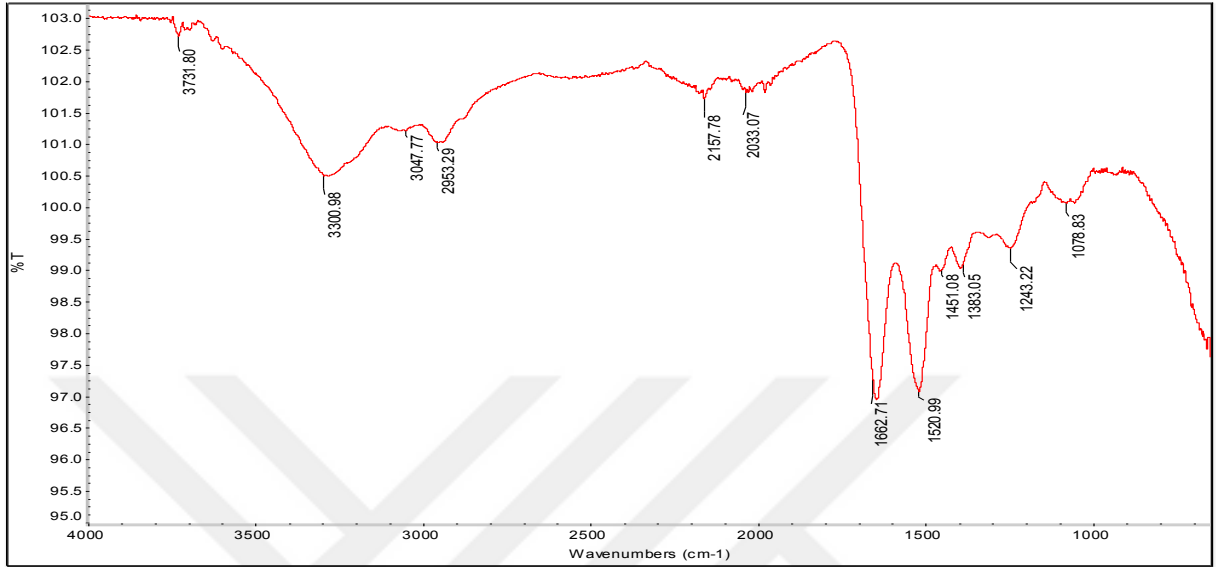
Şekil 4-10 Serisin nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

Proteinlere özgü karakteristik titreşim bantları  $1630\text{ cm}^{-1}$ - $1650\text{ cm}^{-1}$  arasında amid-I bantlarıdır ve C-O gerilmesinden kaynaklı olarak meydana gelmektedir. Yapıda da  $1643\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik amid-I'e aittir.  $1540\text{ cm}^{-1}$ - $1510\text{ cm}^{-1}$  civarı pikler amid-II gurubu olarak adlandırılır ve yine proteinlere özgü N-H gerilimlerinden kaynaklı karakteristik piklerdir. Görülen pik C-N yada N-H fonksiyonel gruplarından amid-III bantlarında gözlenir (Şekil 4-10).



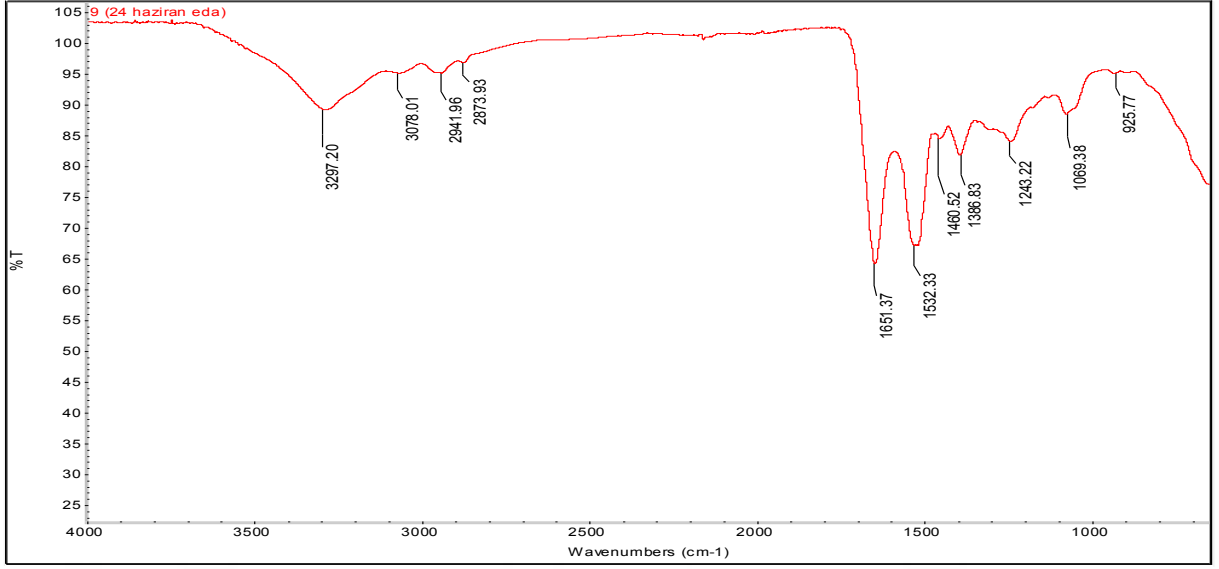
Şekil 4-11 Alb-Ser (1:1) nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

Serisin nanopartiküllerin spectrumlarından farklı olarak Alb-ser (1:1) partiküllerinde pikler ortalama  $10\text{ cm}^{-1}$  kaymalar görülmüştür. Bu doğrultuda albumin ile serisin proteinlerin etkileşerek partikül oluşturdıkları gözlenmiştir (Şekil 4-11).



Şekil 4-12 Alb-Ser (2:1) nanopartiküllerin FT-IR spektrum

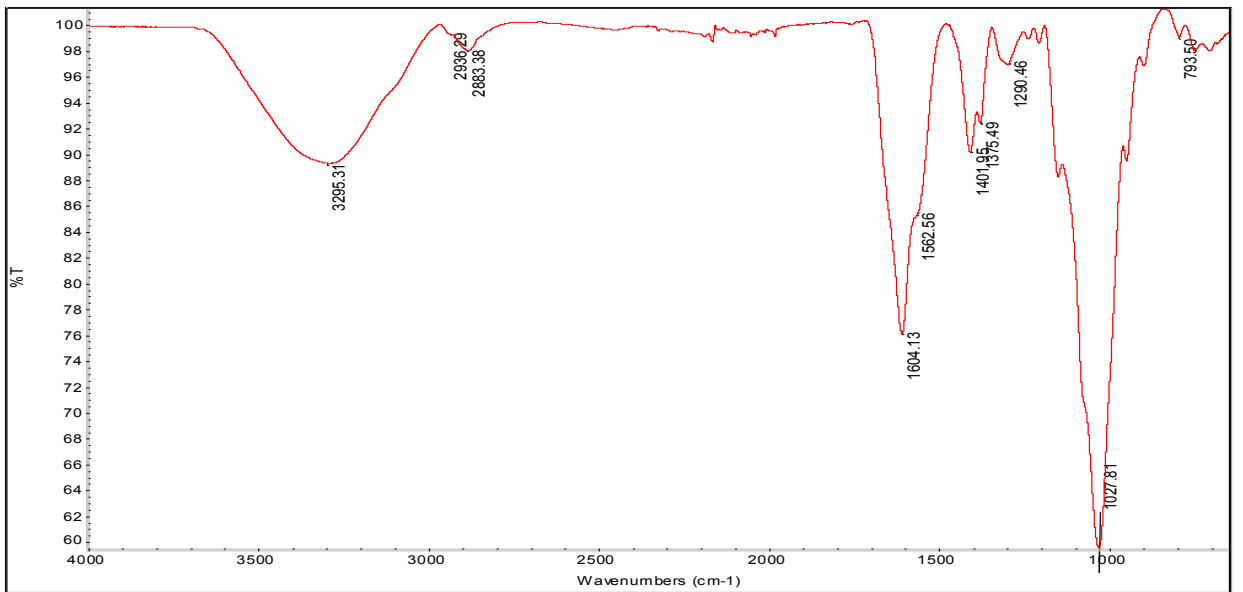
$1650\text{ cm}^{-1}$  civarındaki pik amide-I bandına aittir. C=O bağı gerilme titreşiminden kaynaklı peptid bağları bu bölgede pik vermektedir. Benzer şekilde  $1520\text{ cm}^{-1}$  deki pik N-H bükülme ve C-N gerilme titreşimine ve  $1240\text{ cm}^{-1}$  civarındaki bant ise C-N gerilme ve N-H bükülme titreşiminden kaynaklı amide-I ve amide-II bandıdır.  $3300\text{ cm}^{-1}$  yakınlarındaki pik ise N-H gerilmesi ve  $1450\text{ cm}^{-1}$  deki pikler ise protein zincirlerindeki COO- a ait piklerdir.  $1662\text{ cm}^{-1}$  deki pik albumin-serisin bağlanması sebebi ile beta karbonlarının dönmesinden dolayı ortaya çıkmıştır (Şekil 4-12).



Şekil 4-13 Alb-Ser (1:2) nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

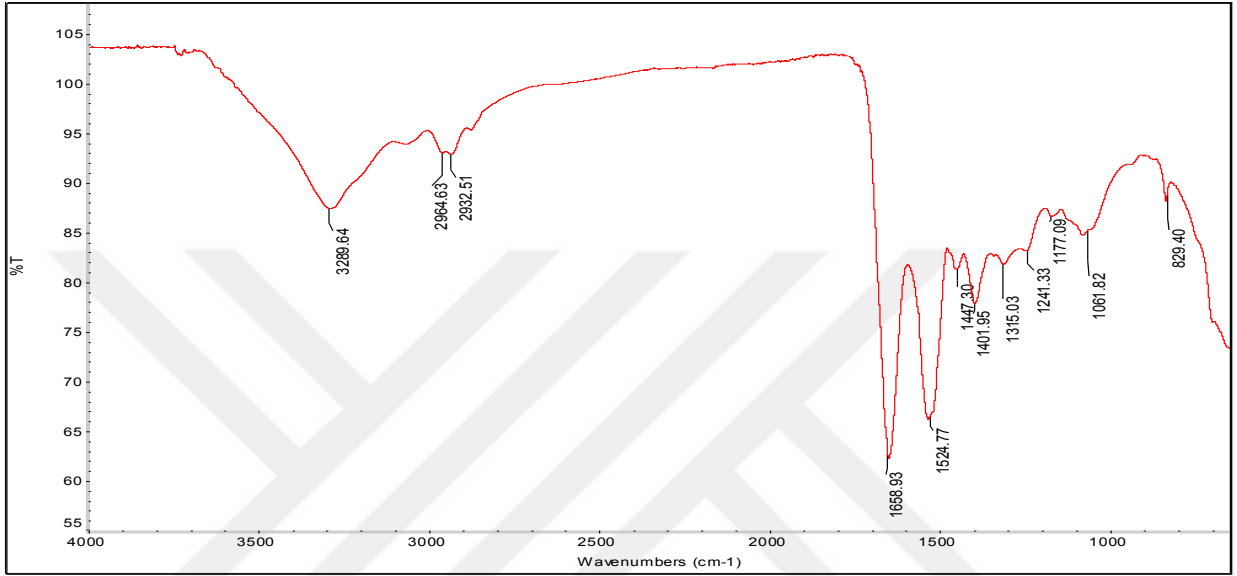
Albumin-Serisin nanopartiküllerinin (1:1 w/w) ve (1:2 w/w) arasındaki fark  $3\text{ cm}^{-1}$  ile  $5\text{ cm}^{-1}$  arası bir kayması olarak gözlenmiştir (Şekil 4-13). Bu veri doğrultusunda nanopartikül sentezi sırasında yapıya fazla eklenen serisin yapıya daha az katıldığı sonucunu çıkartmaktadır.

Partiküllere HA ligandının bağlanmasının tayini ise yine FTIR ile yapılmıştır. Farklı tamponlar ile yapılan bağlama çalışmalarının FTIR sonuçları Şekil 4-14, 4-15, 4-16, ve 4-17'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



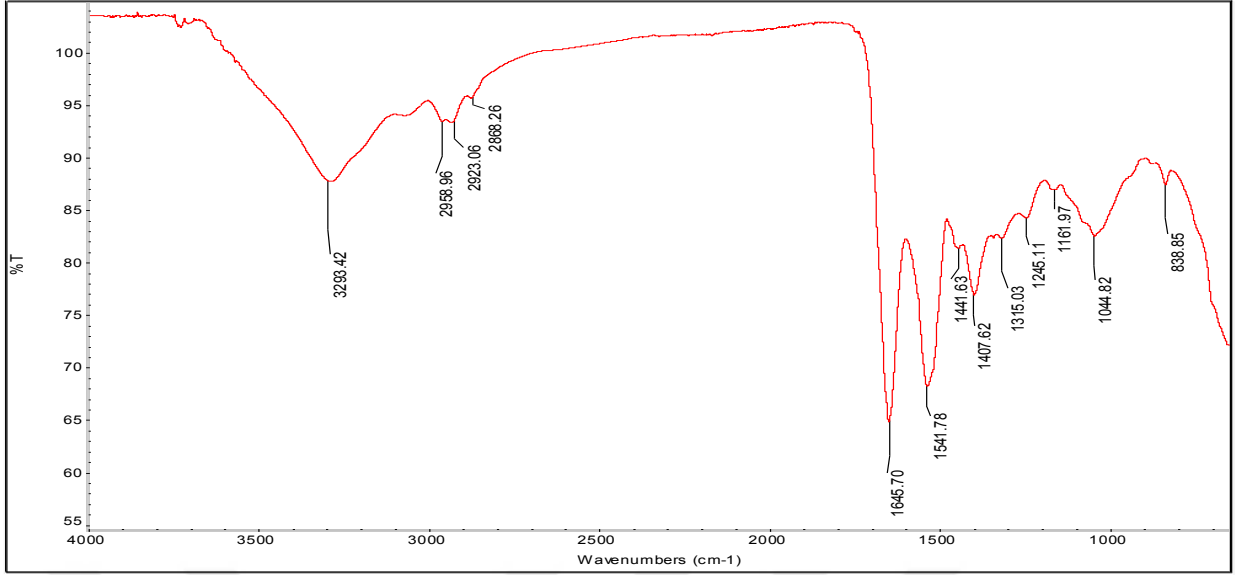
Şekil 4-14 Hyaluronik asit (HA) FTIR spektrumu

HA'ya ait FTIR spektrumu (Şekil 4-14) incelendiğinde 3295'deki yayvan ve geniş pik O-H'a , 1600'daki keskin pik Amit –I bandına, alfa helix yapı içindeki N-H gerilmesi olduğu düşünülmektedir. 1500'deki pik ise karboksil grubuna ait olan piktir. 1500-1400 gibi pikler ise aromatik zincire; 1020  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik ise C-O gerilmesine ait piktir.

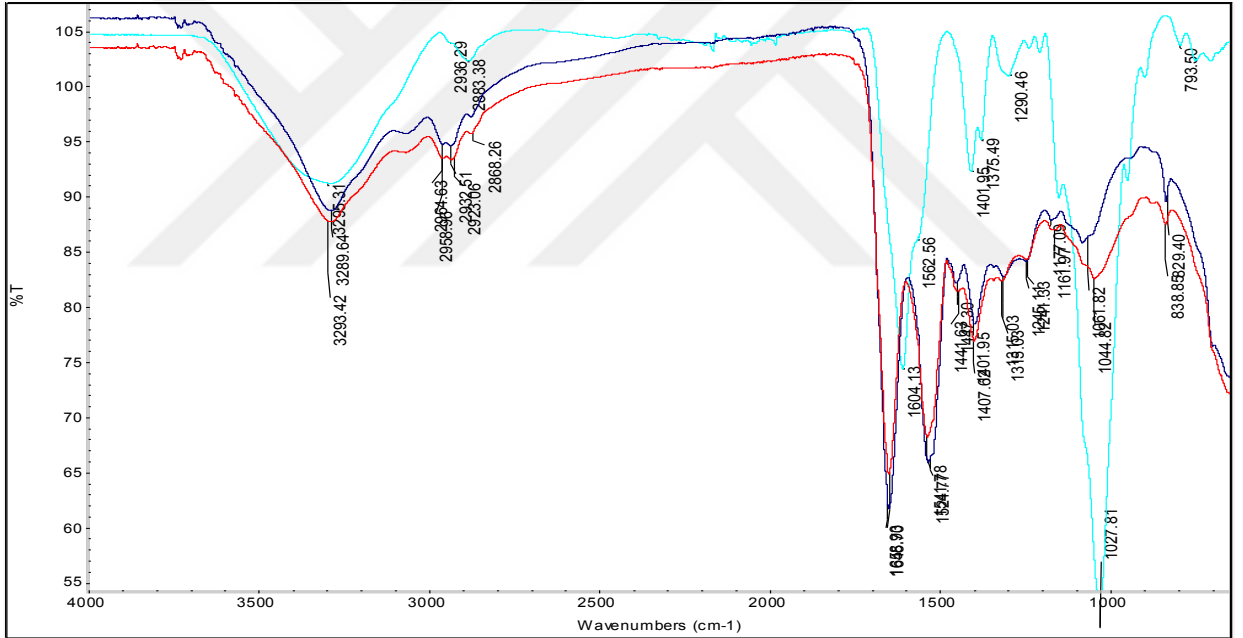


Şekil 4-15 Karbonat tamponunda hazırlanan HA-Alb-Ser(2:1) Np'lerin FTIR spektrumu

Şekil 4-15'e bakıldığında 3289'daki pik; alifatik primer aminden gelen N-H gerilmesine ait orta şiddette bir piktir. 2900'lerdeki pik yine amin tuzlarından kaynaklıdır. Şekilde görüldüğü üzere 1600'deki pik birincil aminden gelen C=O piki şiddetli bir şekilde çıkarmaktadır. 1440'taki pik karboksilden gelen O-H gerilmesinin olduğu düşünülmektedir. 1300'lerdeki pik aromatik gruplardan gelir ve genelde C-O bağına karşılık gelmektedir. 820'deki pik 1,2,4 trisubstüe C-O gerilmesine aittir. Karbonatın ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) dimeri 810-820 arasında pik vermektedir.



Şekil 4-16 Borat tamponunda hazırlanan HA-Alb-Ser(2:1) Np'lerin FTIR spektrumu



Şekil 4-17 Hyaluronik asit, karbonate ve borat tamponunda hazırlanan nanopartiküllerin çakışık FTIR spektrumu (en soldan yukardan aşağı sırasıyla; karbonat tamponunda hazırlanan HA-Alb-Ser(2:1) Np, Hyaluronik asit, Borat tamponunda hazırlanan HA-Alb-Ser(2:1) Np)

Borat tamponunda bağlanan HA-Np ile karbonat tamponunda bağlanan HA-Np arasında çok önemli bir fark gözlenmezken karbonat tamponunda hazırlanan örneklerde HA piki daha şiddetli görülmüştür. İki tamponda da HA bağlanması mevcuttur. 1400'teki piklerin üçlü ayrımı (1500-1300 arası) B-O asimetrik eğilmesi daha zayıf bir şekilde ortaya çıkmıştır. Yani karbonat tamponlu ortamda ayrılma

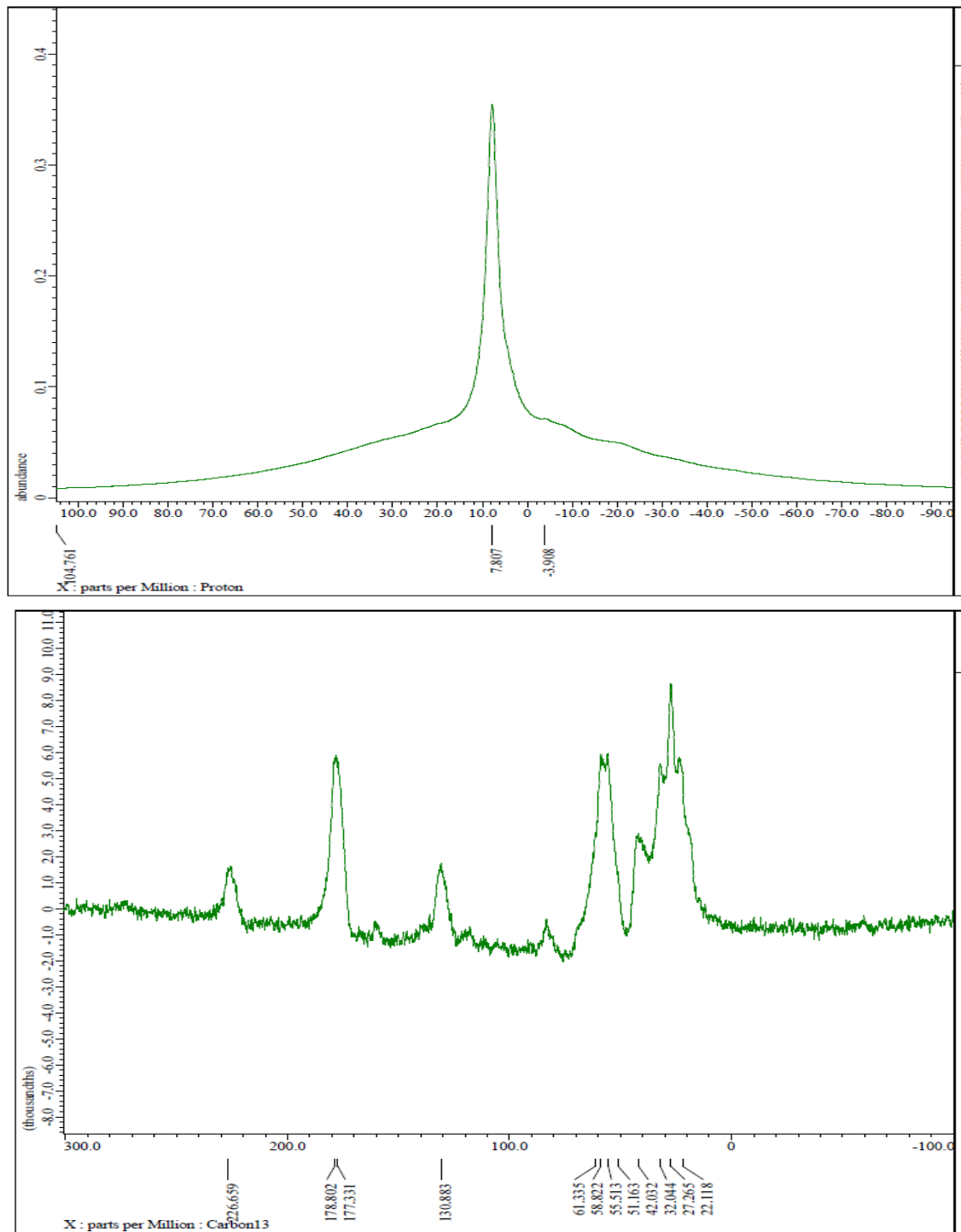
daha net görünmüştür. Bu sebeple bundan sonraki HA ligandının bağlanması karbonat tamponunda sürdürülmüştür.

### NMR Analizi

Hazırlanan karışım nanopartikülerinin yapısal özelliklerini belirlemek için NMR yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan malzemelerin organik yapılar olması sebebiyle tercih edilen bu yöntem ile karışım yapılarının oluşturulduğu ispatlanmıştır. Ancak kullanılan her üç malzemenin de protein yapıda olması ve kimyasal olarak benzer yapılara sahip olması yorumlamalarda dikkate alınmıştır.

Örneklerimiz için  $^1\text{H}$  NMR spektrumları JNM-ECZ500R/S1 cihazında 500 MHz te herhangi bir solvent olmadan 3,2 mm çaplı tüpler içinde 32 tarama ile 310-313 K'da, durulma zamanı 5ms,  $^{13}\text{C}$ -NMR dataları yine aynı cihazda alb-fib (1:1 ve 2:1 w/w) için sırası ile 880 ve 904'de diğer örnekler için ise 1024'de tarama yapılmıştır. Taramalar ile herhangi bir solvent olmadan 3,2 mm çaplı tüpler içinde alınmıştır.

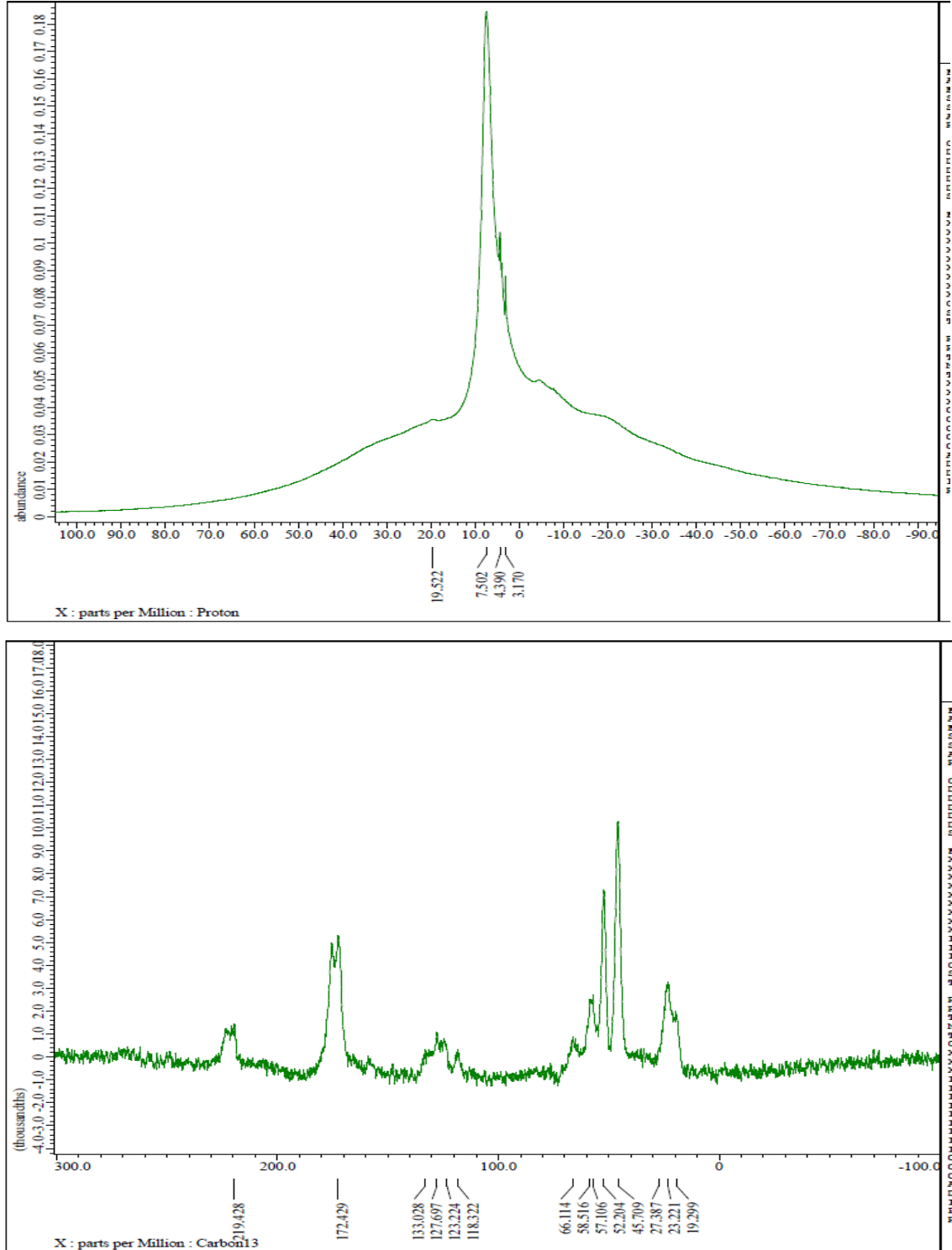
Toplam kan serumunun yaklaşık %60'ı albüminden oluşur ve 66.5 kDa ağırlığıdadır. NMR methodu çözücü içindeki protein yapılarını tanımlamada oldukça etkili bir yöntemdir. Fakat ağırlığı 15 kDa tan büyük protein moleküllerinin analizlerinde sorunlar çıktığı için katı NMR uygulmasına gidilmiş ve örnekler herhangi bir çözücüde çözünmeden analiz edilmiştir.



Şekil 4-18 Albumin nanopartiküllerin a) <sup>1</sup>H-NMR ve b) <sup>13</sup>C-NMR Spektrumları

Albumin nanopartiküllerin H-NMR'ındaki yaklaşık 7 ppm civarında görülen keskin pik (Şekil 4-18a) alifatik bölgeye aittir. Aynı örneğin C-NMR sonuçlarına baktığımızda, 22,27,32 ppm'de görülen birleşik pik N-terminalleri amino gruplarından kaynaklı 60-220 ppm'dekiler ise karakteristik amide bandları, 130'daki C-N terminaleri

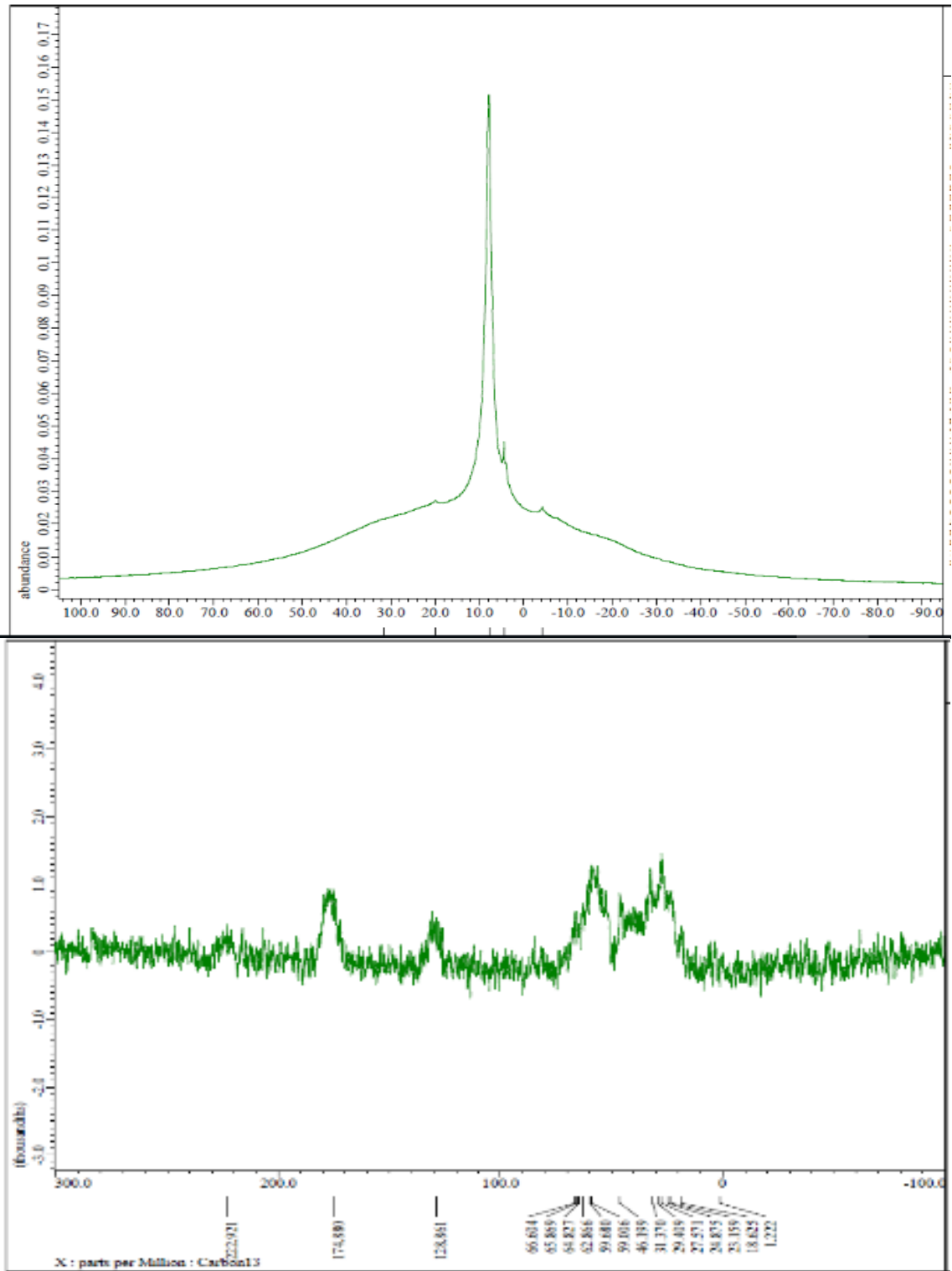
arasındaki ikili katlanmış bölgeye ait olduğu düşünülmekte olup 200-150 ppm arası C=O bölgesini karakterize etmektedir (Şekil 4-18).



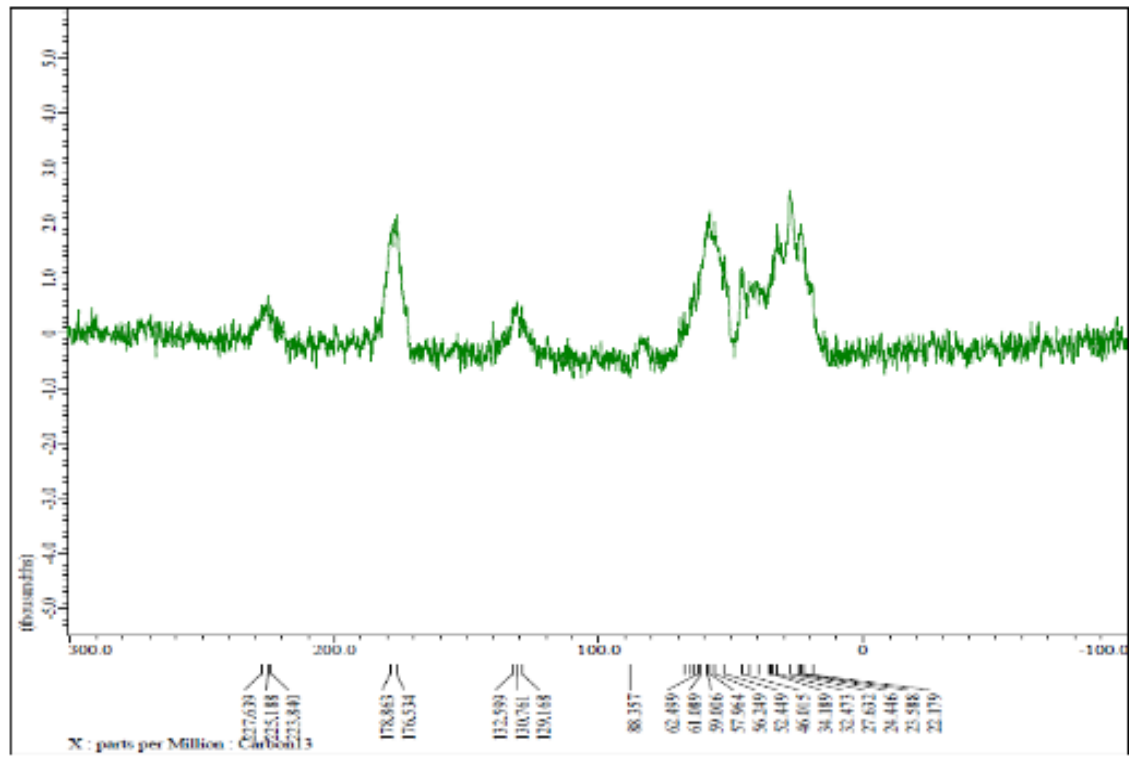
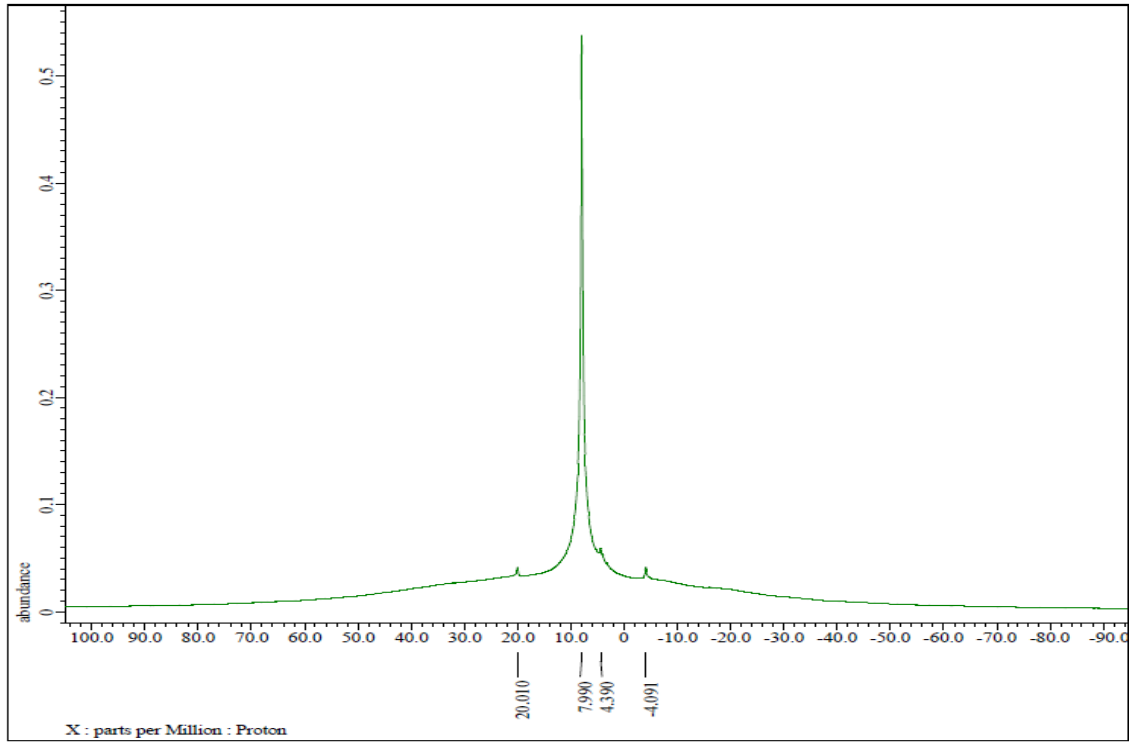
Şekil 4-19 Fibroin nanopartiküllerin a) <sup>1</sup>H-NMR ve b) <sup>13</sup>C-NMR Spektrumları

Fibroin nanopartiküllerin H-NMR sonuçlarında 3.1 deki pik (Şekil 4-19a ), c-alfa ve c-beta'nın etkileşiminden kaynaklı olarak yapıdaki CH<sub>2</sub> ye bağlı F, Cl, OH yada

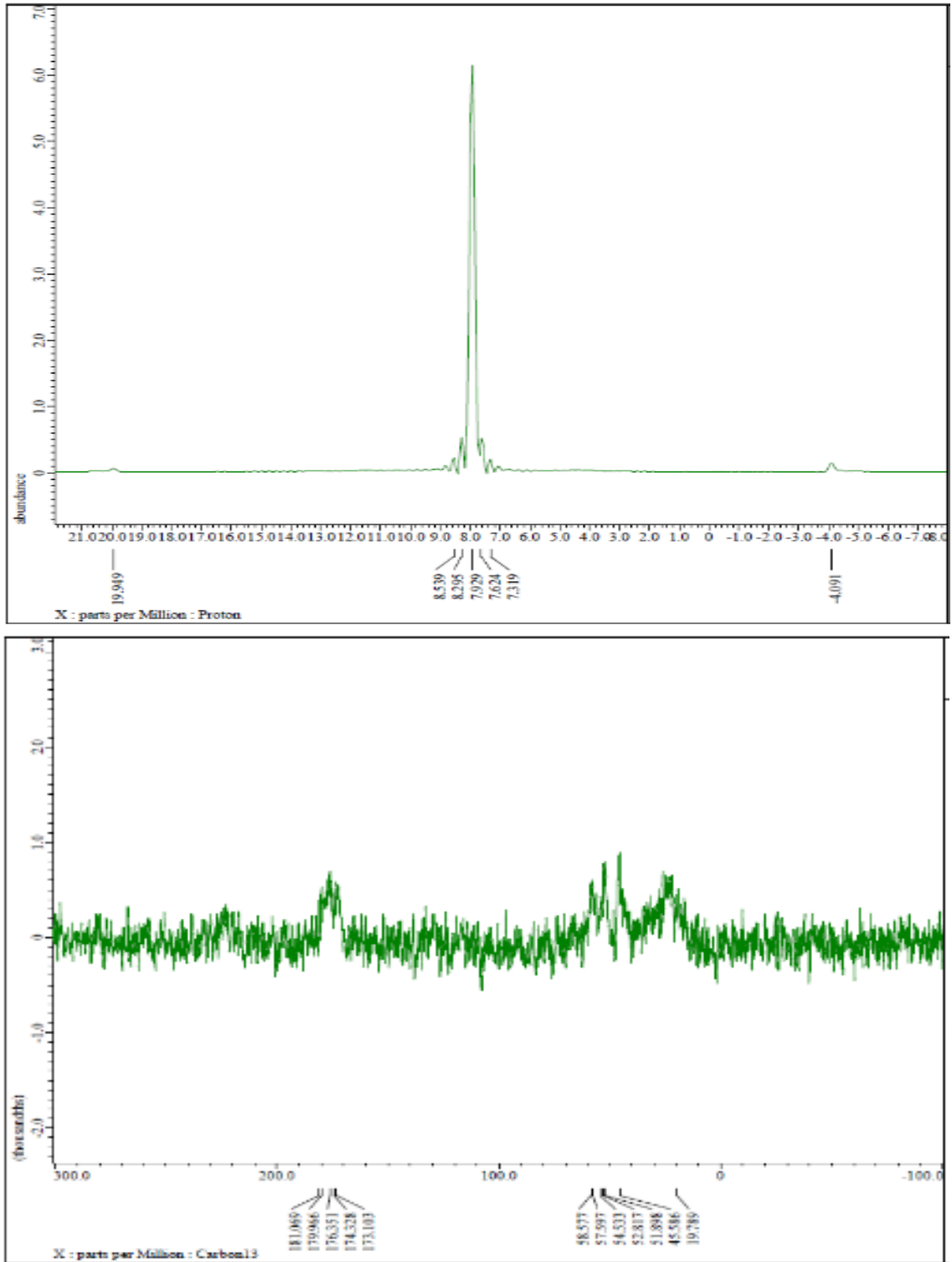
aromatik yapılardan gelir. Bu da biyomoleküllerde triosinden gelen piktir. 19 ppm'de omuzlu yapıdaki pik ise R-COOH gruplarından gelmektedir. Normalde 12 ppm civarında iken kimyasal kaymaya uğradığından 19'a çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Kimyasal kayma; molekül içi etkenler yada moleküller arası etkenler ( H bağı, asitlik, hibritleşme, sıcaklık) sebebi ile proton etrafındaki elektron yoğunluğu değiştiğinde ortaya çıkmaktadır. Fibroinin yapısında Gly, L-Ala, L-Ser, L-T~, ve L-Val vardır. 23 ppm'e bağlı olarak 19 ppm de görülen omuzlu yapı fibroin içinde bulunan L- alanine ait olabileceği düşünülmektedir. 45 ppm'deki glisinin C alfasına , 170 ppm de gördüğümüz pik C=O bağlarına (tüm bileşenler için) , 58 ppm de ki pik L-serisinin alfa karbonuna ait, örneğin 172 deki pik ala-gly-ser sekansındaki glisinin C=O çift bağından gelmektedir (Şekil 4-19).



Şekil 4-20 Alb-fib (1:1 w/w) partiküllerinin a)  $^1\text{H}$ -NMR ve b)  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrumları



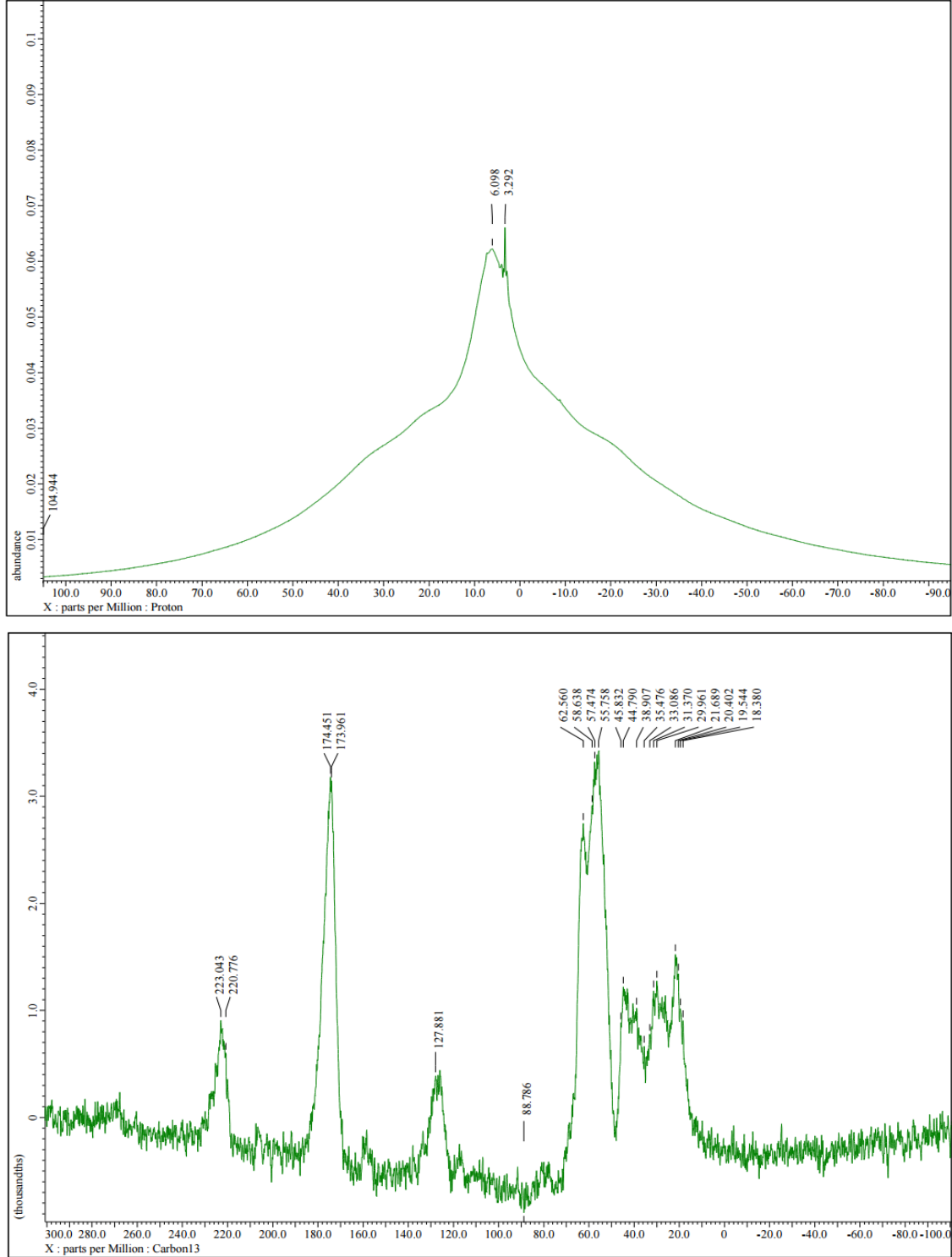
Şekil 4-21 Alb-fib (2:1 w/w) partiküllerinin a) 1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları



Şekil 4-22 Alb-fib (1:2 w/w) partiküllerinin a)  $^1\text{H}$ -NMR ve b)  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrumları

Proton NMR sonuçlarında ise Alb-Fib nanopartikülleri (1:1, 2:1, 1:2 w/w) (Şekil 4-20, 4-21, 4-22) örnekleri birlikte değerlendirildiğinde 1:2 oranındaki örneğin daha keskin ve yüksek çözünürlükte pik verdiğini görülmesine rağmen 2:1 oranının base line daha düzgün ve pik şiddeti 1:1 oranına kıyasla oldukça yüksek

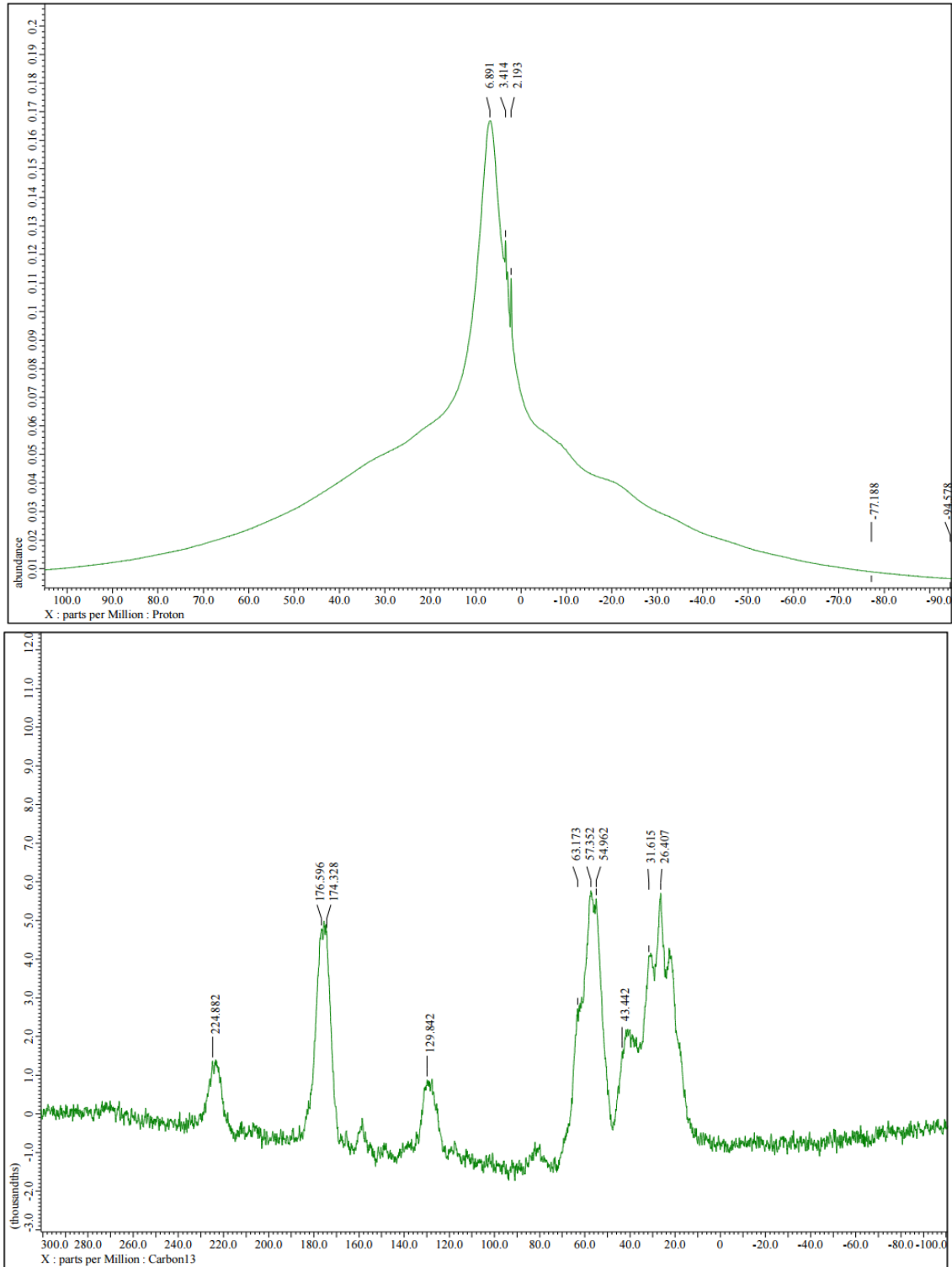
görülmüştür. 2:1 oranlı örnek için 7 ppm'deki pik albuminden kaynaklı bir pik iken 3 ppm ve 20 ppm'deki pikler fibroinden gelmektedir. Farklı oranlarda etkileşime sokulan albümin ve fibroin örnekleri birlikte değerlendirildiklerinde C-NMR sonucuna göre en keskin ve net pikler Alb-Fib (2:1 w/w) oranında ki örnekte gözlenmiştir.



Şekil 4-23 Serisin partiküllerinin a) <sup>1</sup>H-NMR ve b) <sup>13</sup>C-NMR Spektrumları

Serisin nanopartiküllerin H-NMR spektrumunda (Şekil 4-23 a) aromatik yapıya ait olan protonlar 3.292 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. 6.098 ppm alifatik karbona ait pik olarak gözlenmiştir. C-NMR spektrumunda ise 0-45 ppm arasındaki pikler CH<sub>3</sub> grubuna ait olmakla birlikte 20-45 arası karbona bağlı amin gruplarına aittir. 220-223 ppm arası C=O bölgesidir. 173 ve 174 ppm deki pik protein yapılarında bulunan gly'nin C=O bağından gelmektedir.

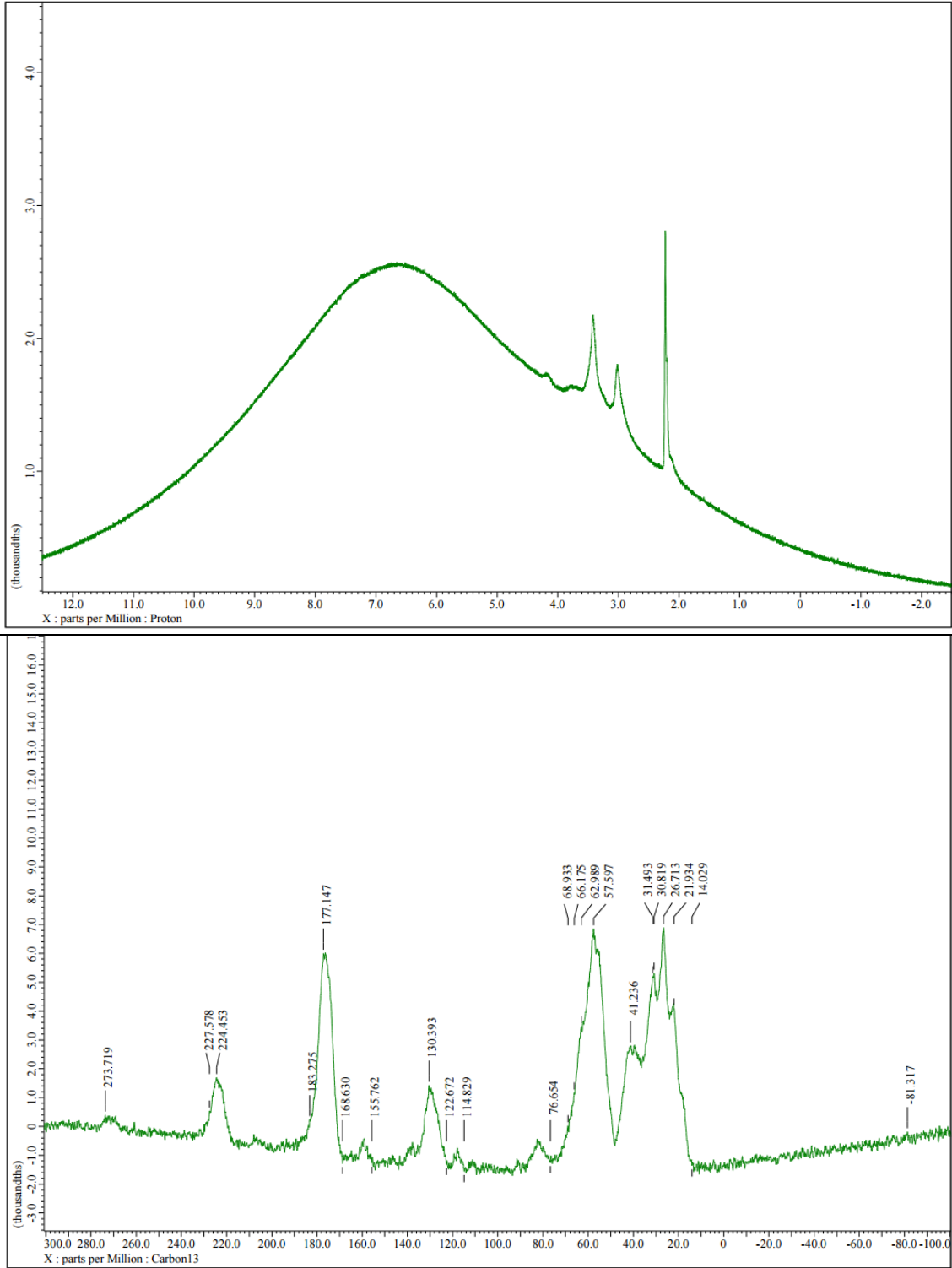




Şekil 4-24 Alb-Ser(1:1 w/w) partiküllerinin a) <sup>1</sup>H-NMR ve b) <sup>13</sup>C-NMR Spektrumları

Alb-ser (1:1) nanopartiküllerinin H-NMR'ındaki 6.9 ppm yine alifatik karbon olarak yorumlanmıştır. C-NMR'da 2ise 7,32ppm'de görülen birleşik pik karbona bağlı azot gruplarından kaynaklı 64-54 ppm ve -224 ppm'dekiler ise protein yapılarının

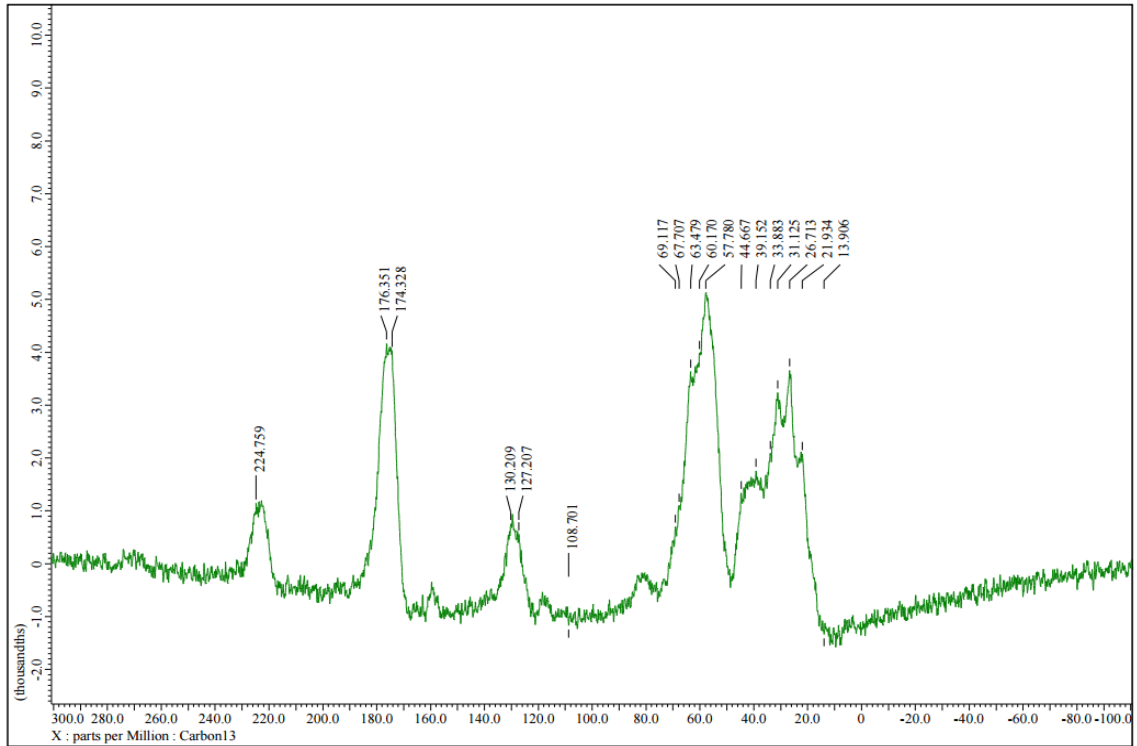
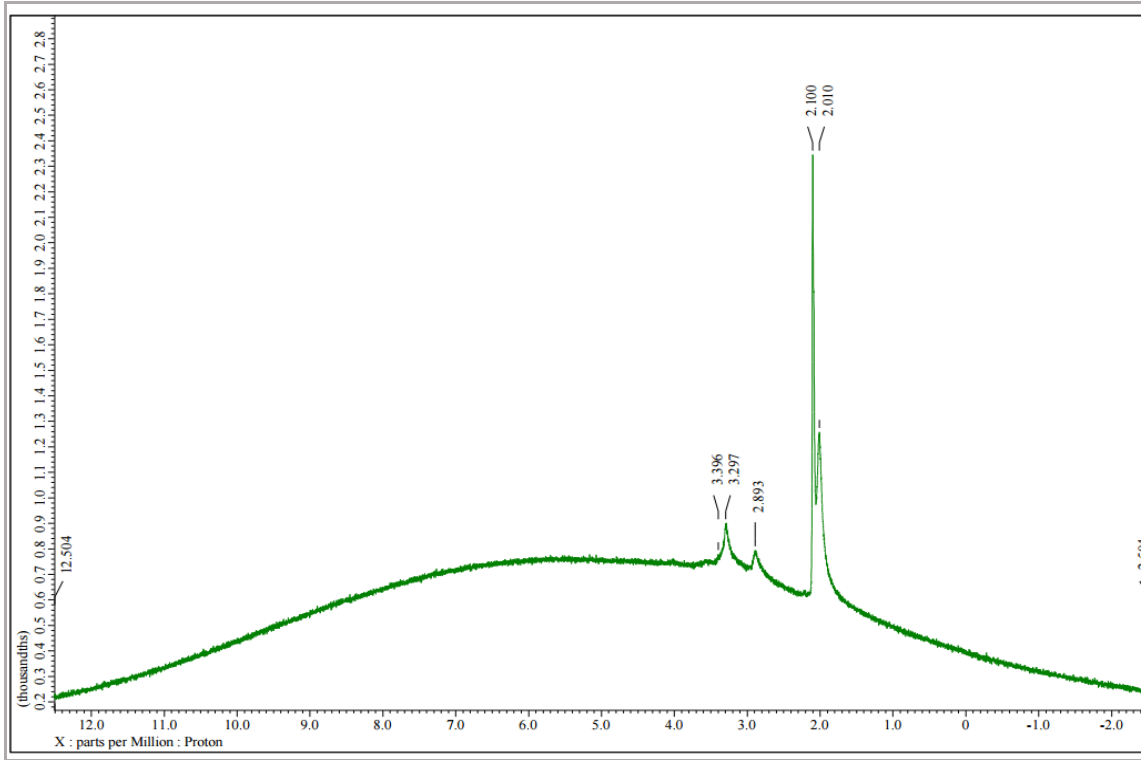
karakteristik amitbandları, 129 ppm'daki C-N terminaleri arasındaki ikili katlanmış bölgeye ait olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4-25 Alb-Ser(2:1 w/w) partiküllerinin a) <sup>1</sup>H-NMR ve b) <sup>13</sup>C-NMR Spektrumları

Alb-Ser (2:1) nanopartiküllerinin H-NMR'ına bakıldığında 4-12 ppm arasındaki geniş bir band veren pikin örneğin çok yoğun olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Örneğin C-NMR'ında ise 55-70 arası karakteristik amid bandlarına ait, 115 ppm histidine ait N'a aittir. Oksijen bağlı ligandlar bu bölgede pik vermektedirler. Alkaline fosfat grupları da 114-130 ppm de pik verebilmektedir. 224 ve 227 ppm'deki pikler protein yapılarının karakteristik amitbandları olarak gözlenmektedir (Şekil 4-25).





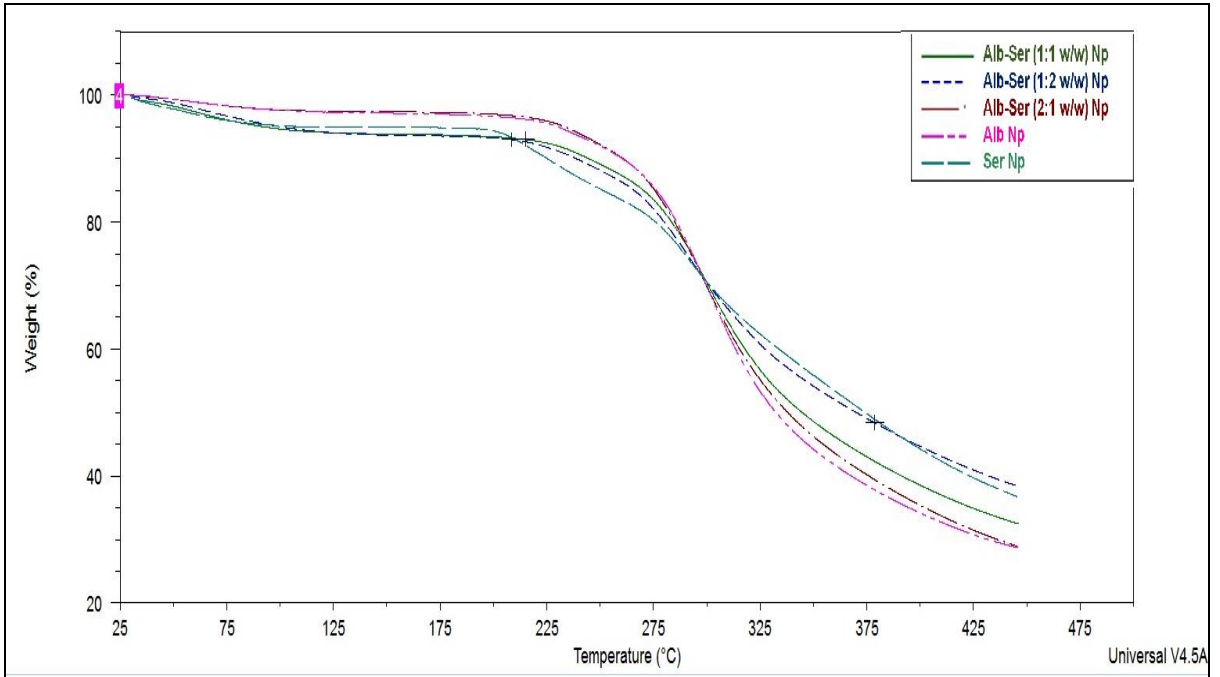
Şekil 4-26 Alb-Ser(1:2 w/w) partiküllerinin a) 1H-NMR ve b) 13C-NMR Spektrumları

Alb-ser (1:2 w/w) nanopartiküllerinin H-NMR'ına bakıldığında 2ppm'deki pikler serisinin karakteristik yapısına ait olan piklerdir. C-NMR'larında iki molekulun bağlanmasından dolayı kimyasal kaymalar görülmekle birlikte proteinlere ait karakteristik amid ve C=O bağları gözlemlenmektedir (Şekil 4-26).

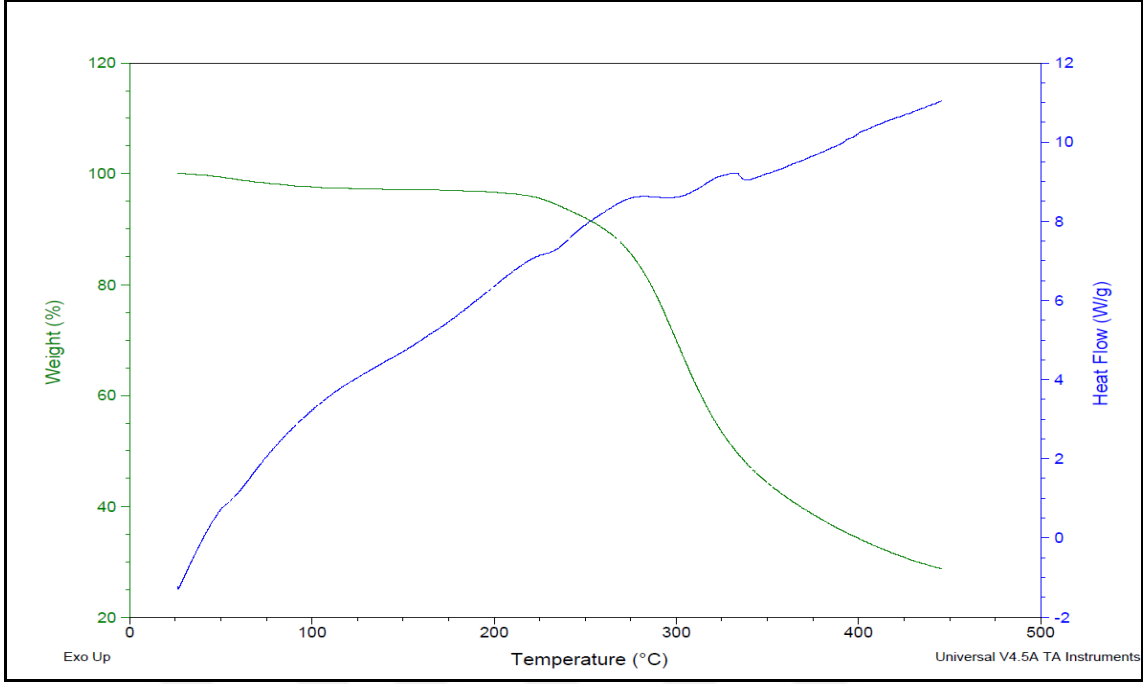
## DSC-TGA Analizi

Termal yöntemler, sıcaklık ile bir yapının kütle, reaksiyon hızı veya hacim gibi bazı özellikleri arasındaki dinamik ilişkinin incelenmesini sağlamaktadır. Oluşturulan nanopartiküllerin 2 farklı protein yapısını da ihtiva ettiğini gösterebilmek için DSC-TGA analizi yapılmıştır. Larinks kanserinde kullanılmak üzere en etkili tedaviyi sunacak nanopartiküle ulaşmak için albümin-serisin örnekleri farklı oranlarda karıştırılmış, hazırlanan partiküllerin DSC-TGA analizleri TA marka SDTQ600 serisi termal analiz cihazında yapılmıştır.

Farklı oranlarda blend yapılarak hazırlanan nanopartiküllerin DSC sonuçlarına bakıldığında sadece serisin içeren nanopartiküllerin daha düşük yaklaşık 210 °C'de erime gözlenirken sadece albumin içeren nanopartiküllerin ise yaklaşık 230 °C'de bir erime göstermiştir (Şekil 4-27). Entalpileri karşılaştırıldığında serisinin bozunma stabilitesinin albuminden fazla olduğu ve blend nanopartiküllerde serisin miktarına bağlı olarak doğru orantı gösterdiği görülmüştür. Yapılan bu çalışmalar neticesinde blend hazırlanan nanopartiküllerde 2 proteinin de yapıda bulunduğu gösterilmiştir.



Şekil 4-27 Farklı konsantrasyonlardaki protein nanopartiküllerin mukayeseli DSC sonuçları

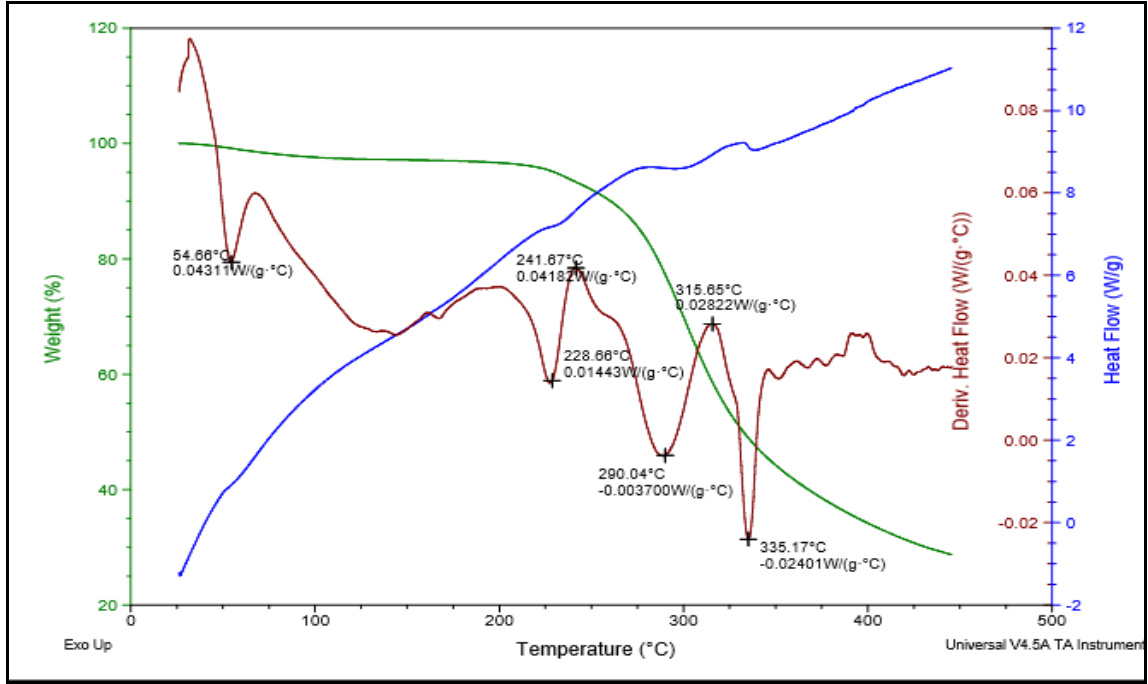


Şekil 4-28 Albumin Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği

Şekil 4-28’de sunulan grafik albümin örneğine ait DSC (mavi) ve TGA (yeşil) eğrilerini göstermektedir. Azot atmosferinde alümina pan kullanılarak 30 °C sıcaklık ile analize başlanmış dakikada 10 °C artış ile 450 °C ye kadar analiz devam etmiştir. Albümin örneği için analizde kullanılan örnek miktarı 1.344 mg olarak tartılmıştır. Grafikte görüldüğü üzere ilk kütle kaybı 54 °C civarında ve yaklaşık %2 oranındadır. Albümin yapısı gereği 50 °C üzerine ısıtıldığında hidrofobik kümelenmeler başlar. Termogramda da bu durum açıkça görülmektedir. Endotermik etki 240 °C ye kadar devam etmiş ve kütle bu aralıkta sabit kalmıştır. Albümin örneğinin toplam bozunması dört aşamada olmuştur. 240 °C den 330 °C ye kadar bozunma endotermik olarak devam etmiş 330 °C den sonra da bozunma devam etmiş fakat termal etki azalmıştır. 450 °C de örneğin yaklaşık %25’i bozunmadan kalmıştır. Isı kapasitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$C_p = \frac{EQ}{RM}$$

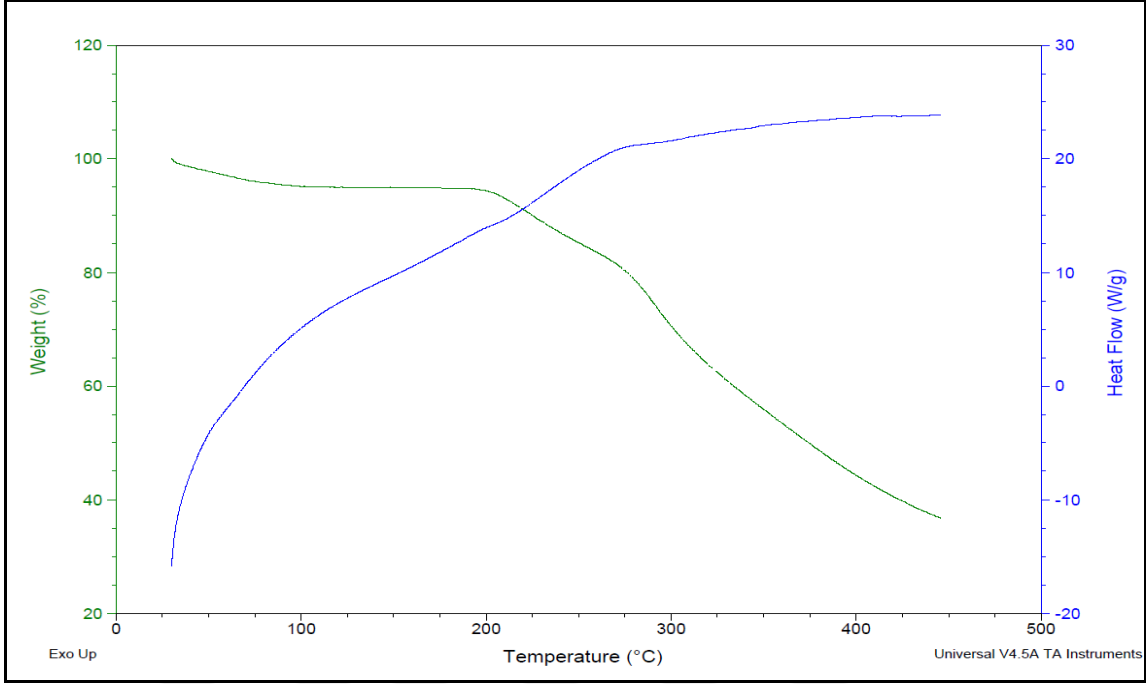
Burada M; örneğin kütlesi, E;DSC kalibrasyon faktörü, Q; Isı akışı, R; dakikadaki ısı artışıdır [167]. Bu formüle göre albümin için yapılan ısı kapasitesi Cp değerleri Şekil 4-29 ve Tablo 4-5’de sunulmuştur.



Şekil 4-29 Albumin Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği

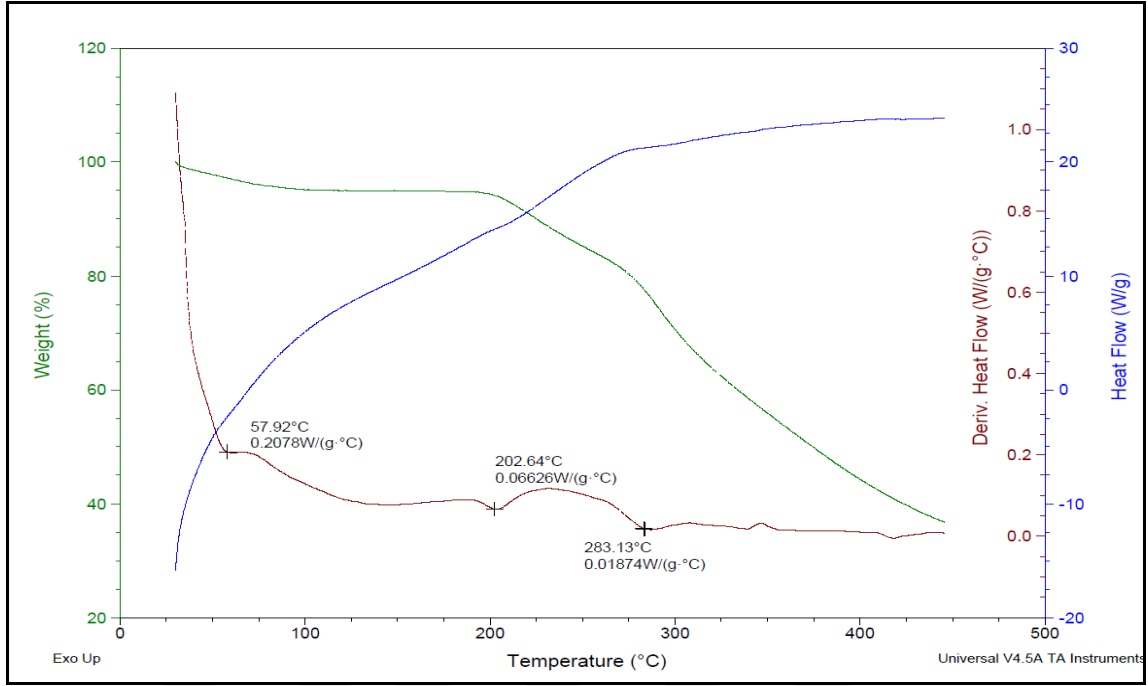
Tablo 4-5. Albumin Nanopartiküllerin Cp Değerleri

| Örnek   | Karakteristik değişiklikler | Bozunma Basamakları |              |               |        |
|---------|-----------------------------|---------------------|--------------|---------------|--------|
|         |                             | 1                   | 2            | 3             | 4      |
| Albumin | İlk sıcaklık                | 54 °C               | 228 °C       | 290 °C        | 335 °C |
|         | Son sıcaklık                | 58 °C               | 241 °C       | 315 °C        | 450 °C |
|         | Kütle değişikliği           | %4                  | %50          | %53           | %75    |
|         | Cp Değeri                   | 0.04311 W/g°C       | 0.0418 W/g°C | 0.02822 W/g°C |        |



Şekil 4-30 Serisin Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği

Şekil 4-30 incelendiğinde Serisin örneği için; 0.4170 mg numune tartılmış ve albumin ile aynı şartlarda analiz edilmiştir. Serisinin termogramına DSC (mavi) ve TGA (yeşil) grafiklerine baktığımızda 209 °C ve 319 °C de iki tane endotermik pik görülmektedir. İlk pik amorf yapının bozunmasına ikinci pik ise kristalin yapının bozunmasına karşılık gelmektedir. İlk kütle kaybı 60 °C civarında ve yaklaşık %7 oranındadır. 210 °C ye kadar endotermik etki sürmüştür. Albümin örneğinde olduğu gibi 450 °C de örneğin yaklaşık %35'i bozunmadan kalmıştır (Şekil 4-31, Tablo 4-6).

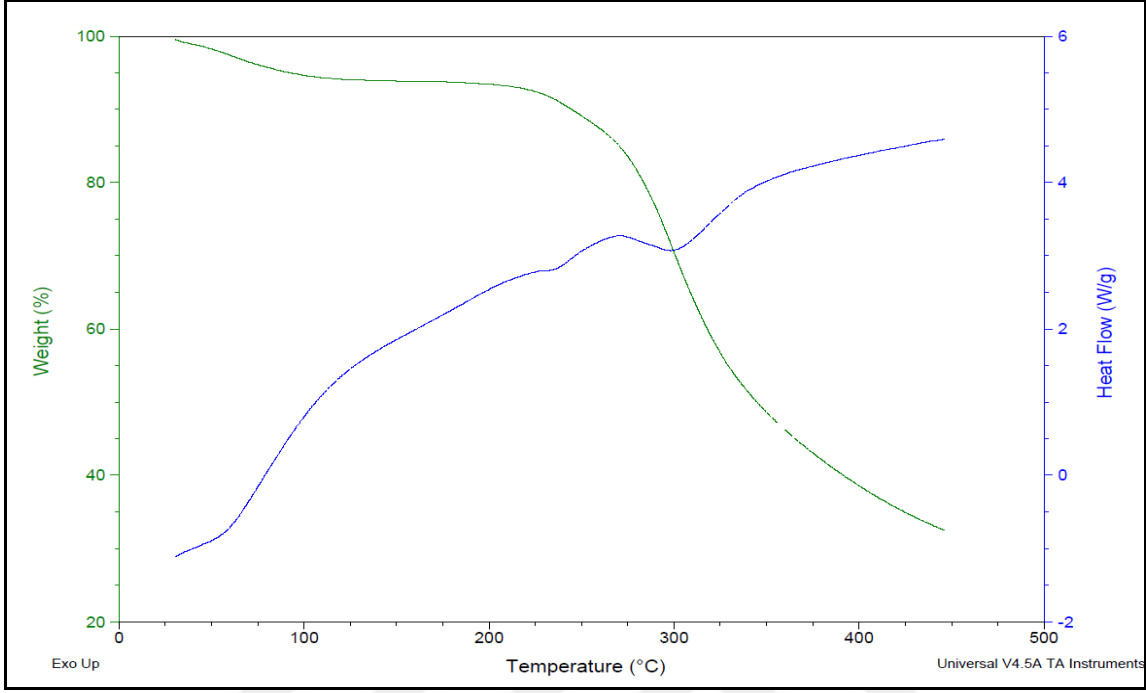


Şekil 4-31 Serisin Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği

Tablo 4-6. Serisin Nanopartiküllerin Cp Değerleri

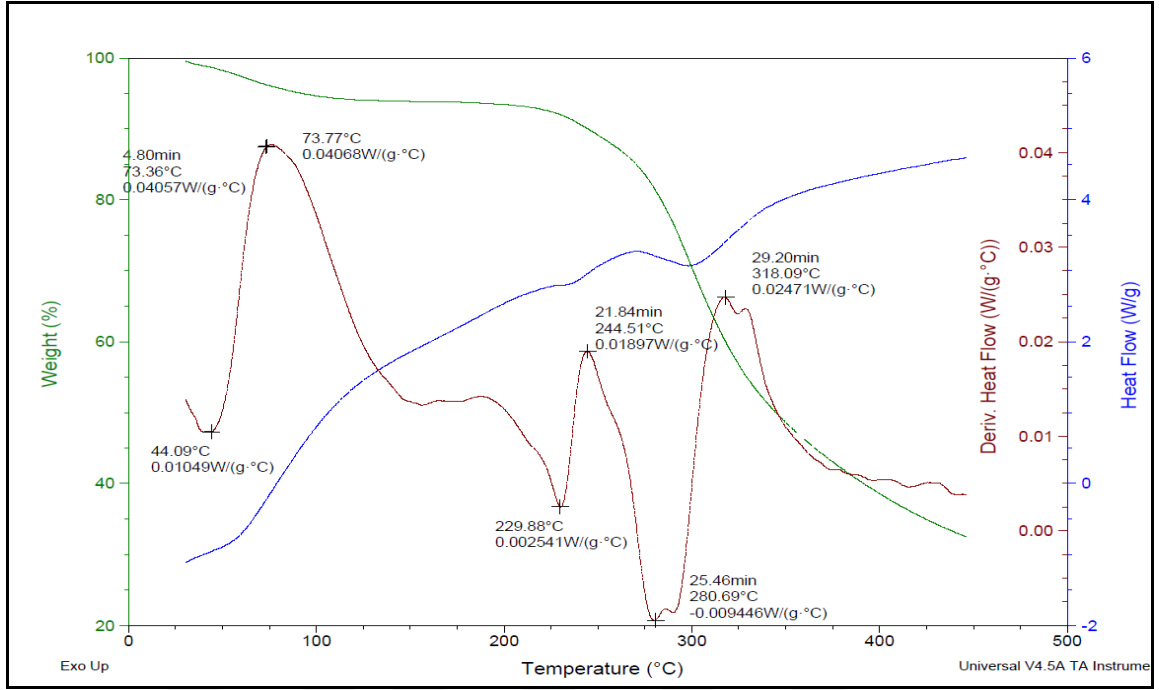
| Örnek   | Karakteristik değişiklikler | Bozunma Basamakları |              |             |        |
|---------|-----------------------------|---------------------|--------------|-------------|--------|
|         |                             | 1                   | 2            | 3           | 4      |
| Serisin | İlk sıcaklık                | 60 °C               | 210 °C       | 265 °C      | 320 °C |
|         | Son sıcaklık                | 120°C               | 250°C        | 320 °C      | 450 °C |
|         | Kütle değişikliği           | %5                  | %7           | %18         | %65    |
|         | Cp Değeri                   | 0.2078 W/g°C        | 0.0662 W/g°C | 0.0187W/g°C |        |

Albümin ve serisin örneklerinin 1:1 oranlarında karıştırılması ile elde edilen numune için TGA (yeşil) ve DSC (mavi) grafikleri Şekil 4-32’de gösterilmiştir.



Şekil 4-32 Albumin-Serisin (1:1 w/w) Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği

Analiz için 2.9820 mg örnek tartılmış ve diğer örneklerde olduğu gibi aynı analiz koşulları uygulanmıştır. 100 °C sıcaklığa kadar örnek içinde bulunan su buharlaşmış ve 74 °C ile 230 °C arasında endotermik etki devam etmiştir. 1:1 oranındaki albümin-serisin örneklerinin 450 °C de %30'u bozunmadan kalmıştır.

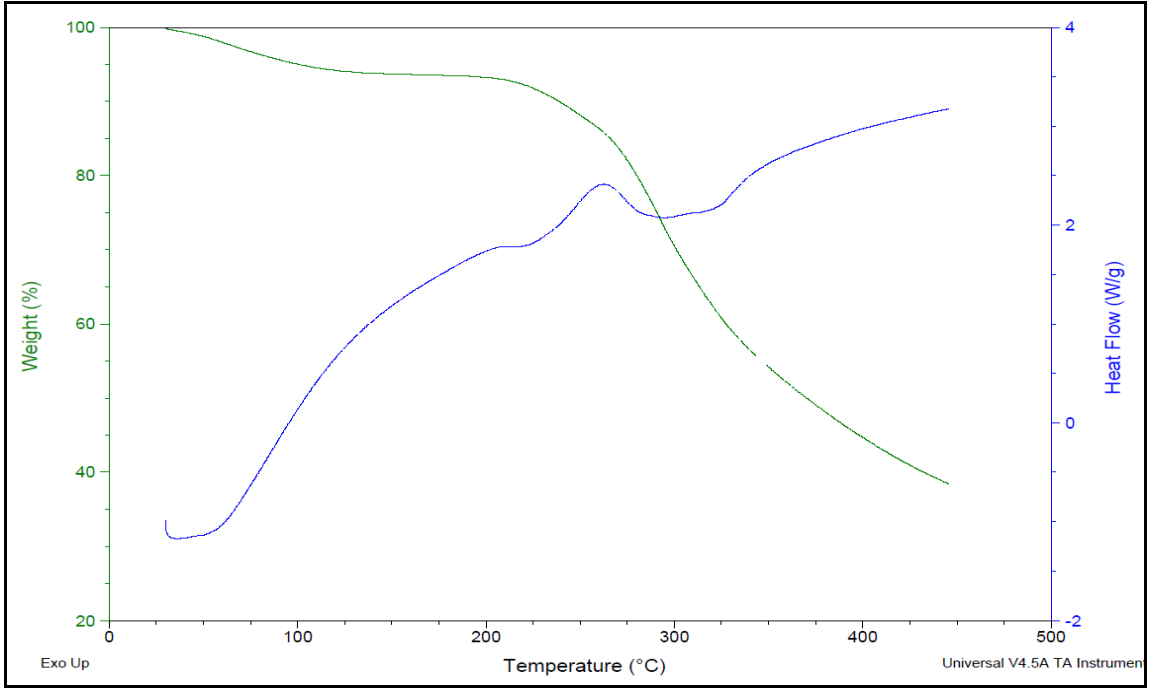


Şekil 4-33 Albumin-Serisin (1:1 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği

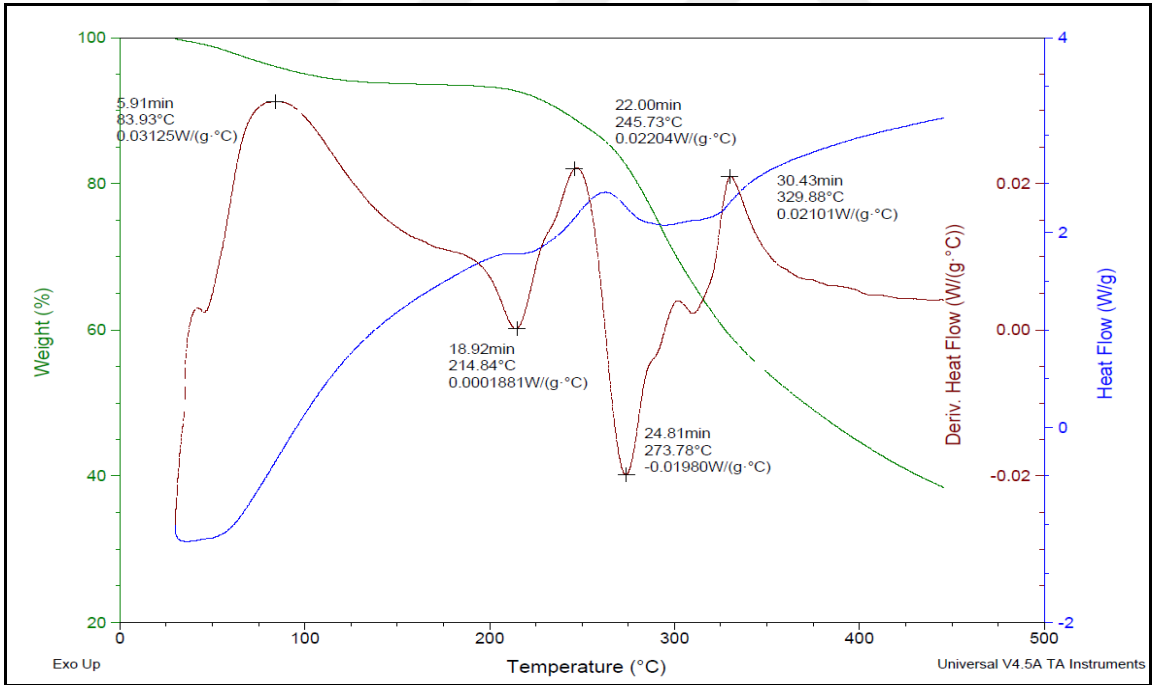
Tablo 4-7. Albumin-Serisin (1:1 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değerleri

| Örnek                 | Karakteristik değişiklikler | Bozunma Basamakları |              |              |        |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------|
|                       |                             | 1                   | 2            | 3            | 4      |
| Albumin-Serisin (1:1) | İlk sıcaklık                | 45 °C               | 229 °C       | 280 °C       | 360 °C |
|                       | Son sıcaklık                | 74 °C               | 244 °C       | 318 °C       | 450 °C |
|                       | Kütle değişikliği           | %2                  | % 10         | %50          | %70    |
|                       | Cp Değeri                   | 0.01049 W/g°C       | 0.01879W/g°C | 0.02471W/g°C |        |

Albumin-serisin örnekleri 1:2 oranında karıştırılarak numuneler hazırlanmış ve analiz için 4.2990 mg tartılan örnek ile termogramlar çekilmiştir. TGA (yeşil) ve DSC (mavi) grafikleri Şekil 4-34'de gösterilmiştir. Diğer örneklerde olduğu gibi aynı analiz koşulları uygulanmıştır. 84 °C sıcaklığa kadar örnek içinde bulunan su buharlaşmış ve 84 °C ile 210 °C arasında endotermik etki devam etmiştir. 1:2 oranındaki albümin-serisin örneklerinin 450 °C de %30'u bozunmadan kalmıştır.



Şekil 4-34 Albumin-Serisin (1:2 w/w) Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği

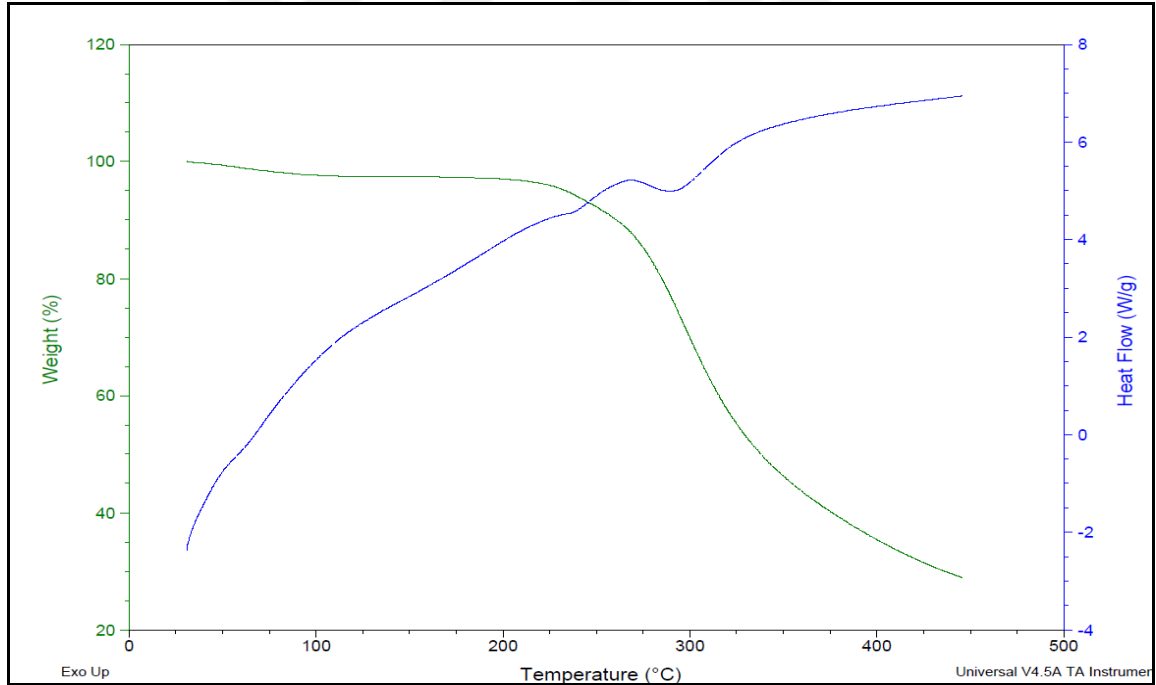


Şekil 4-35 Albumin-Serisin (1:2 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği

Tablo 4-8. Albumin-Serisin (1:2 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değerleri

| Örnek                 | Karakteristik değişiklikler | Bozunma Basamakları |              |              |        |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------|
|                       |                             | 1                   | 2            | 3            | 4      |
| Albumin-Serisin (1:2) | İlk sıcaklık                | 83 °C               | 210 °C       | 270 °C       | 330 °C |
|                       | Son sıcaklık                | 100 °C              | 245 °C       | 330°C        | 450 °C |
|                       | Kütle değişikliği           | %8                  | %15          | %50          | %70    |
|                       | Cp Değeri                   | 0.03125W/g°C        | 0.02204W/g°C | 0.02101W/g°C | -      |

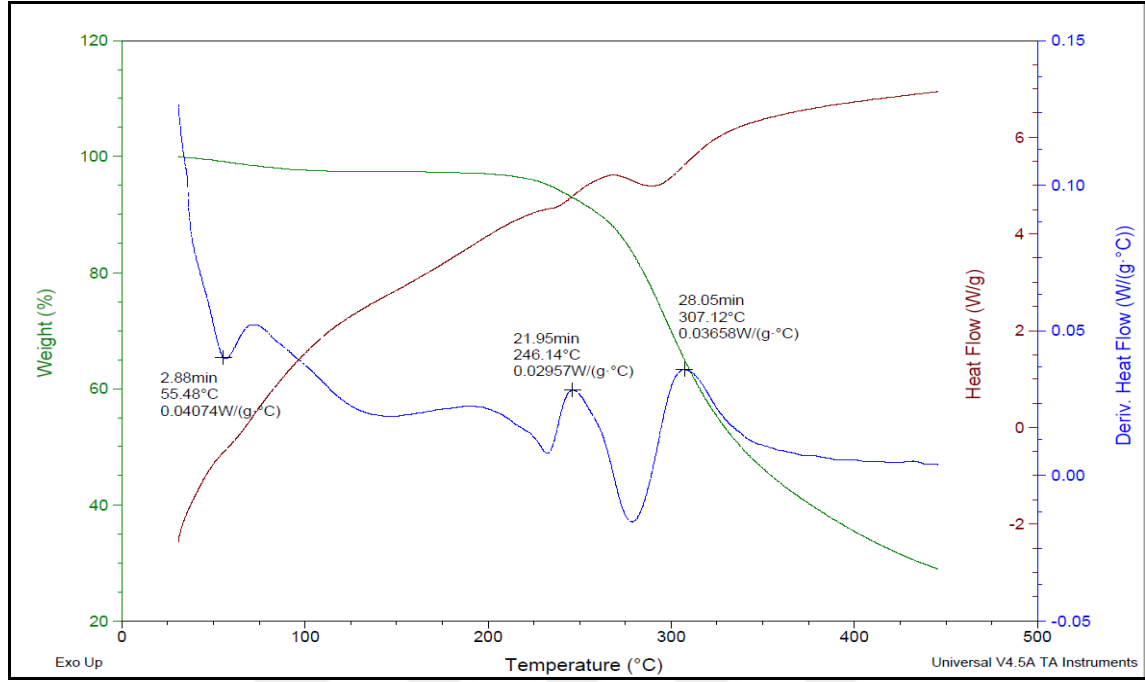
Son olarak albumin serisin örnekleri 2:1 oranında karıştırıldığında ise numune 1.8330 mg olarak tartılmış ve tüm çalışmada kullanılan şartlar altında termogramlar alınmıştır. TGA (yeşil) ve DSC (mavi) grafikleri Şekil 4-36'da gösterilmiştir.



Şekil 4-36 Albumin-Serisin (2:1 w/w) Nanopartiküllerin DSC-TGA Grafiği

90 °C sıcaklığa kadar örnek içinde bulunan su buharlaşmış ve 90 °C ile 225 °C arasında endotermik etki devam etmiştir. 2:1 oranındaki albümin-serisin örneklerinin 450 °C de yaklaşık %25'i bozunmadan kalmıştır. Örnek, nem kaybına bağlı olarak 180 °C ve 230 °C civarlarında iki tane endotermik pik verdiği

görülmektedir. Bu da kristalin yapıda konformasyon yapısının bozulduğuna işaret etmiştir.



Şekil 4-37 Albumin-Serisin (2:1 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değer Grafiği

Tablo 4-9. Albumin-Serisin (2:1 w/w) Nanopartiküllerin Cp Değerleri

| Örnek                 | Karakteristik değişiklikler | Bozunma Basamakları |              |              |        |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------|--------------|--------------|--------|
|                       |                             | 1                   | 2            | 3            | 4      |
| Albumin-Serisin (2:1) | İlk sıcaklık                | 90°C                | 215 °C       | 246°C        | 307 °C |
|                       | Son sıcaklık                | 100 °C              | 245 °C       | 275°C        | 450 °C |
|                       | Kütle değişikliği           | %3                  | %8           | %30          | %70    |
|                       | Cp Değeri                   | 0.04074W/g°C        | 0.02957W/g°C | 0.03658W/g°C | -      |

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; serisin örneğinin kütle kaybı 200 °C civarlarında; albümin örneğinin kütle kaybı 230°C de başladığı görülmektedir. Albümin-serisin örneklerinden 1:1 oranındaki karıştırılan numune için bu değer 230 °C ye karşılık gelirken, 1:2 oranlarındaki karışımda 210 °C olarak ve 2:1 oranında ise 245 °C olarak ölçülmüştür. Cp değerlerine baktığımızda da albümin için endotermik etkinin başladığı sıcaklığı olan 230 °C sıcaklıkta kütle kaybı %4 ölçülürken Cp değeri\_0.01443 W/g°C ölçülmüş, serisin için bu değerler; %7 kütle kaybı ile 200 °C ve Cp değeri 0.06620 W/g°Cdir.

Karışım numunlerden ise; Albümin-serisin (1:1) de bu değerler; kütle kaybının %10 olduğu sıcaklık 230 °C ve Cp 0.02204W/g°C; Albümin-serisin (1:2) de ; 214 °C ile kütle kaybı %15 ve Cp 0.02204W/g°C; Albümin–serisin (2:1) için bu değerler; kütle kaybının % 8 e yaklaştığı 240 °C sıcaklıkta 0.02957W/g°Cdir.

Sonuç olarak 2:1 oranındaki örneğin ısı kapasitesi ve bozunma sıcaklığı daha yüksek olup kütle kaybı daha az olduğundan nanopartikül yapımı için optimum değerleri sağlamaktadır.

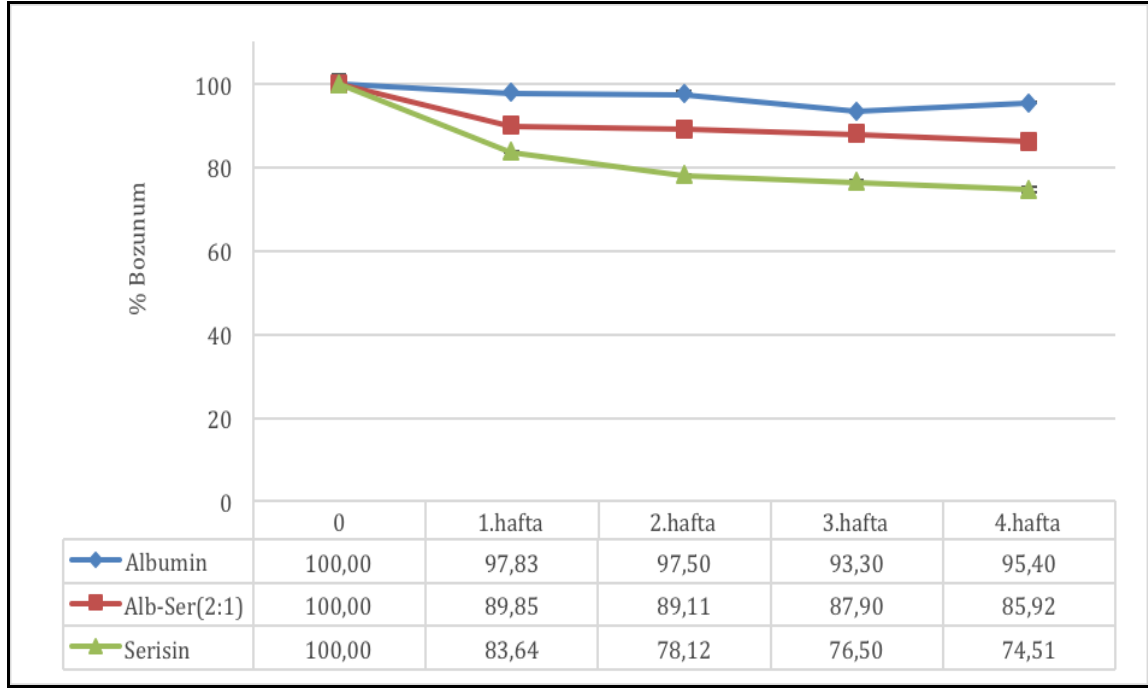
### ***Partikül seçimi:***

Boyut analizi, kimyasal ve fiziksel analizler sonucunda elde edilen verilere ve tüm değişken parametrelerdeki sonuçlara bakıldığında çalışmanın amacına en uygun partikülün Alb-Ser (2:1 w/w) olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmanın ilerleyen bölümleri bu partikül ve bu partikülün referansları olarak kıyaslama yapılabilecek albümin ve serisin nanopartikülleri ile devam ettirilmiştir.

#### **4.1.4 Nanopartiküllerin Raf ömrü ve Bozunum Testleri**

##### **Raf Ömrü**

Tedavi amaçlı kullanılacak partiküller için en önemli kriterlerden biri olan raf ömrü (stabilite) çalışması fosfat tamponu (pH 7.2) ile turbidimetrik yöntem ile yapılmıştır. Partiküller +4 °C’de bekletilerek her hafta turbidimetrik absorbansları 3’er tekrarlı olarak alınmış ve 4 haftalık süreçte bozunum yüzdeleri çıkartılmıştır.

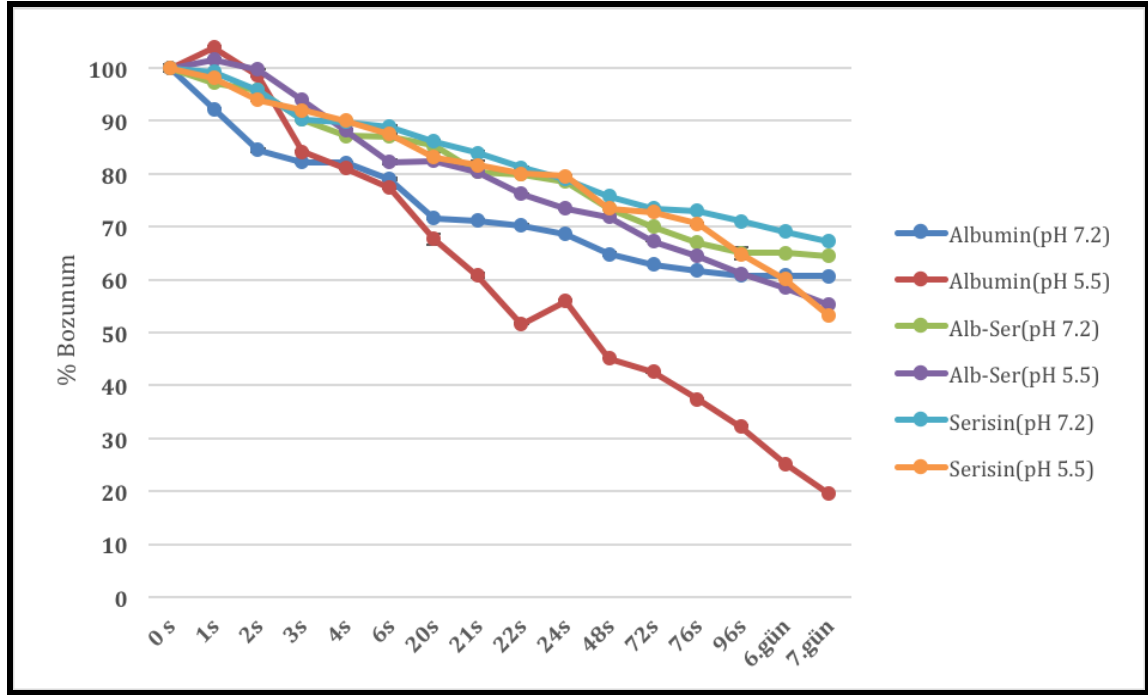


Şekil 4-38 Albumin, Alb-Ser(2:1 w/w) ve Serisin nanopartiküllerin 4 haftalık turbidimetrik absorbands grafiği

Sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4-38) Albumin nanopartiküllerin stabilitesi serisin nanopartiküllere oranla daha yüksek olup alb-ser (2:1 w/w) partikülleri ise diğer iki partikül stabilitesinin arasında (~%86) bir değer vermiştir. Ancak üçüncü haftadan sonra albümin nanopartiküllerin bozunum oranındaki yükseliş, partiküllerin agregat oluşturmaya başlamasından kaynaklanmıştır.

### Bozunum testi

Degradasyon çalışmaları yine turbidimetrik yöntem ile devam ettirilmiştir. Partiküller vücut sıvısı taklidi için pH 7.2, endozom ve lizozom mikroçevre taklidi için pH 5.5 10 µg/ml lizozim enzimi ihtiva eden fosfat tamponunda +37 °C'de bekletilmiş ve turbidimetrik absorbandsları alınmıştır. Turbidimetrik absorbands ölçümler bir hafta boyunca belirli periyotlarda 3'er tekrarlı olarak alınmıştır.

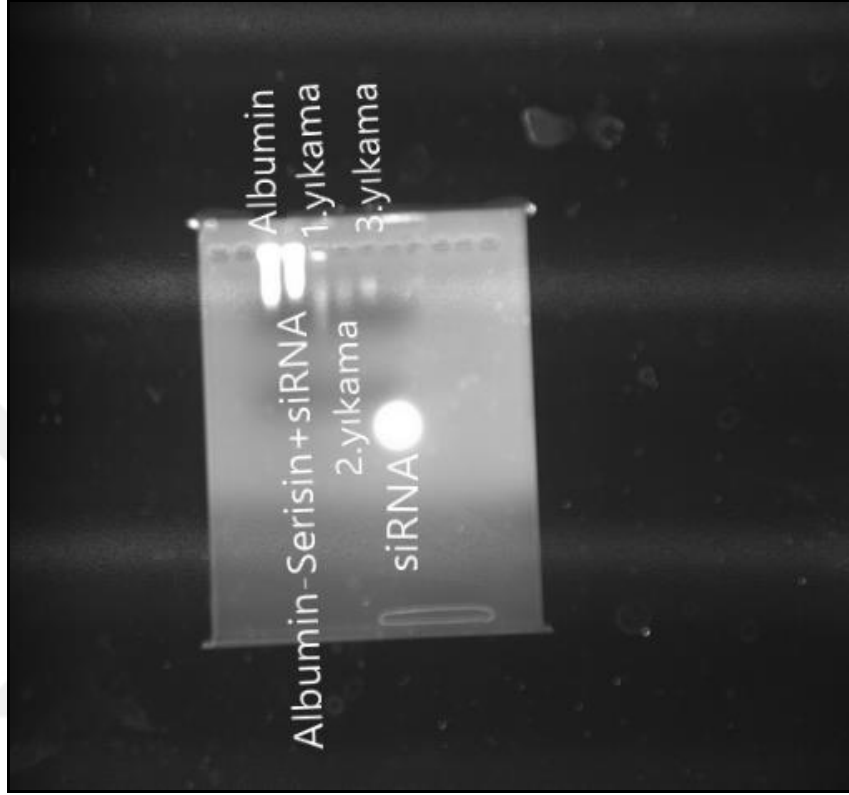


Şekil 4-39 Albumin, alb-ser (2:1 w/w) ve serisin nanopartiküllerin yüzde bozunum grafiği

Sonuçlar incelendiğinde (Şekil 4-39) pH 5.5'de tüm partiküllerin bozunum yüzdeleri pH 7.2'ye göre daha yüksek seyretmiştir. Aynı zamanda pH 5.5'deki ölçümlerde sapmalar çok fazla gözlemlenmiştir bunun nedeninin de izoelektrik noktasında yaklaşan partiküllerin kararsızlığından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. pH 7.2'de bozunum yüzdelerine bakıldığında sıralama; albümin> alb-ser (2:1 w/w) serisin nanopartikülleridir. Serisin albümin yapısının bozunumunu bu çalışmaya uygun olarak arttırmıştır.

## 4.2 Nanopartiküllere siRNA yüklenmesi ve siRNA bağlanma veriminin incelenmesi

### Agaroz Jel Elektroforezi



Şekil 4-40 Hazırlanan Partiküllerin Elektroforez Testi

Şekil 4-40'da görülen kontroldeki aşırı parlama siRNA konsantrasyonunun farklılığından kaynaklanmaktadır. Bu ölçüm 17 V'de 210 dakika yürütülerek elde edilmiştir. Görüntüleme datasından anlaşıldığı üzere boş albumin partikülünde de, albuminin bromophenol blue boyası ile etkileşime girmesi sonucu ışıma görülmektedir. Bu sebeple hemen yanındaki Albumin-Serisin+siRNA partikülündeki ışımanın albuminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Solüsyon içerisindeki siRNA'ya bakıldığında ise, siRNA yoğunluğunun yıkama arttıkça azaldığı görülmektedir. İlk yıkamada uzaklaştığı düşünülen bağlanmamış albumin, sonraki yıkamalarda görülmemektedir. Sonraki yıkamalarda ise hala görülen siRNA ışımalarının, az miktarda bağlanmayan ya da uzaklaşan siRNA olduğu sonucuna varılmıştır.

### Spektroflorometrik Analiz

Quant-iT™ RiboGreen® RNA ajan kiti (Thermo Scientific) kullanılarak siRNA yüklenme verimi spektroflorometrik olarak hesaplanmıştır. Farklı miktardaki (2.5, 5, 10 ve 20µl = 0,7125µg, 1,425µg, 2,85µg, 5,7µg siRNA) siRNA ile etkileştirilen nanopartikül-siRNA formülasyonlarından elde edilen 3 santrifüj ve yıkama ile elde edilen süpernatantlar kullanılmıştır. Sonuçlar aşağıda yer alan tabloda verilmiştir.

Tablo 4-10. Farklı miktarlardaki siRNA'ların Alb:Ser (2:1) nanopartiküllerine bağlanma verimi sonuçları

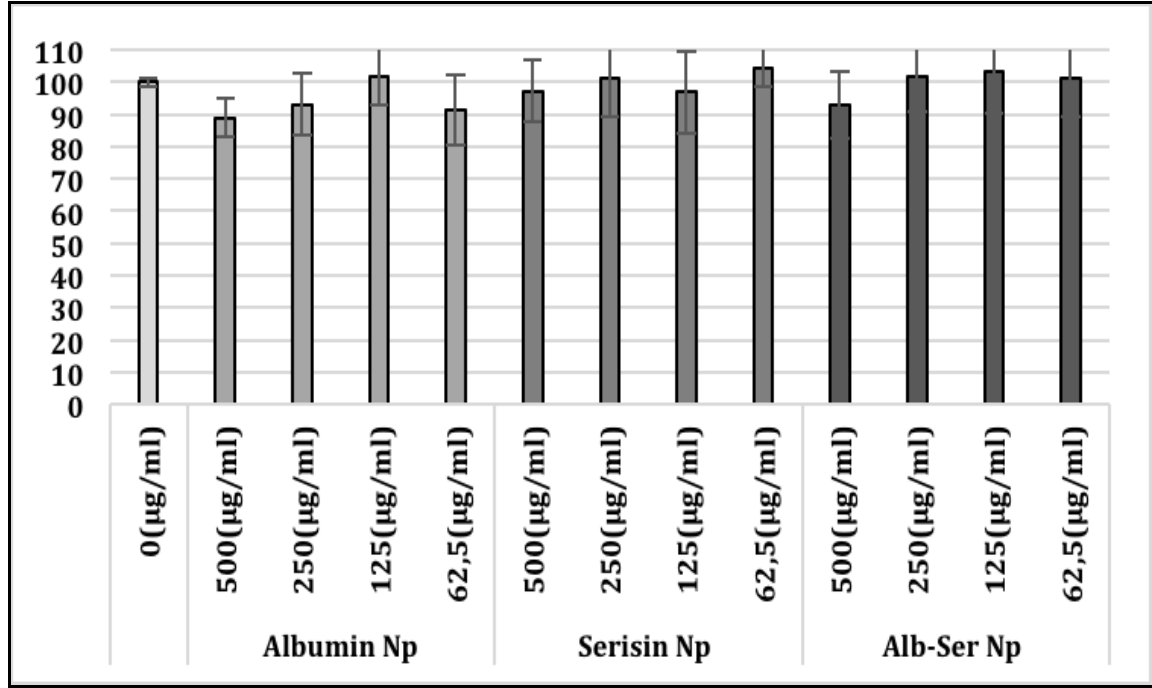
| Örnekler                                 | % Bağlanma Verimi |
|------------------------------------------|-------------------|
| Alb-Ser (2:1) + siRNA (2,5µl = 0,7125µg) | 61,25             |
| Alb-Ser (2:1) + siRNA (5 µl = 1,425 µg)  | 48,54             |
| Alb-Ser (2:1) + siRNA (10 µl = 2,85 µg)  | 40                |
| Alb-Ser (2:1) + siRNA (20 µl = 5,7 µg)   | 36,84             |

Elde edilen sonuca göre nanopartiküllerle etkileştirilen siRNA miktarı arttıkça % bağlanma veriminde azalma görülmektedir.

### **4.3 siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerinin in vitro etkinlik testleri**

#### **4.3.1 Sitotoksosite Testleri**

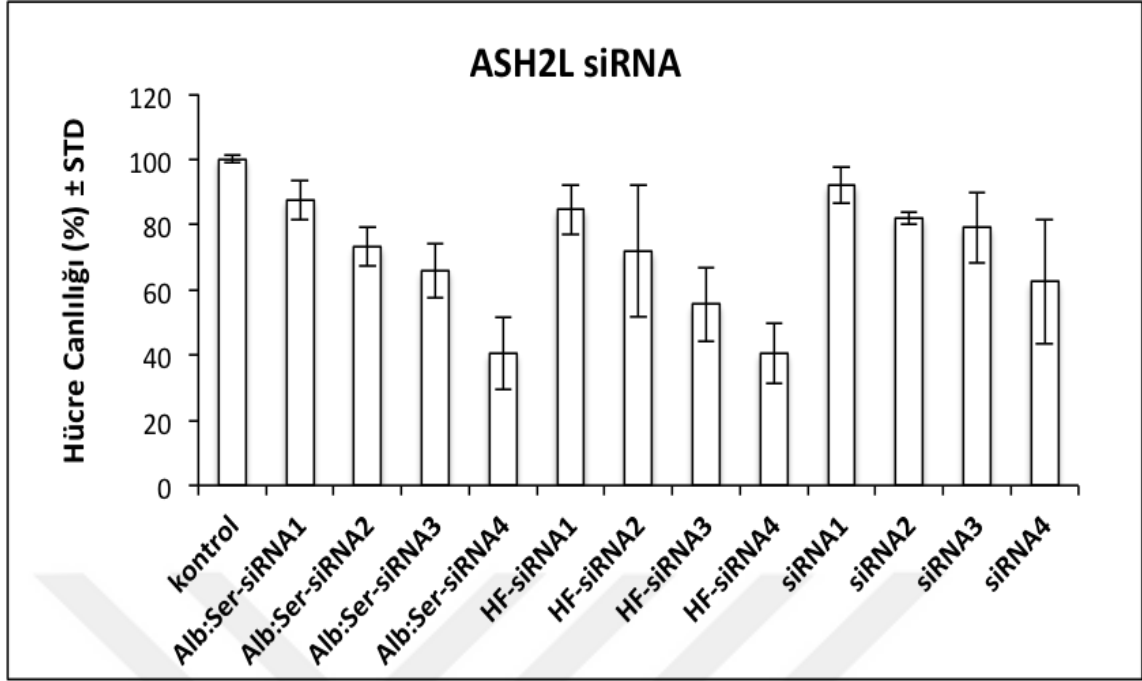
Hazırlanan nanopartiküllerin siRNA ile etkileşimlerinden önce sitotoksitelerinin tespiti için XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide) testi kullanılmıştır. Hücre canlılığının değerlendirilmesi için L929 fibroblast hücreleri ( $4 \times 10^3$  konsantrasyonlu) kullanılmış ve hücreler 96 kuyucuklu plaklarda kültüre (30 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde) edilmiştir. XTT testi her deney grubu ve kontrol grubu için 6 tekrarlı olarak çalışılmıştır.



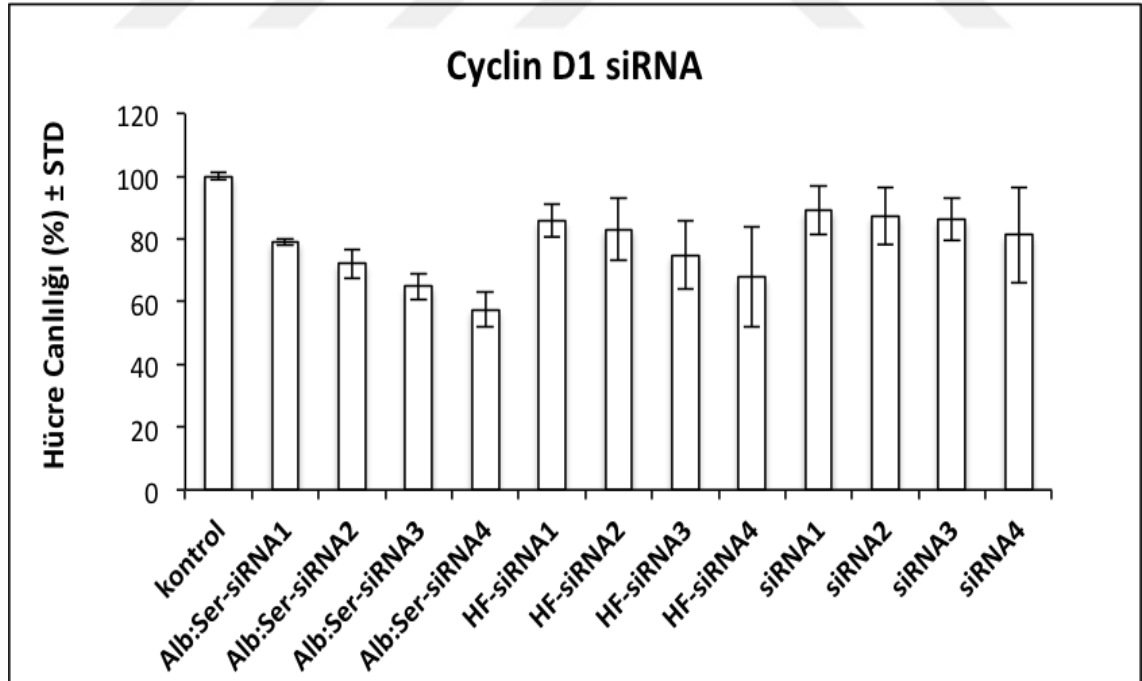
Şekil 4-41 Farklı konsantrasyondaki Albumin, Serisin ve Alb-Ser (2:1 w/w) nanopartiküllerin %canlılık (biyoyumluluk) grafiği (Değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir, n=8)

Şekil 4-41'deki biyoyumluluk sonuçlarına bakıldığında partiküllerin canlı hücre oranlarında azaltma göstermediği ancak yüksek konsantrasyonda verilen nanopartiküllerin çok hafif bir toksisite etki gösterdiği (yaklaşık %90 hücre canlılığını koruyarak) görülmüştür. Albumin ve Alb-Ser (2:1 w/w) nanopartiküllerin en uyumlu bulunduğu konsantrasyonun ise 125 µg/ml olduğu görülmüştür.

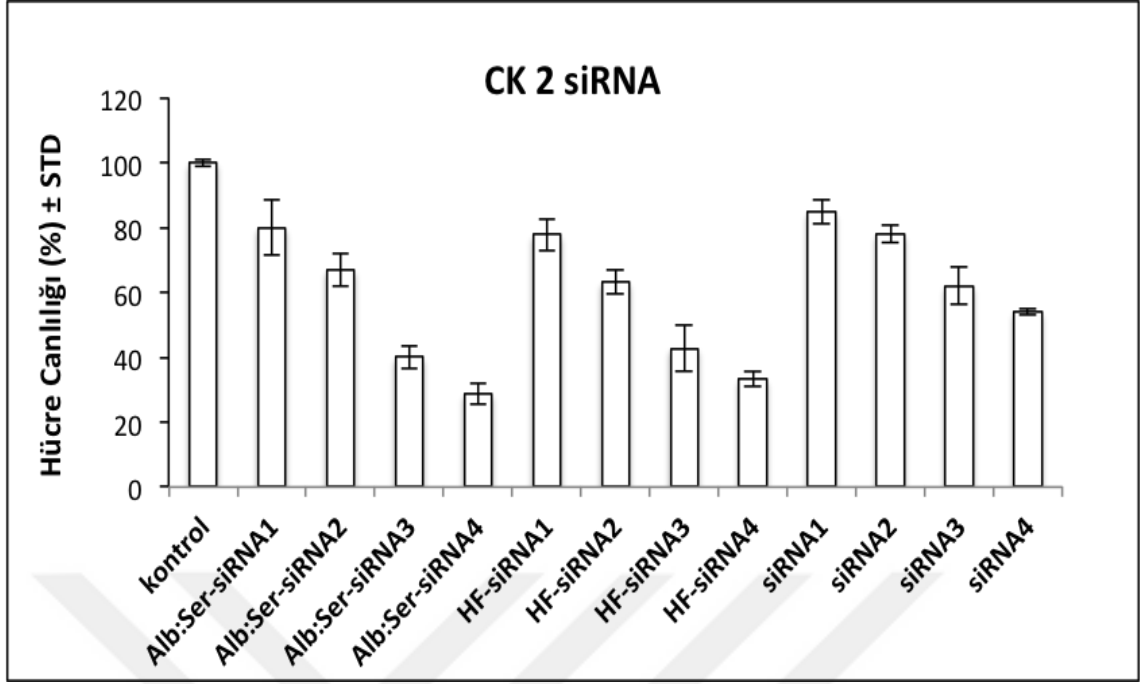
Nanopartiküller farklı genleri hedefleyen siRNA'lar ile etkileştirildikten sonra HEp-2 kanser hücreleriyle muamele edilmiş ve hücreler üzerindeki toksik etkiler MTT analizi ile incelenmiştir. Ayrıca ticari taşıyıcı olarak HiperFect kullanılarak HiPerFect-siRNA formülasyonlarının da hücrelere etkisi ortaya konmuştur. Herhangi bir taşıyıcı olmadan siRNA'ların hücrelere verilmesi de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.



Şekil 4-42 Farklı miktarlardaki ASH2L siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece ASH2L siRNA'ların HEp-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik toksik etkisi (siRNA1: 0,7125µg (2,5µl); siRNA2: 1,425µg (5µl); siRNA3: 2,85µg (10µl); siRNA4: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir, n=8)



Şekil 4-43 Farklı miktarlardaki Cyclin D1 siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece Cyclin D1 siRNA'ların HEp-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik toksik etkisi (siRNA1: 0,7125µg (2,5µl); siRNA2: 1,425µg (5µl); siRNA3: 2,85µg (10µl); siRNA4: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir, n=8)



Şekil 4-44 Farklı miktarlardaki CK2 siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece CK2 siRNA'ların HEP-2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik toksik etkisi (siRNA1: 0,7125µg (2,5µl); siRNA2: 1,425µg (5µl); siRNA3: 2,85µg (10µl); siRNA4: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir, n=8)

Şekil 4-42,4-43 ve 4-44'de görüldüğü gibi Alb:Ser (2:1) nanopartikülleri ile etkileştirilen siRNA miktarı arttıkça larinks kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etki de artmıştır. siRNA'nın uygun şekilde hücrelere taşınması için optimize edilmiş ve etkinliği kanıtlanmış lipozomal yapıdaki taşıyıcı olan HiperFect ile kıyaslandığında nanopartiküllerin siRNA'ları hücre içine ulaştırma başarısı ticari ürünle benzer şekilde veya yakın bir sonuç verdiği görülmektedir. siRNA'lar herhangi bir taşıyıcı sistem olmadan HEP-2 hücreleriyle muamele edildiğinde hücreler üzerindeki toksik etkinin daha az olduğu ortaya konmuştur.

Alb:Ser-ASH2L siRNA4 ile etkileştirilen HEP-2 hücrelerinde gözlenen toksik değer % 59,56 olduğu olarak görülürken, Alb:Ser-Cyclin D1 siRNA4 için bu değer % 42,56 ve Alb:Ser-CK2 siRNA4 için bu degerin de % 71,22 olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre Kazein Kinaz Proteini (CK2) geninin siRNA ile baskılanması diğer genlerin baskılanmasına göre HEP-2 hücrelerinin canlılığını daha çok inhibe etmiştir.

#### 4.3.2 xCELLingence Gerçek Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi

Hücre indeksi her kuyuda farklı şekilde ve sürede artıp azalabilir. Sonuçların hesaplanması sırasında tüm kuyuların aynı seviyede olduğunu varsayabilmek ve doğru hesaplama yapabilmek için “normalize hücre indeks değeri” her hücre seviyesi için sıfır noktası olarak kullanılmaktadır. Normalize hücre indeksi zamanı, hücrelere test numunelerinin uygulandığı zamandır. Bu analiz için normalizasyon zamanı 23:18:20’dir. Yani bu süre, hücrelerin plakaya ekimini müteakip test numunelerinin uygulandığı ana kadar geçen inkübasyon süresini göstermektedir.

Grafik verileri, sıfırdan zamandan itibaren ve normalizasyon zamanı üzerine 24 saat eklenerek oluşturulmuş ve raporda sunulmuştur.

Canlılık oranlarında konsantrasyon artışına bağlı, belirgin bir fark gözlenmediği için hücrelere uygulanan test numuneleri için hücrelerin canlılığını %50 azaltan konsantrasyon (Inhibition Concentration, IC<sub>50</sub>) değerleri hesaplanamamış, sadece eş zamanlı görüntüleme üzerinden elde edilen empedans değerleri grafiksel veriler şeklinde raporda sunulmuştur.

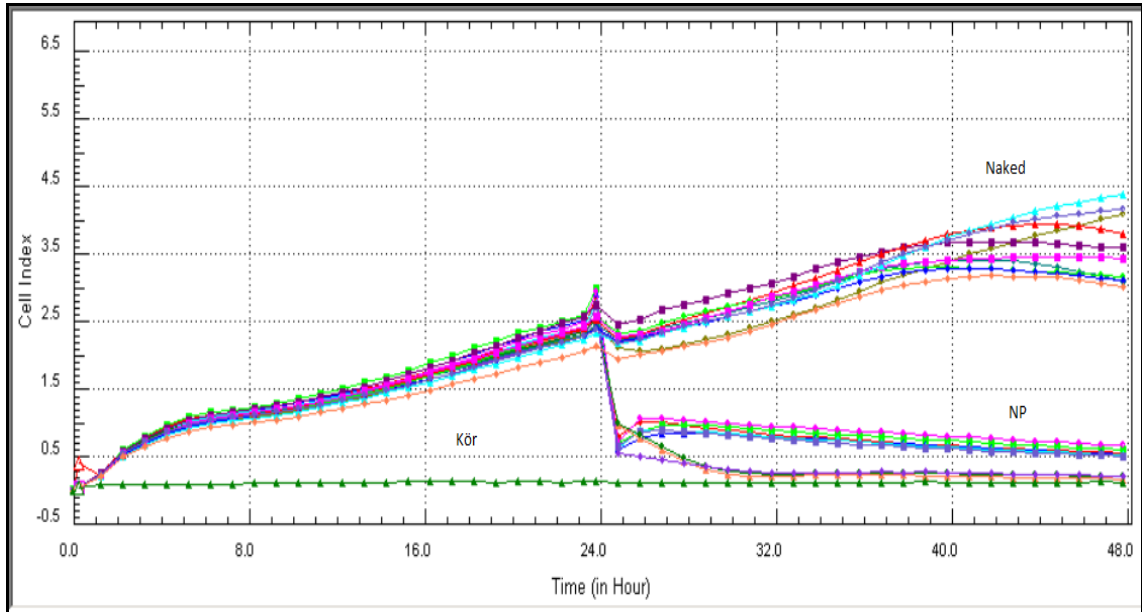
Test numunelerinin ve kontrol gruplarının plakadaki yerleşim düzeni aşağıda Şekil 4-45’de gösterilmiştir. Sonuç raporu içinde geçen tüm renk skalaları bu yerleşime göre göz önüne alınmalıdır.

|   | 1                      | 2                              | 3                              | 4                              | 5                           | 6                           | 7                           | 8                            | 9                            | 10                           | 11                     | 12                     |
|---|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| A | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.14µM)  | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.28µM)  | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.56µM)  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.14µM  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.28µM  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.56µM  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.14µM)  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.28µM)  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.56µM)  | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>CONTROL |
| B | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.14µM)  | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.28µM)  | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.56µM)  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.14µM  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.28µM  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.56µM  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.14µM)  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.28µM)  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.56µM)  | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>CONTROL |
| C | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.14µM)  | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.28µM)  | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.56µM)  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.14µM  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.28µM  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.56µM  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.14µM)  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.28µM)  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.56µM)  | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>CONTROL |
| D | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.14µM)  | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.28µM)  | MEK2 (5000)<br>ASHL2 (0.56µM)  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.14µM  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.28µM  | MEK2 (5000)<br>CSKN 0.56µM  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.14µM)  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.28µM)  | MEK2 (5000)<br>CD1 (0.56µM)  | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>CONTROL |
| E | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.14µM) | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.28µM) | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.56µM) | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.14µM | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.28µM | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.56µM | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.14µM) | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.28µM) | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.56µM) | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>CONTROL |
| F | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.14µM) | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.28µM) | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.56µM) | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.14µM | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.28µM | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.56µM | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.14µM) | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.28µM) | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.56µM) | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>CONTROL |
| G | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.14µM) | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.28µM) | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.56µM) | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.14µM | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.28µM | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.56µM | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.14µM) | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.28µM) | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.56µM) | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>CONTROL |
| H | MEK2 (5000)<br>CONTROL | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.14µM) | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.28µM) | MEK2 (5000)<br>NASHL2 (0.56µM) | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.14µM | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.28µM | MEK2 (5000)<br>NCSKN 0.56µM | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.14µM) | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.28µM) | MEK2 (5000)<br>NCD1 (0.56µM) | MEK2 (5000)<br>CONTROL | KOR<br>BLANK           |

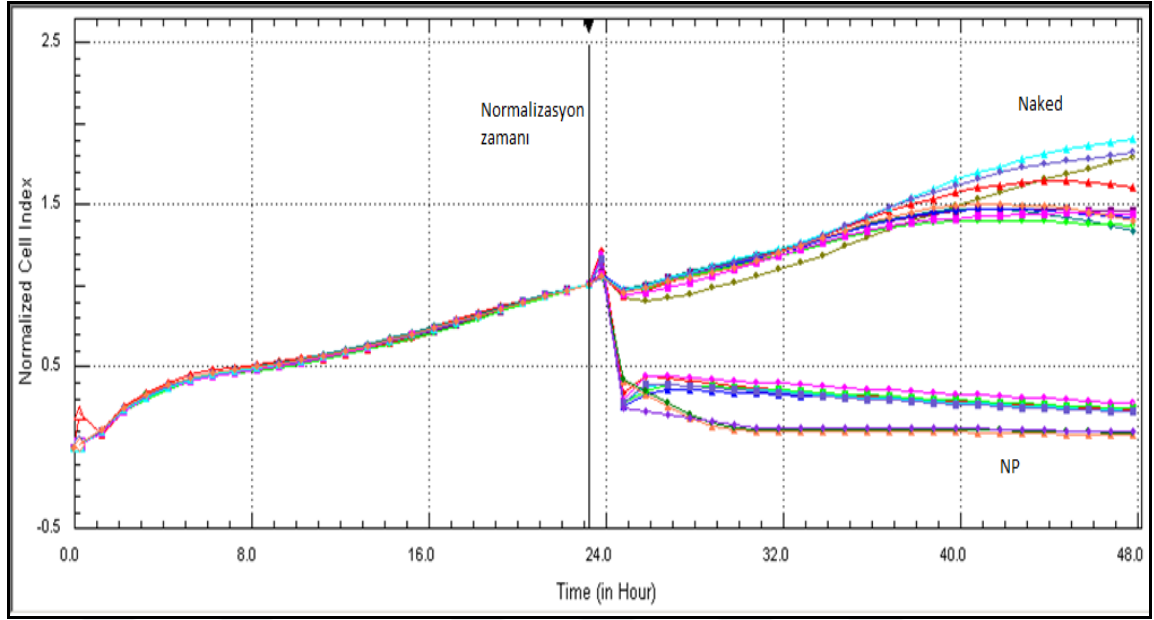
Şekil 4-45 96 kuyulu e-plaka yerleşim düzeni

xCELLigence RTCA MP Sisteminden elde edilen, HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine, test numunelerinin etkilerine ait 24 saatlik sonuçlara dair veriler grafiklerde sunulmuştur. Test numunelerinin tamamı hücre indeksi (Şekil 4-46) ve normalize zaman çizgisi işaretlenmiş normalize hücre indeksi verileri (Şekil 4-47) olarak ayrı iki grafikte sunulmuştur. HEp-2 hücreleri için logaritmik eğri durumuna göre numuneler hücreye hücre indeks değeri ~2.5 iken 23. saatte (Normalizasyon zamanı: 23:18:20, maddelerin hücrelere verildiği andan itibaren sıfırlanma noktası) uygulanmıştır. Şekil 4-46 ve Şekil 4-47 verilerinin plaka düzenindeki kuyulara göre dağılımı (n=4) Şekil 4-48'de gösterilmiştir.

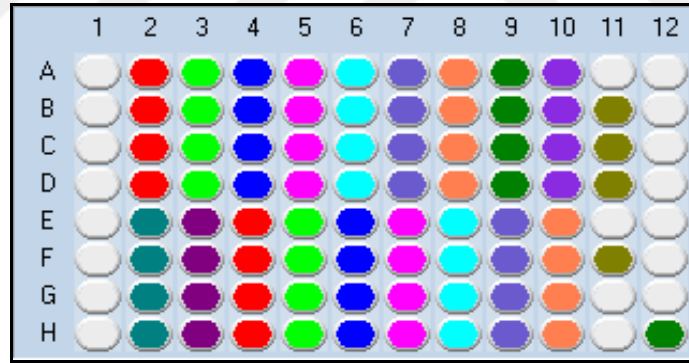
Sonuç verilerine göre, hücresiz besiyeri kontrol grubu (kör) göz önüne alındığında besiyerinden kaynaklanan herhangi bir kontaminasyon gözlenmemiştir. Hücreli normal kontrol grubu göz önüne alındığında, herhangi bir test maddesi uygulanmamış hücrelerdeki canlılığın diğer hücre gruplarından nispeten daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Nanopartikül-siRNA içeren test numunelerinin uygulandığı hücre gruplarındaki canlılığın çok düşük olduğu, nanopartikül içermeyen test numunelerinin (naked haldeki siRNA'ların) uygulandığı hücre gruplarındaki canlılığın ise yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4-46 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm test numunelerinin (ASHL2, CSKN, CD1, NASHL2, NCSKN, NCD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin hücre indeksi ile gösterilmesi



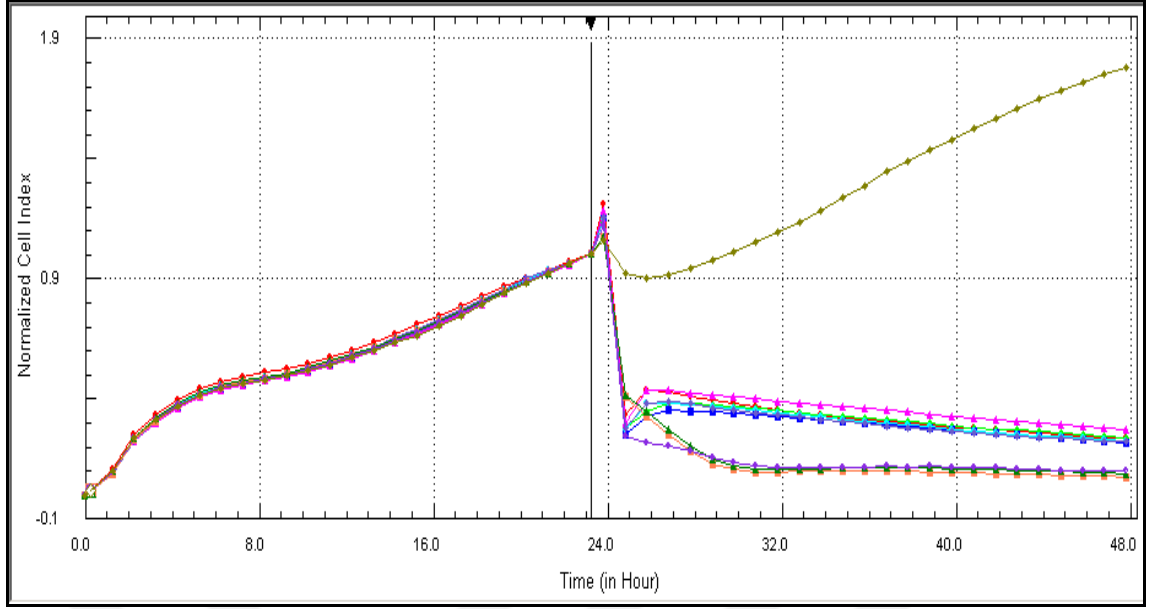
Şekil 4-47 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm test numunelerinin (ASHL2, CSKN, CD1, NASHL2, NCSKN, NCD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)



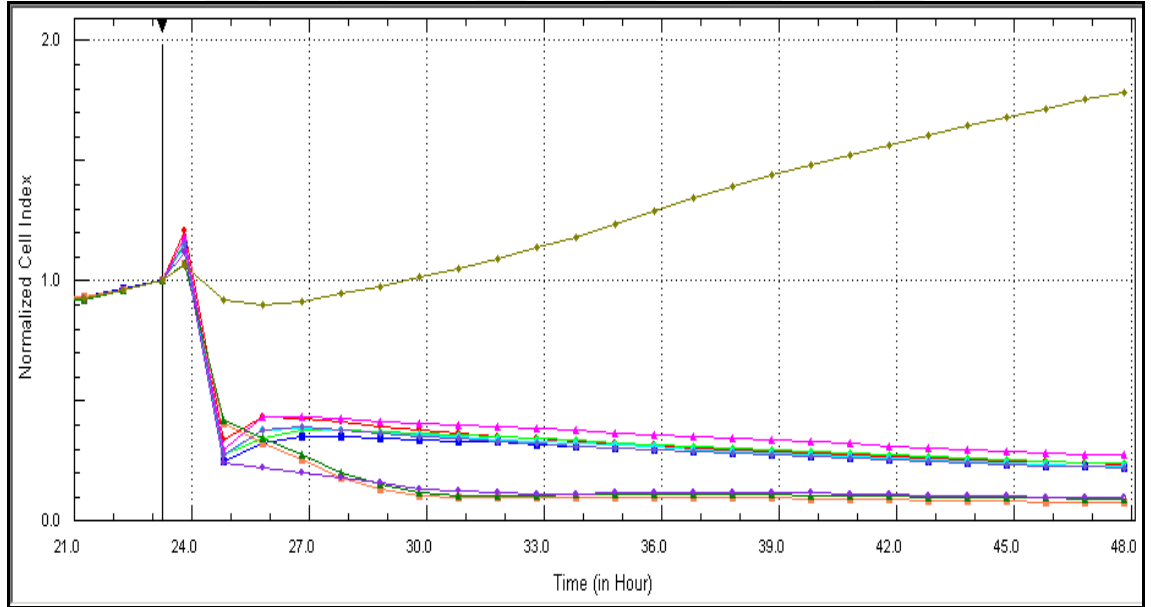
Şekil 4-48 Plaka düzenine göre Şekil 4-46 ve Şekil 4-47 verileri için renk skalası

xCELLigence RTCA MP Sisteminden elde edilen, HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine, 3 farklı nanopartikül grubunun etkilerine ait 24 saatlik sonuçlara dair veriler grafiklerde sunulmuştur. Normalize zaman çizgisi işaretlenmiş, normalize hücre indeksi verileri Şekil 4-49'da sunulmuştur.

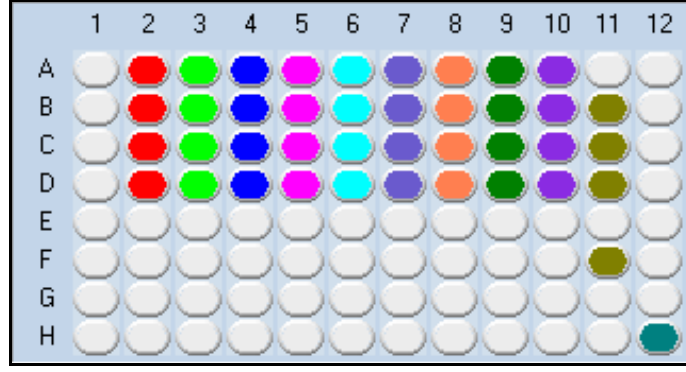
Şekil verilerinin daha net görülebilmesi açısından normalizasyon zamanına yakın 21. saatten itibaren yakınlştırılmış görseldeki normalize hücre indeksi verileri Şekil 4-50 (Şekil 4-49'un yakınlştırılmış hali) gösterilmiştir. Şekil 4-49 ve Şekil 4-50 verilerine dair renk skalası ise Şekil 4-51'de sunulmuştur.



Şekil 4-49 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm nanopartiküllü test numunelerinin (ASHL2, CSKN, CD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)

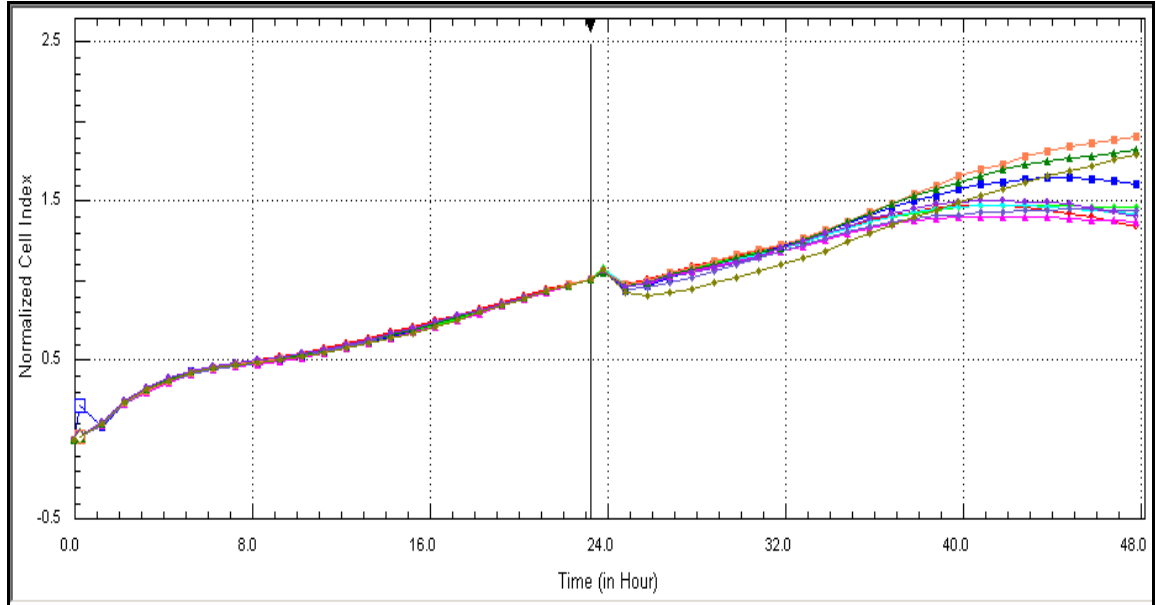


Şekil 4-50 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm nanopartiküllü test numunelerinin (ASHL2, CSKN, CD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)

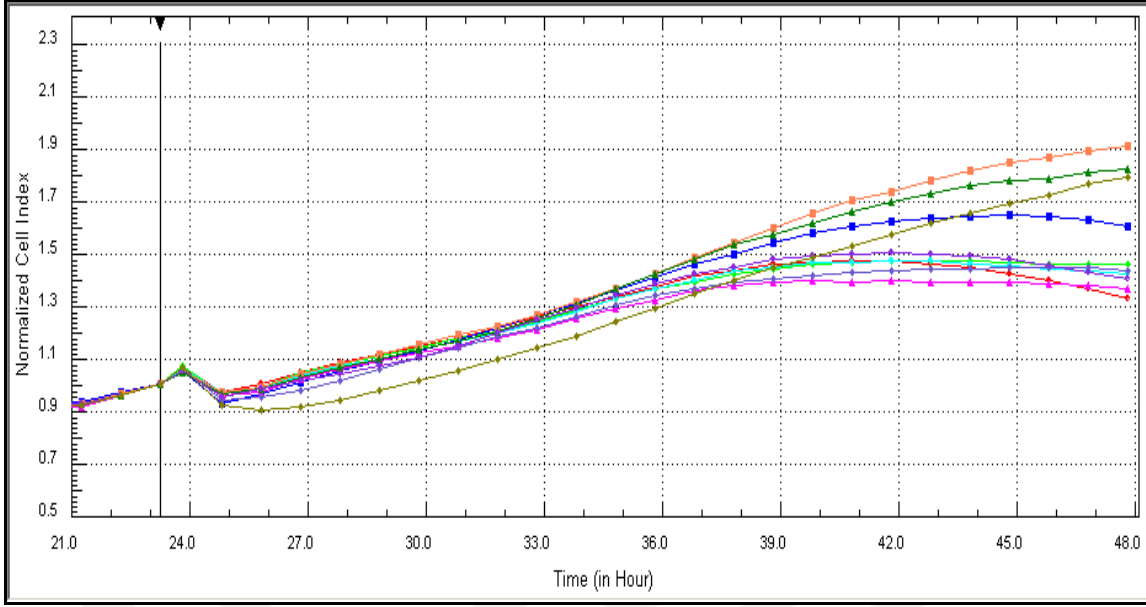


Şekil 4-51 Plaka düzenine göre nanopartiküllü test numunelerinin Şekil 4-49 ve Şekil 4-50 verileri için renk skalası

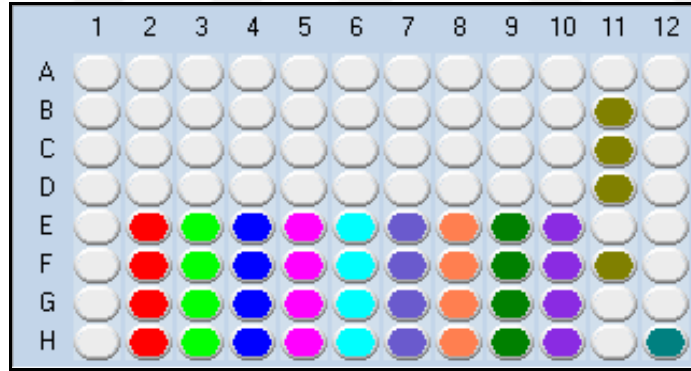
xCELLigence RTCA MP Sisteminden elde edilen, HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine, 3 farklı nanopartikül içermeyen (naked) grubun etkilerine ait 24 saatlik sonuçlara dair veriler grafiklerde sunulmuştur. Normalize zaman çizgisi işaretlenmiş normalize hücre indeksi verileri Şekil 4-52’de sunulmuştur. Şekil verilerinin daha net görülebilmesi açısından normalizasyon zamanına yakın 21. saatten itibaren yakınlaştırılmış görseldeki normalize hücre indeksi verileri Şekil 4-53’de (Şekil 4-52’nin yakınlaştırılmış hali) gösterilmiştir. Şekil 4-52 ve Şekil 4-53 verilerine dair renk skalası ise Şekil 4-54’te sunulmuştur.



Şekil 4-52 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm nanopartikülsüz test numunelerinin (NASHL2, NCSKN, NCD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)

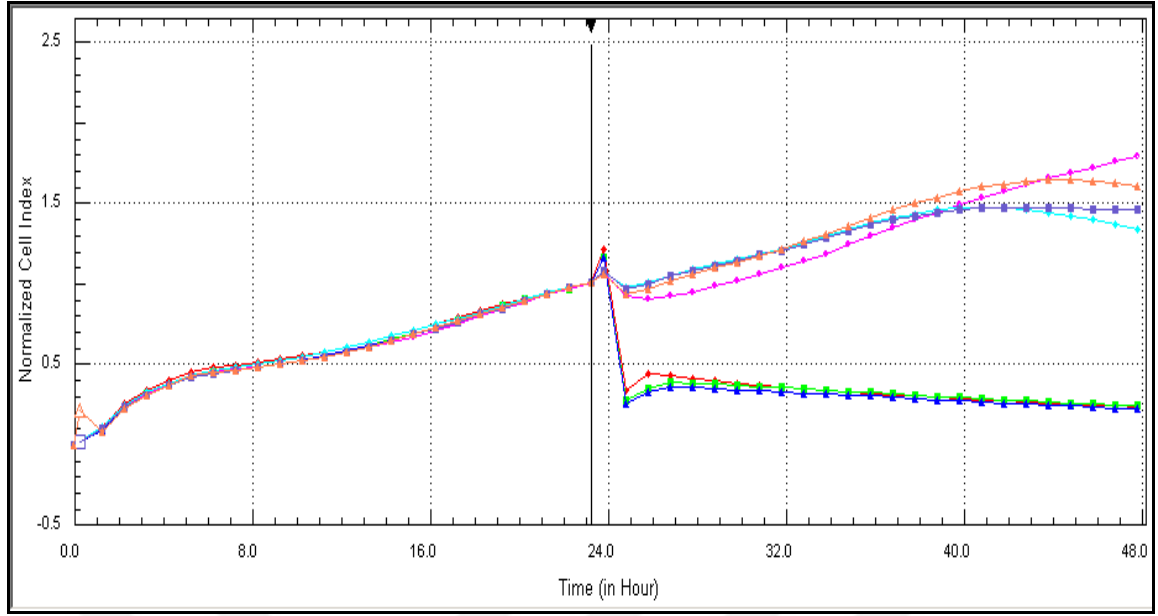


Şekil 4-53 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine tüm nanopartikülsüz test numunelerinin (NASHL2, NCSKN, NCD1 siRNA) ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)

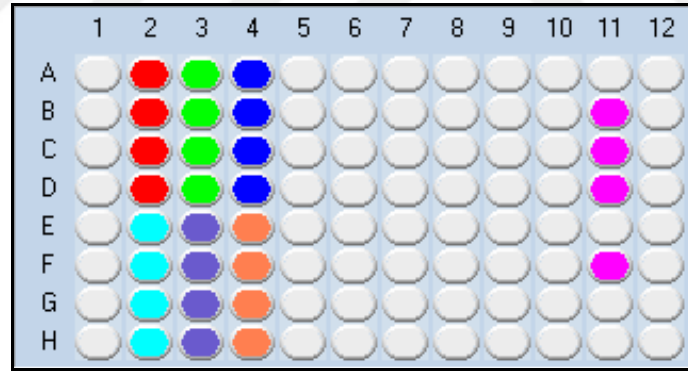


Şekil 4-54 Plaka düzenine göre nanopartikülsüz test numunelerinin Şekil 4-52 ve Şekil 4-53 verileri için renk skalası

xCELLigence RTCA MP Sisteminden elde edilen, HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine, nanopartiküllü (ASHL2) ve nanopartikülsüz (NASHL2) grupların 3 farklı konsantrasyonunun etkilerine ait 24 saatlik sonuçlara dair normalize zaman çizgisi işaretlenmiş, normalize hücre indeksi verileri Şekil 4-55'de sunulmuş buna dair renk skalası ise Şekil 4-56'da sunulmuştur.

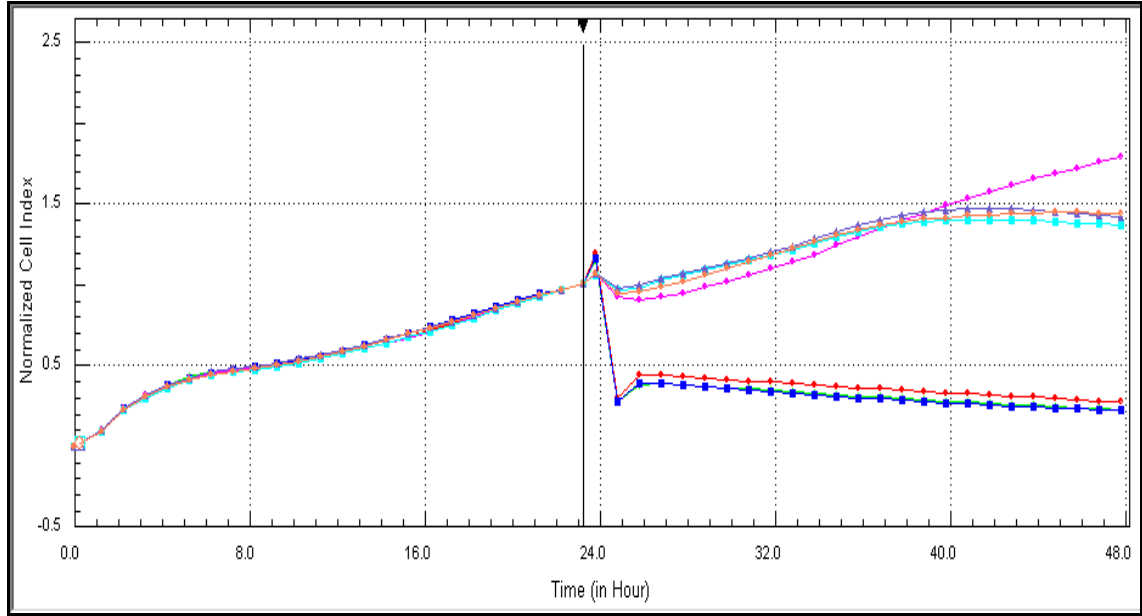


Şekil 4-55 HEP-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine nanopartiküllü (ASHL2 siRNA) ve nanopartikülsüz (NASHL2) test numunelerinin ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)

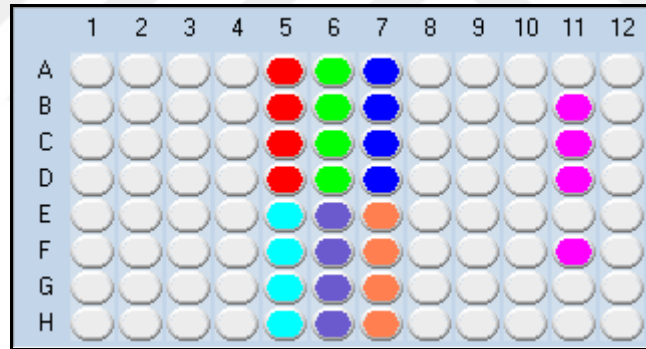


Şekil 4-56. Plaka düzenine göre nanopartiküllü (ASHL2 siRNA) ve nanopartikülsüz (NASHL2) test numunelerinin Şekil 4-55 verileri için renk skalası

xCELLigence RTCA MP Sisteminden elde edilen, HEP-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine, nanopartiküllü (CSKN) ve nanopartikülsüz (NCSKN) grupların 3 farklı konsantrasyonunun etkilerine ait 24 saatlik sonuçlara dair normalize zaman çizgisi işaretlenmiş, normalize hücre indeksi verileri şekil 4-57'de sunulmuş buna dair renk skalası ise Şekil 4-58'de sunulmuştur.

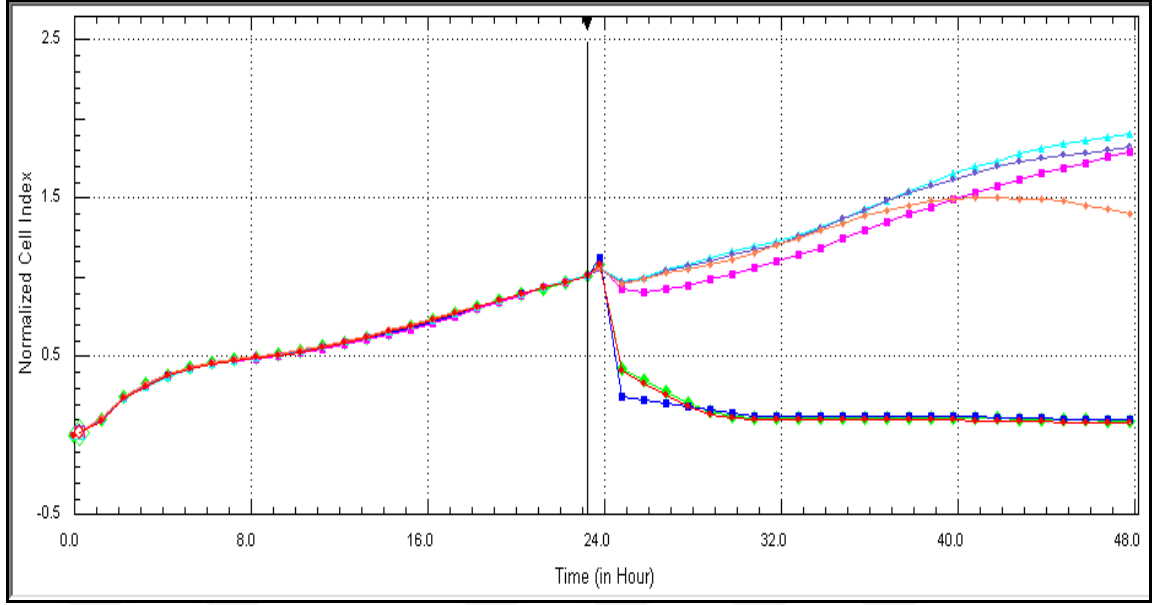


Şekil 4-57. HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine nanopartiküllü (CSKN siRNA) ve nanopartikülsüz (NCSKN) test numunelerinin ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)

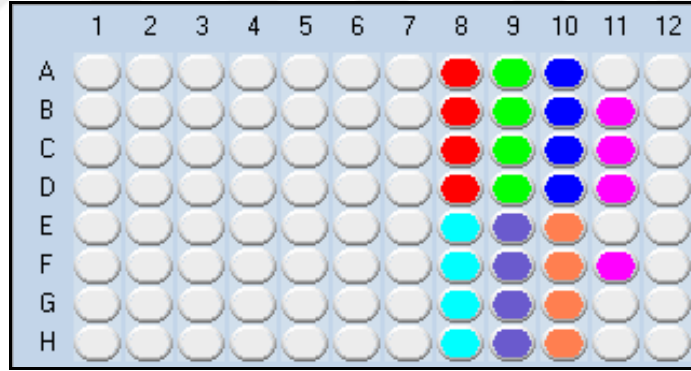


Şekil 4-58. Plaka düzenine göre nanopartiküllü (CSKN siRNA) ve nanopartikülsüz (NCSKN) test numunelerinin Şekil 4-57 verileri için renk skalası

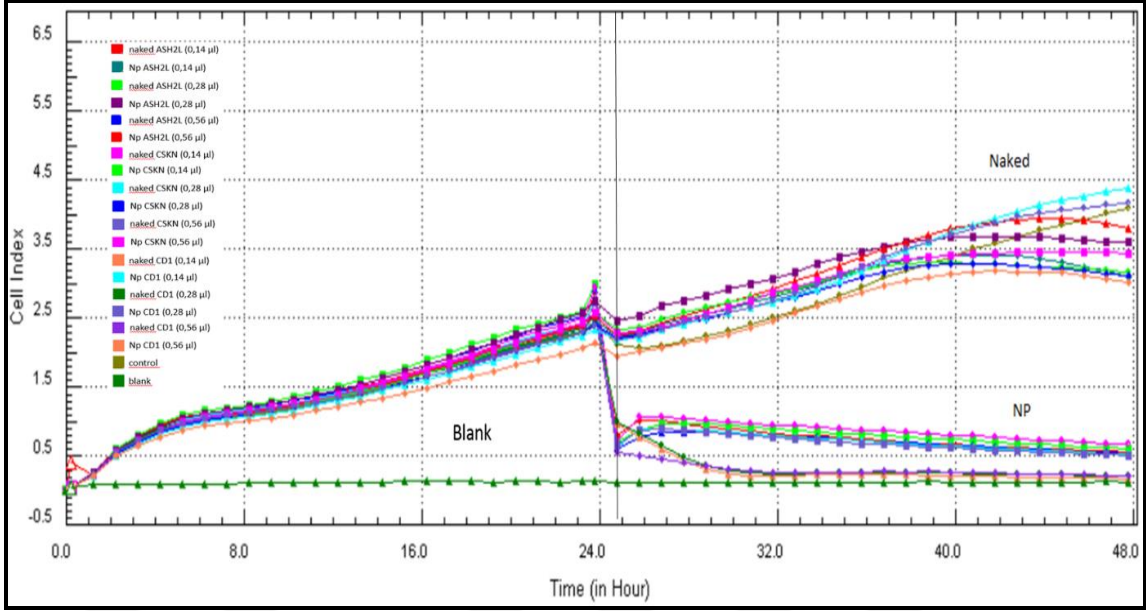
xCELLigence RTCA MP Sisteminden elde edilen, HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine, nanopartiküllü (CD1) ve nanopartikülsüz (NCD1) grupların 3 farklı konsantrasyonunun etkilerine ait 24 saatlik sonuçlara dair normalize zaman çizgisi işaretlenmiş, normalize hücre indeksi verileri Şekil 4-59'da sunulmuş buna dair renk skalası ise Şekil 4-60'da sunulmuştur.



Şekil 4-59. HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine nanopartiküllü (CD1 siRNA) ve nanopartikülsüz (NCD1) test numunelerinin ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)



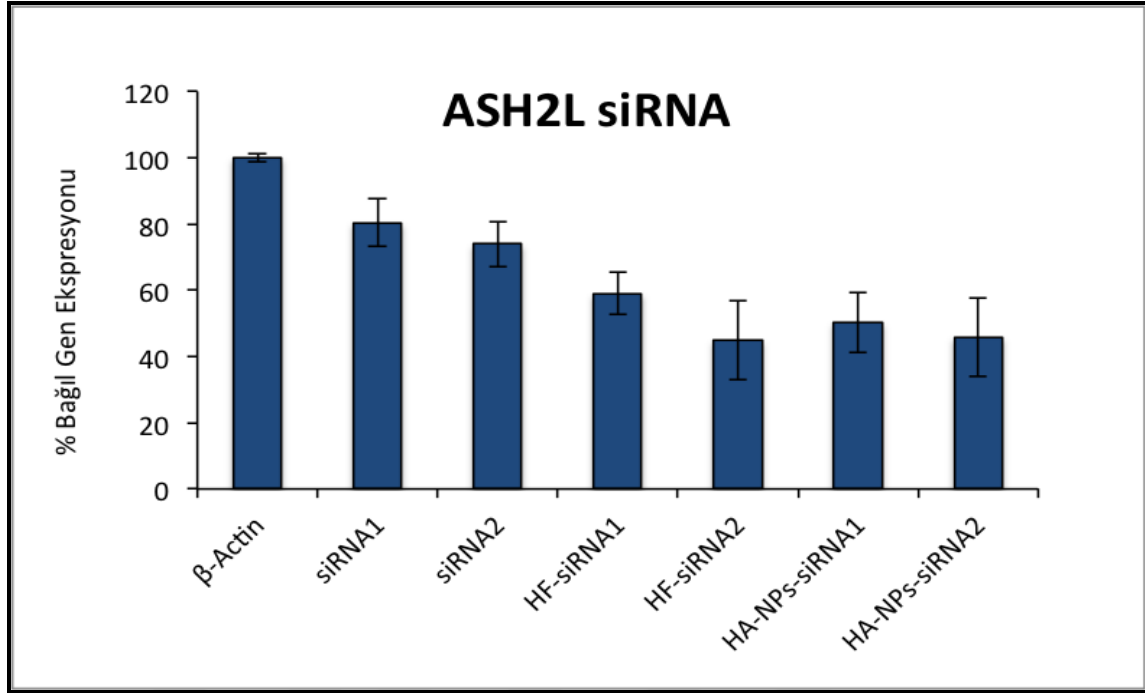
Şekil 4-60. Plaka düzenine göre nanopartiküllü (CD1 siRNA) ve nanopartikülsüz (NCD1) test numunelerinin Şekil 4-59 verileri için renk skalası



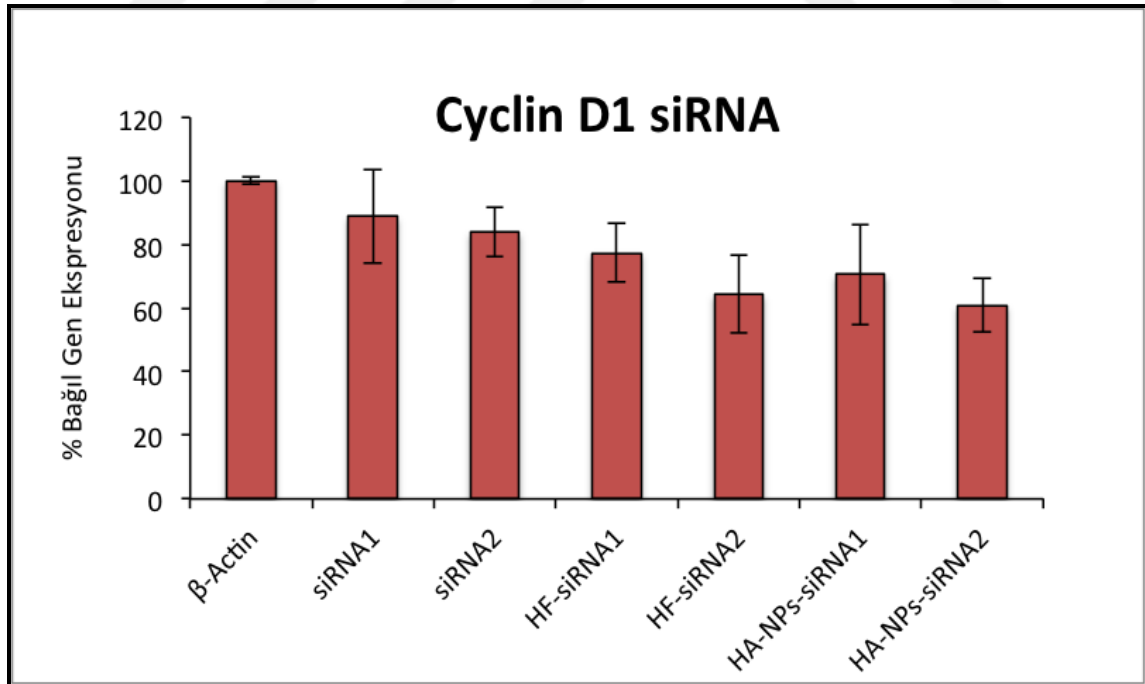
Şekil 4-61 HEp-2 hücrelerinin proliferasyonu üzerine nanopartiküllü ve nanopartikülsüz siRNA test numunelerinin ve tüm konsantrasyonlarının 24 saatlik etkisinin 21. saatten itibaren normalize hücre indeksi ile gösterilmesi (Normalizasyon zamanı; 23:18:20)

#### 4.3.3 Real Time PCR Analizi

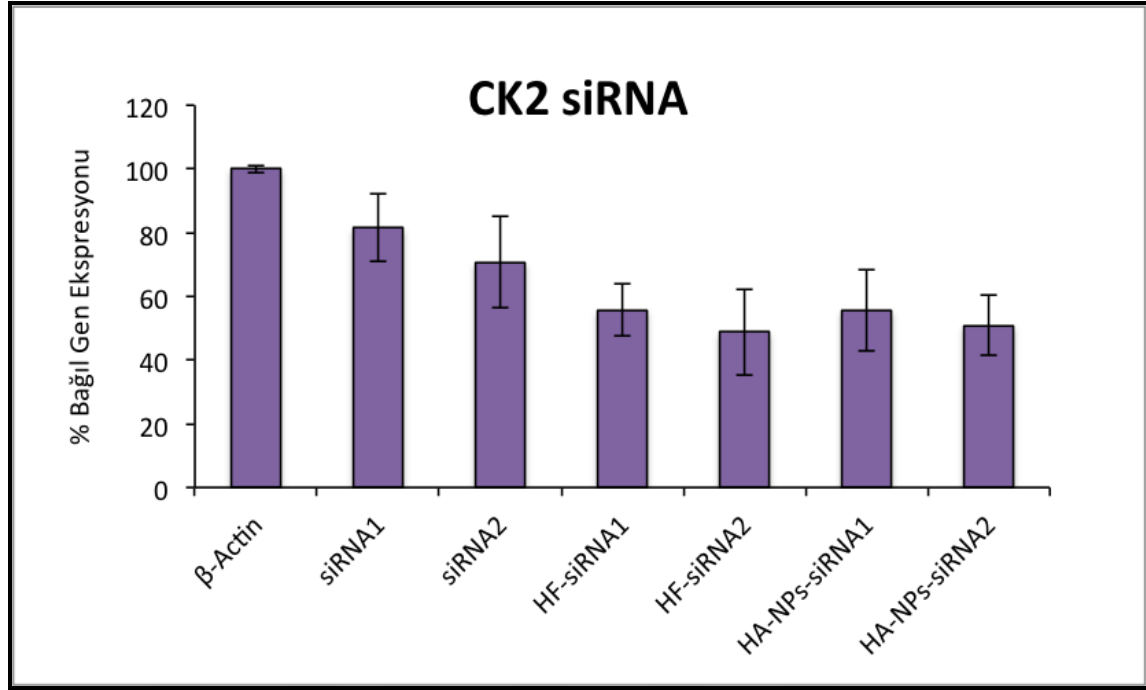
ASH2L, CK2 ve Siklin D1 genlerinin hücrelere verilen siRNA ile inhibe edildiğini göstermek amacıyla Real Time RT-PCR analizi yapılmıştır. Bu amaçla önce HEp-2 larinks kanseri hücreleri 6 kuyucuklu plaklara  $1.25 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler çeşitli deney grupları ile 48 saat muamele edilmiştir. Ardından tüm kuyucuklardaki hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Her bir gruptan izole edilen RNA'lerden cDNA sentezlemek için aşağıdaki RT<sup>2</sup> HT First Strand Kit (Qiagen, Almanya) protokolü takip edilmiştir. Son olarak çalışılan gruplarda siRNA ile baskılanan CK2 ve ASH2L genlerinin ifadenmesinin inhibe edildiğini göstermek amacıyla gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla data analizi yapılarak hedeflenen genlerin siRNA ile hangi oranda inhibe edildiğine, referans genin ekspresyon seviyesiyle kıyaslanarak ulaşılmış olup, sonuçlar Şekil 4-62, 4-63 ve Şekil 4-64'de verilmiştir.



Şekil 4-62. Farklı miktarlardaki ASH2L siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece ASH2L siRNA'ların HEP-2 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen RT-PCR analizi (siRNA1: 2,85µg (10µl); siRNA2: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir, n=3)



Şekil 4-63. Farklı miktarlardaki Cyclin D1 siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece Cyclin C1 siRNA'ların HEP-2 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen RT-PCR analizi (siRNA1: 2,85µg (10µl); siRNA2: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama  $\pm$  SD olarak verilmiştir, n=3)



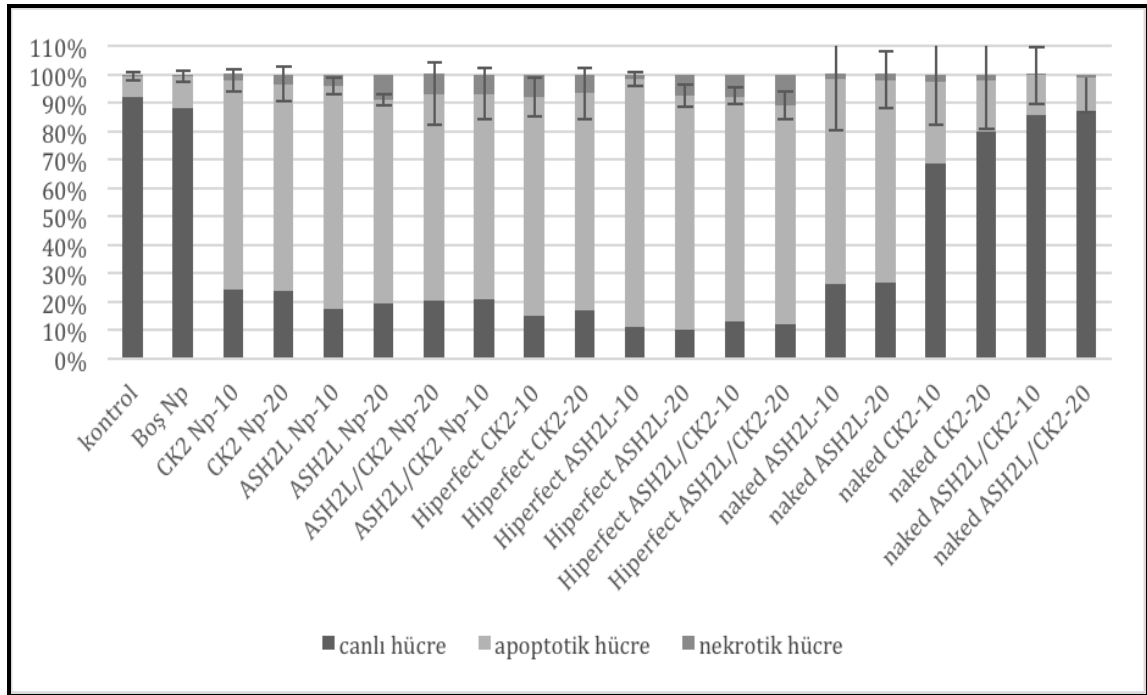
Şekil 4-64. Farklı miktarlardaki CK2 siRNA ile etkileştirilen nanopartikül ve ticari taşıyıcı HiperFect'in ve sadece CK2 siRNA'ların HEp-2 hücreleri ile etkileştirilmesi sonucu elde edilen RT-PCR analizi (siRNA1: 2,85µg (10µl); siRNA2: 5,7µg (20µl). HF: HiperFect ticari taşıyıcı) (Değerler ortalama ± SD olarak verilmiştir, n=3)

RT-PCR analizinde şekil 4-62, 4-63 ve 4-64'de yer aldığı gibi herhangi bir taşıyıcı olmaksızın sadece siRNA'larla hücreler muamele edildiğinde yaklaşık % 25 bağıl gen susturulması gözlenmiştir. Ticari taşıyıcı olarak HiperFect kullanıldığında ise bu oran oldukça artmıştır. Sonuçlara göre, her üç genin ekspresyonunun inhibe edilmesinde tez kapsamında sentezlenen Hylarunorik asit ile modifiye edilmiş PLL ile dekore edilmiş ipek protein nanopartiküllerinin taşıyıcı olarak üstünlüğü görülmektedir. Üç gen kendi içinde incelendiğinde Cyclin D1 genine göre ASH2L ve CK2 genleri nanopartikül aracılığıyla daha çok baskılandığı için bundan sonraki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarına bu iki gen ile devam edilmiştir.

#### 4.3.4 Akış Sitometrisi ile Annexin V-PI analizi

ASH2L ve CK2 genlerini susturmak üzere hazırlanan ipek protein NPs-siRNA formülasyonlarının, sadece siRNA'ların ve HiperFect-siRNA sistemlerinin HEp-2 hücreleri üzerindeki ölüm yollarının apoptotik ve/veya nekrotik mi olduğunu araştırmak için Annexin-V-PI analizi yapılmıştır. Hücre ölüm analizi Akış Sitometrisi ile yapılmıştır.

Akış sitometri sonuçları incelendiğinde (Şekil 4-65, 4-66) çıplak (naked) siRNA'ların sonuçlarına bakıldığında apoptoz oranları da iyi sonuç vermemiş olması hem kimyasal hem de enzimatik olarak hücre kültürü ortamında degridasyona uğramasıdır. Bu çalışmada değişik literatürlerde de sunulduğu gibi siRNA'ların bir taşıyıcı sistem vasıtasıyla hedeflenmesinin daha efektif olduğu sonucunu göstermiştir. Şekil 4-65'de görüldüğü gibi siRNA yüklü ticari taşıyıcıların Hep-2 hücrelerini daha yüksek oranda apoptoza götürdüğü görülmektedir. Ticari taşıyıcılar ile nanopartiküler sistemler kıyaslandığında birbirine yakın sonuçlar gözlenmiştir. Ancak in vivo çalışmalarda nanopartiküllerin avantaj sağlayacağı öngörülmektedir. Tüm sonuçlar incelendiğinde örneklerdeki nekroze olma oranlarının düşük olması çalışmanın istenen bir bulgusu olmuştur. siRNA'lar arasında kıyaslamalara bakıldığında ASH2L geninin CK2'ye göre daha efektif olduğu ve birlikte kullanımlarda CK2'nin ASH2L geni aktifliğini baskıladığı görülmektedir. Dozlar kıyaslandığında in vitro çalışmalar için 10µl konsantrasyonlu örnekler çoğunlukla daha iyi baskılama göstermiştir. Sonuç olarak bu çalışmada ASH2L geninin CK2 genine oranla daha baskılayıcı özelliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

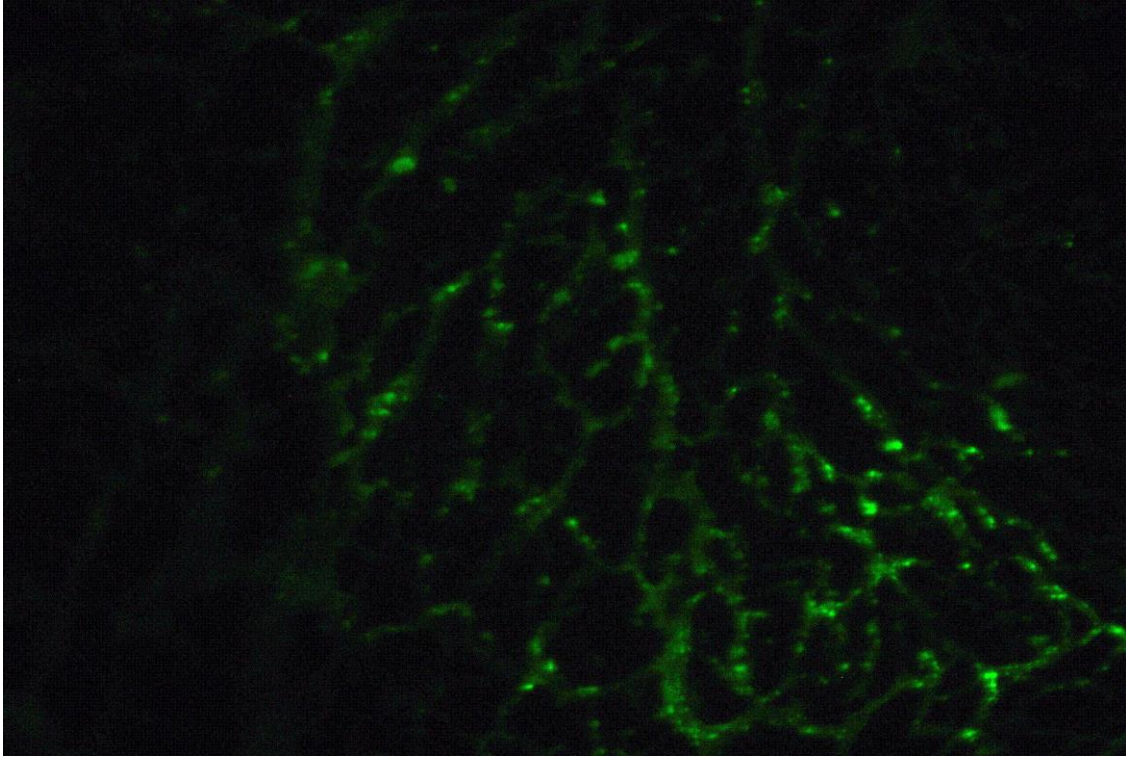


Şekil 4-65. Akış sitometrisi ile elde edilen in-vitro örneklerle inkübe edilmiş HEp-2 hücrelerinin yüzdesel apoptoz, nekroz ve canlı hücre grafiği (10 ve 20, kullanılan siRNA miktarının µl olarak ifadesidir).

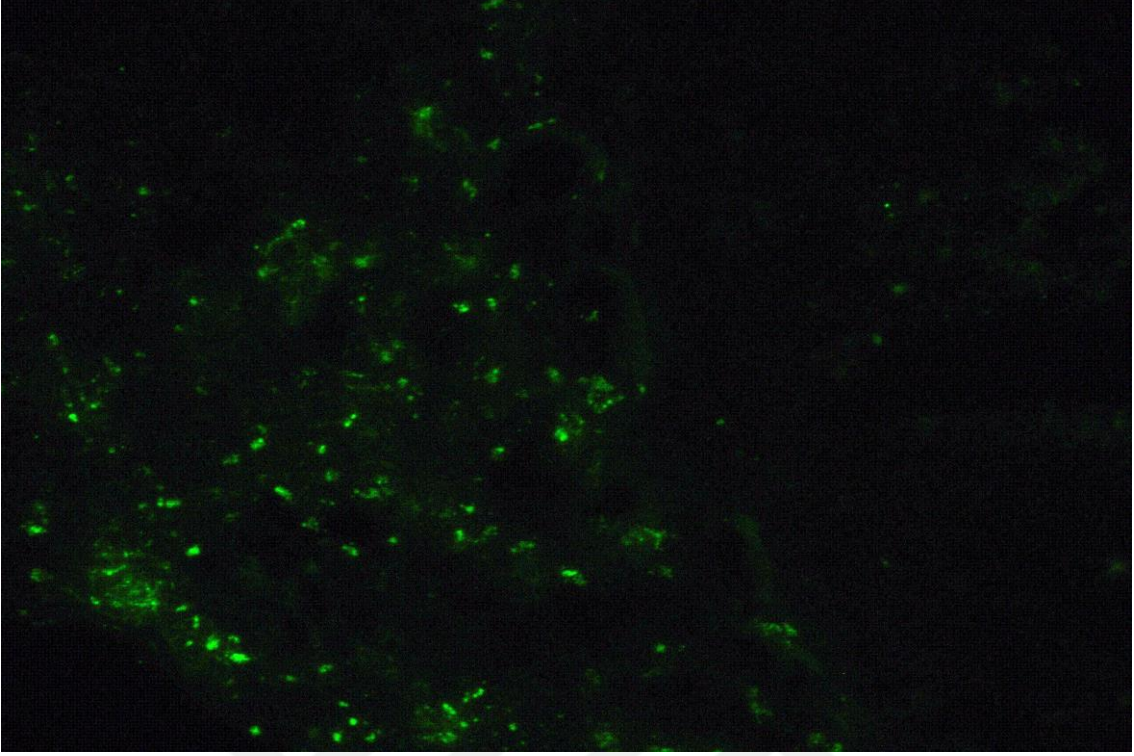
#### 4.4 siRNA yüklü ipek protein nanopartiküllerinin in vivo etkinlik testleri

##### 4.4.1 Tümör boyut analizi

Tedavi aşamasında nanopartiküllerin enjeksiyon yolu intravenöz ve intraperitoneal olarak uygulanarak en iyi hedeflemenin intraperitoneal olduğu gösterilmiştir (şekil 4-67 ve 4-68) 3' Fluorescein FITC (488-525 dalgaboyu arası) 6' FAM(3FI) (495-517dalgaboyu arası) : işaretli siRNA yüklenerek hazırlanmış hedefli nanopartiküller intravenöz ve intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Kuyruktan intravenöz uygulamada hayvan kuyruğunun çok ince olması sebebiyle sıkıntılı olması ve hedeflemenin şekil 75 ve 76'da görüldüğü üzere intraperitoneal uygulamada daha efektif olması sebebiyle çalışmanın tedavi aşaması intraperitoneal olarak sürdürülmüştür.

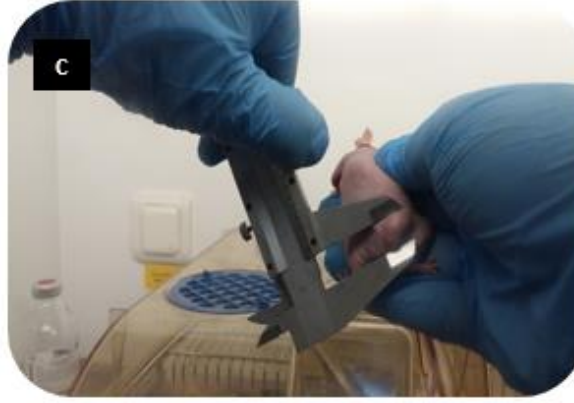
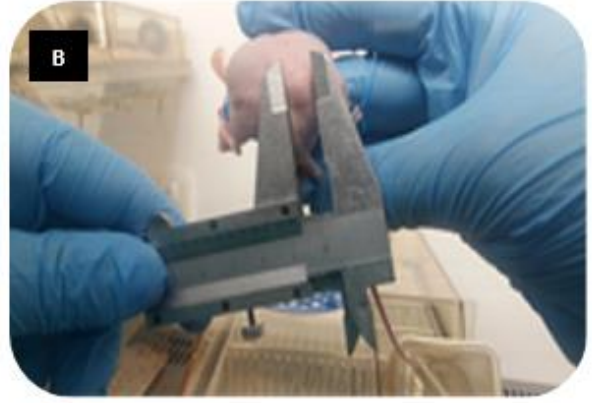
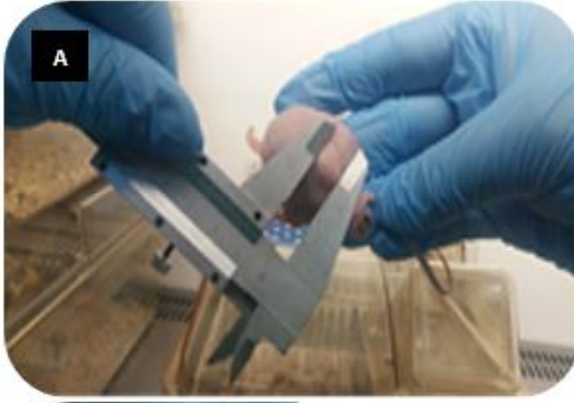


Şekil 4-66. intraperitoneal uygulama sonrasında tümör dokudan alınan örnekler

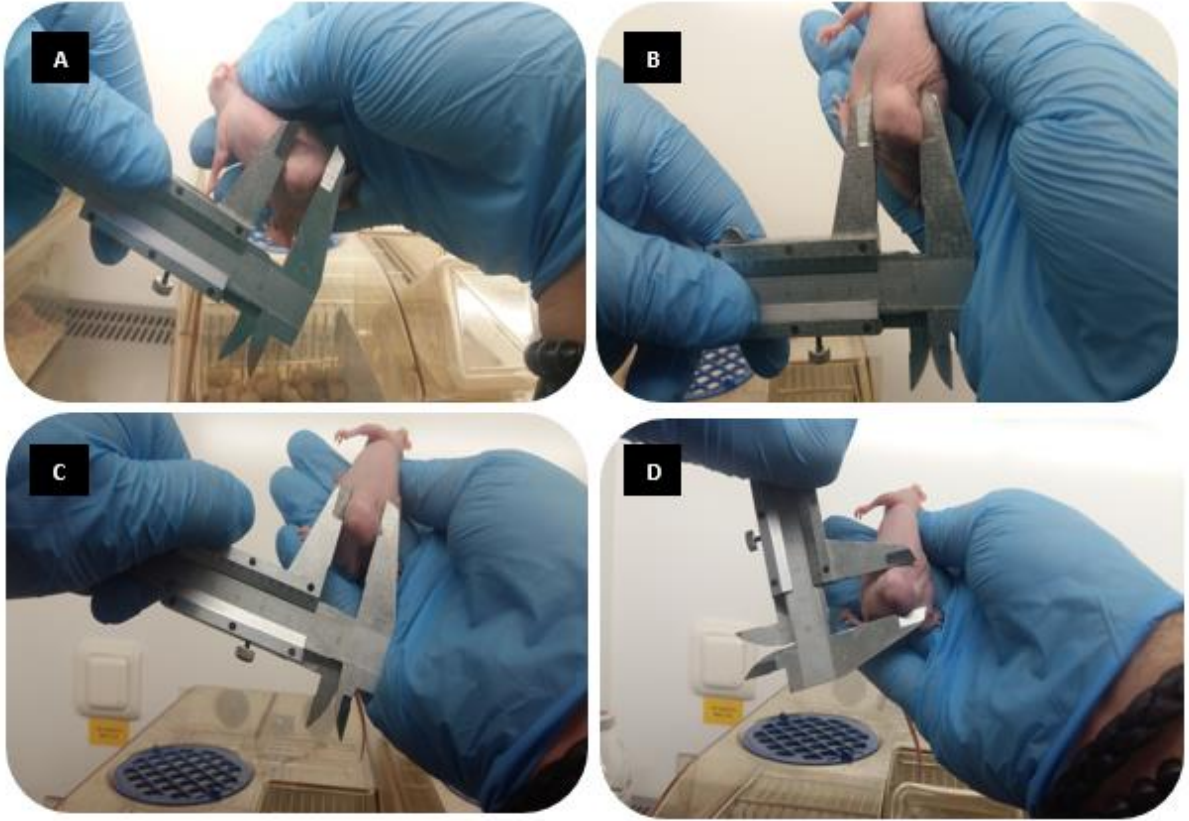


Şekil 4-67. intraperitoneal uygulama sonrasında tümör dokudan alınan örnekler

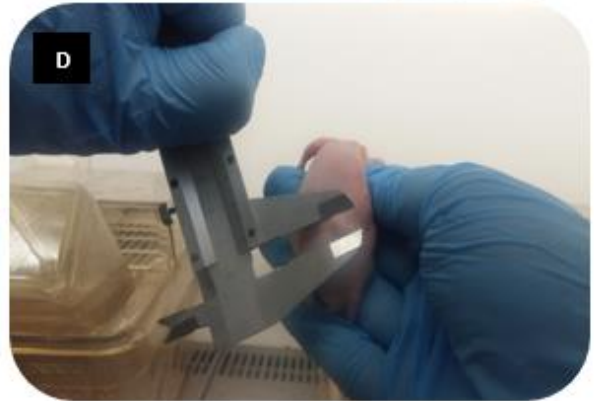
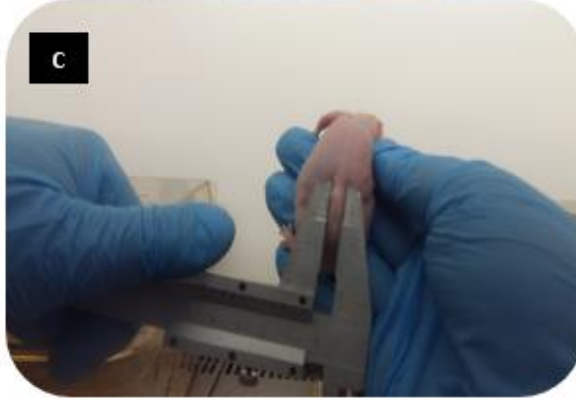
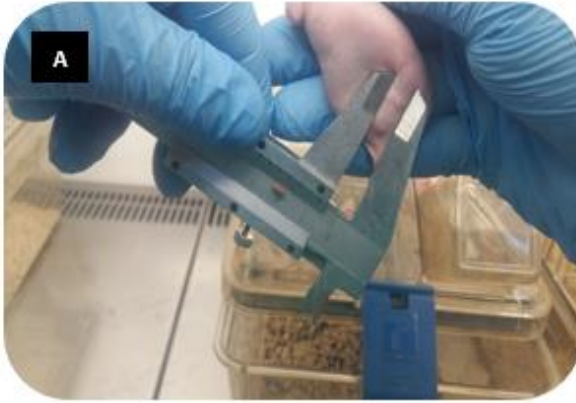
Aşağıda sunulan hayvan resimleri görüntü kalitesinin en iyi olduğu örnek hayvan fotoğraflara aittir.



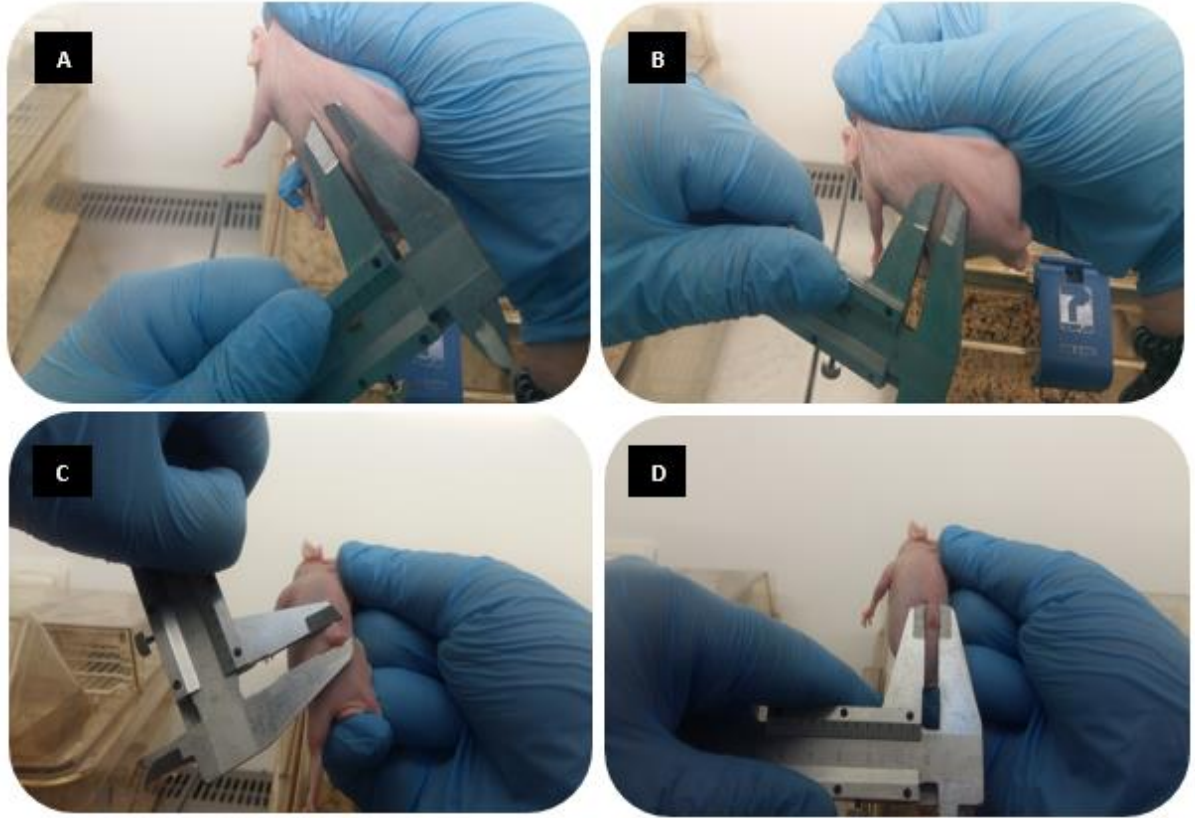
Şekil 4-68. Ligand ile modifiye edilmemiş boş NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler)



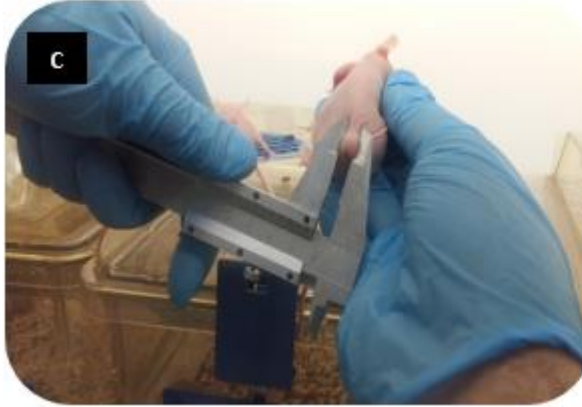
Şekil 4-69. Ligand ile modifiye edilmiş boş NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler)



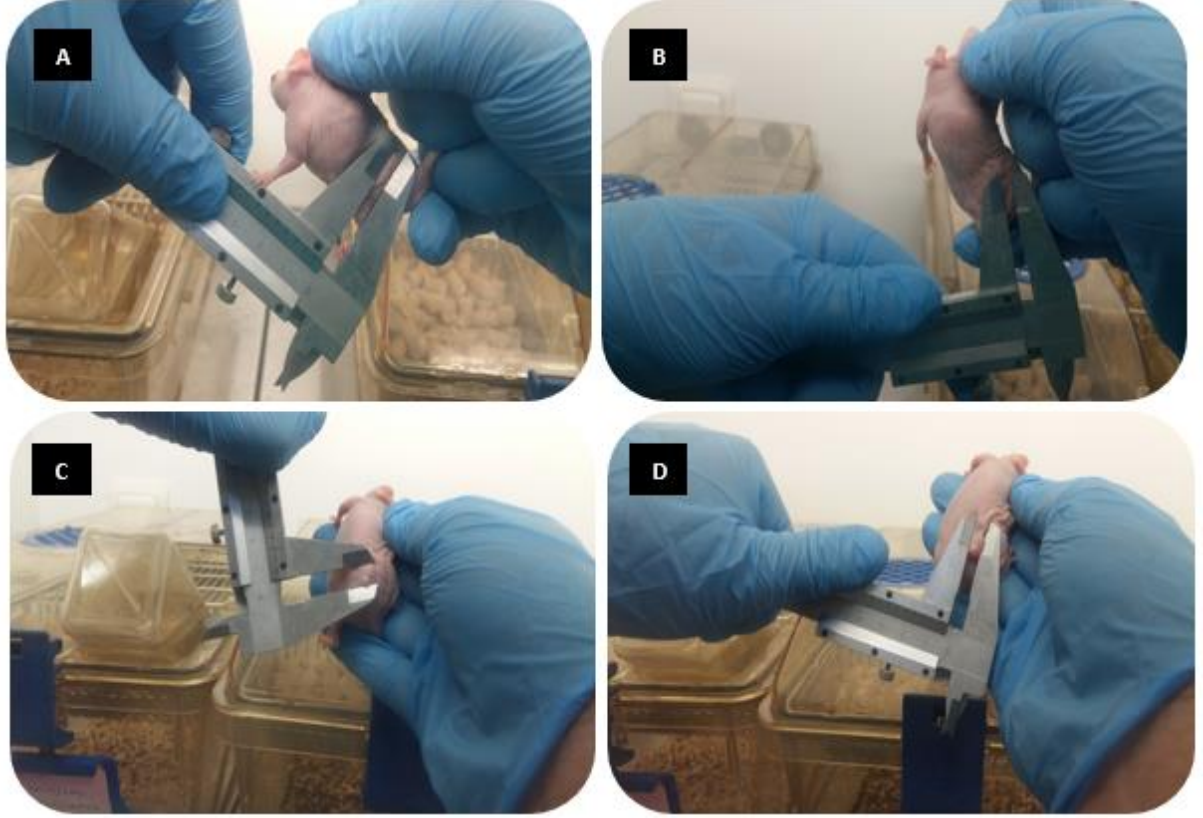
Şekil 4-70. Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L siRNA yüklü NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler)



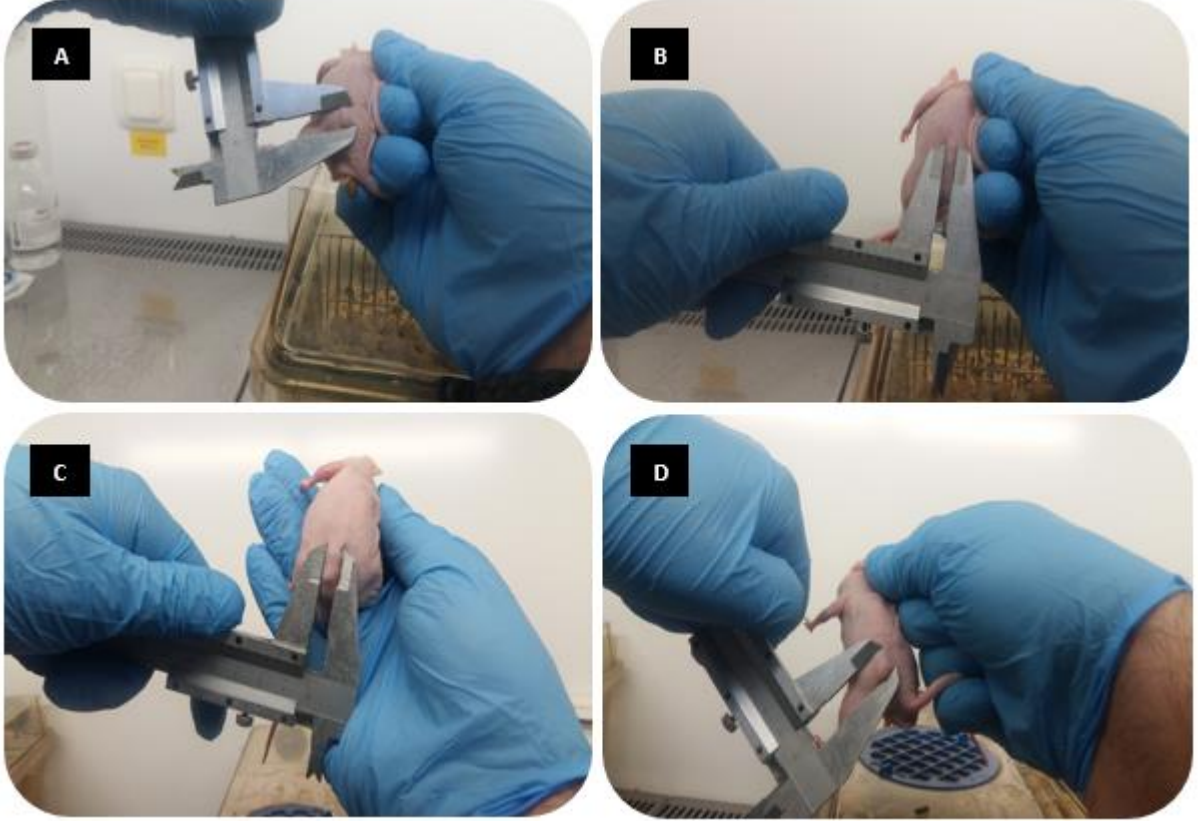
Şekil 4-71. Ligand ile modifiye edilmiş CK2 siRNA yüklü NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler)



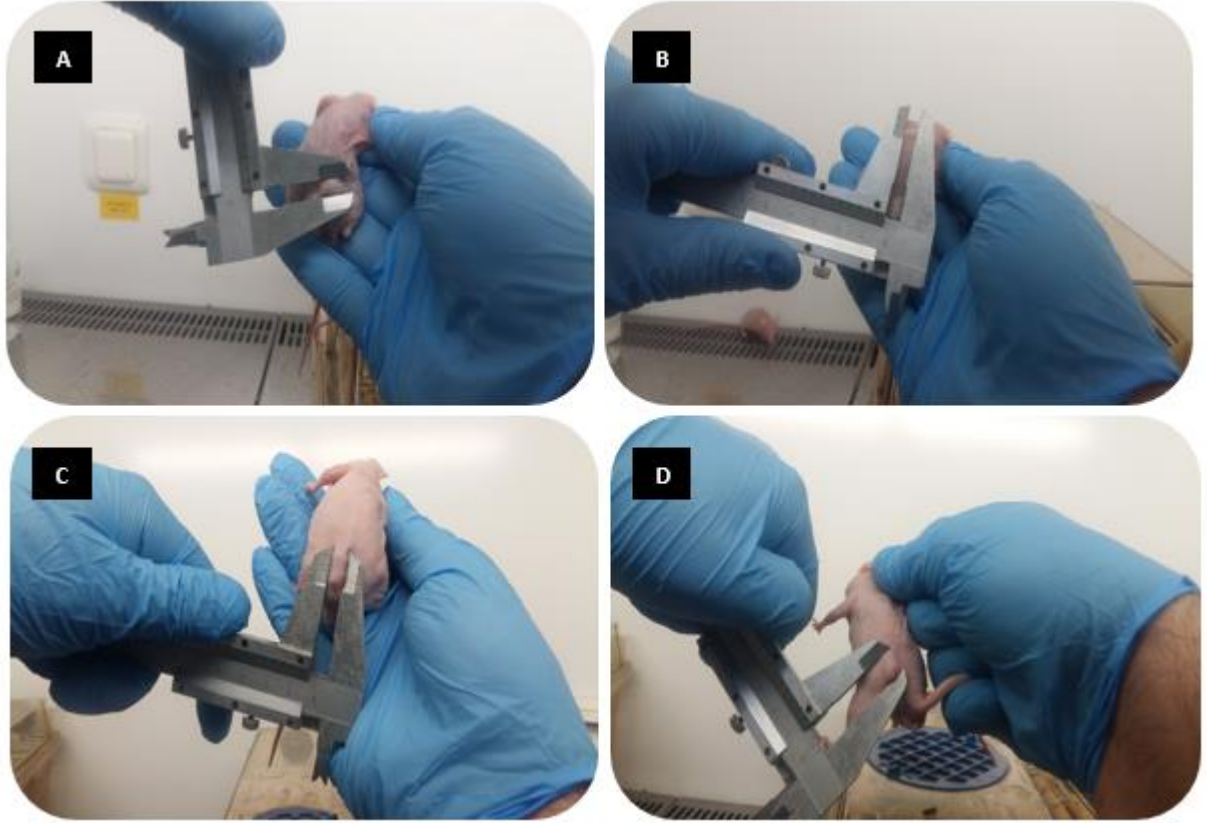
Şekil 4-72. Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L ve CK2 siRNA yüklü NPs (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler)



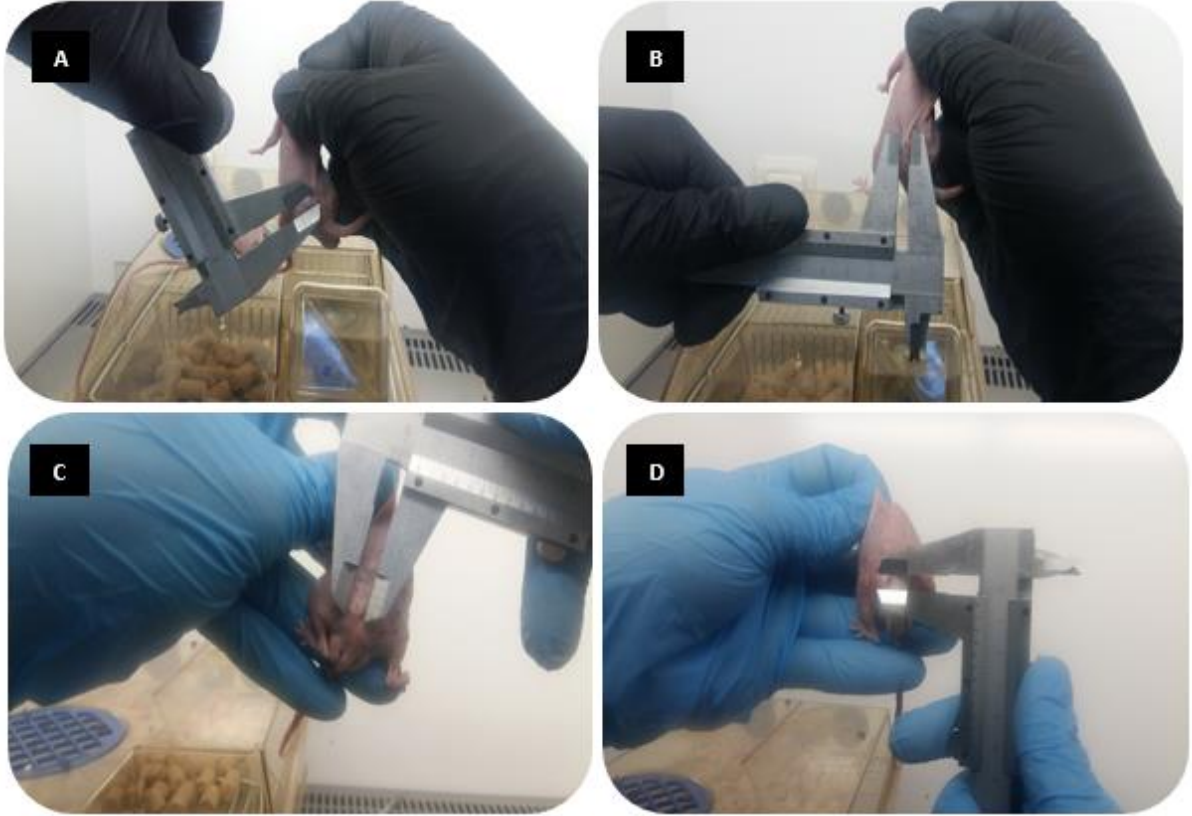
Şekil 4-73. ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect) (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler)



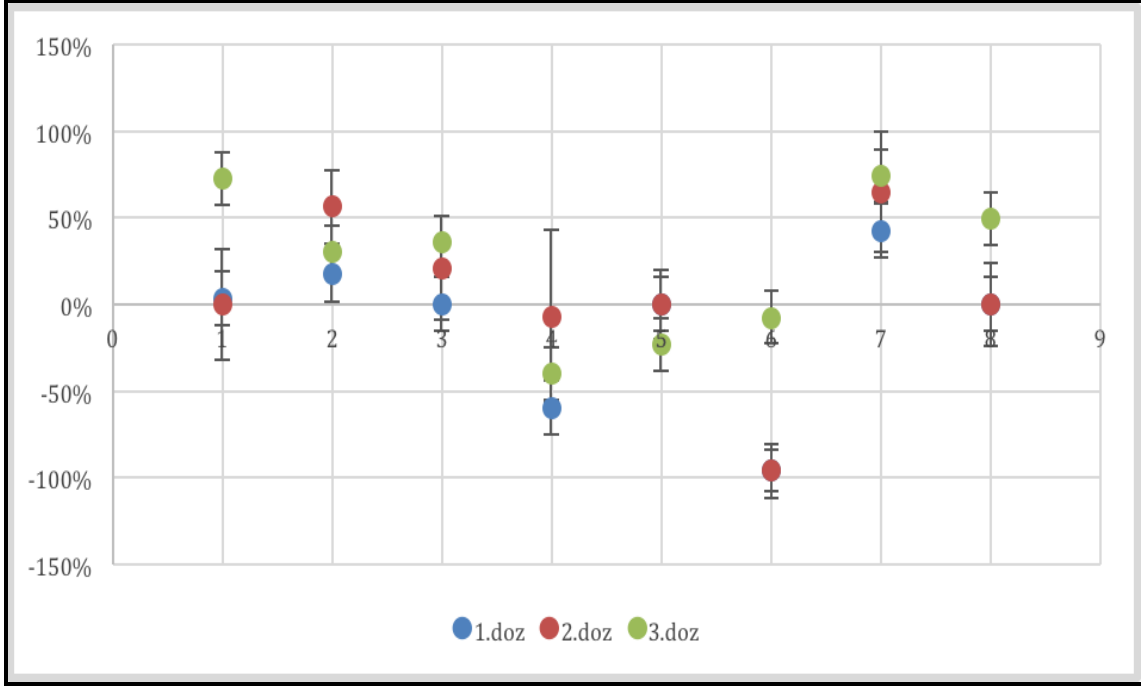
Şekil 4-74. CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect) (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler



Şekil 4-75. ASH2L ve CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect) (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler)

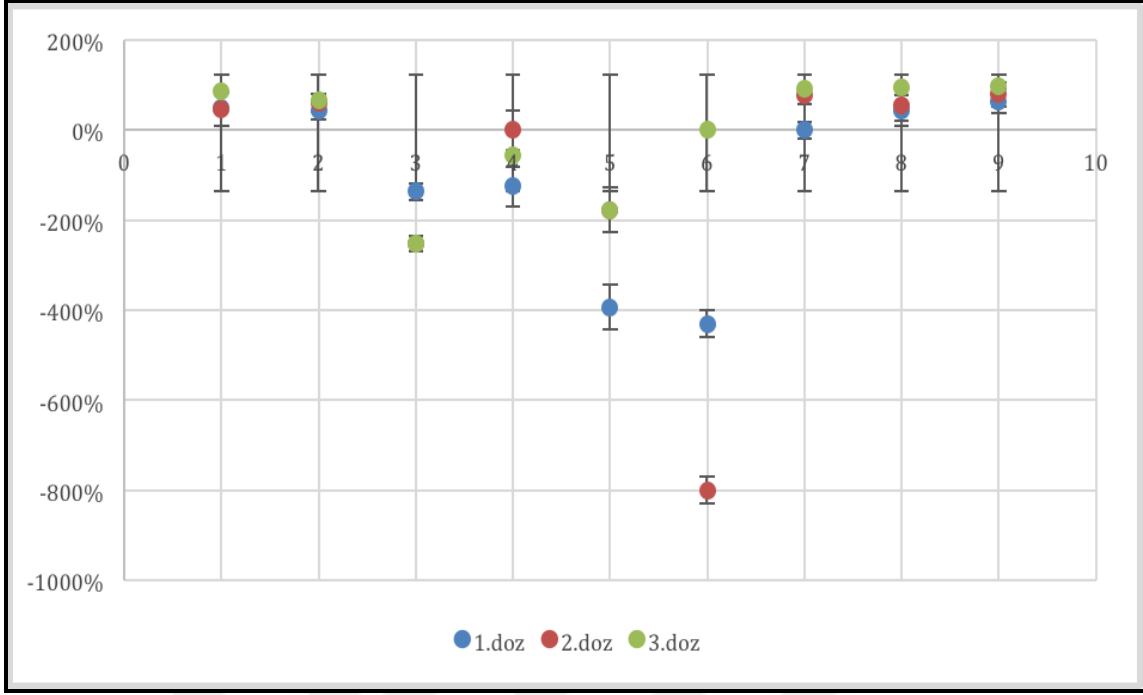


Şekil 4-76. PBS ile muamele edilmiş (A-B: tedavi öncesi ölçümler, C-D: tedavi sonrası ölçümler)



Şekil 4-77. Tümör boyutları yaklaşık 8 x 8 mm olan hayvanların doz enjeksiyon sonrası tümör hacmi grafiği 1: Ligand ile modifiye edilmemiş boş NPs, 2: Ligand ile modifiye edilmiş boş NPs, 3: Ligand ile modifiye edilmiş CK2 siRNA yüklü NPs, 4: Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L siRNA yüklü NPs, 5: Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L ve CK2 siRNA yüklü NPs, 6: ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect), 7: CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect), 8: CK2 ve ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect)

Tümör boyutları ortalama 8 x 8 mm'ye ulaşan hayvanlarda yapılan çalışmalarda boyutun büyümesi ile tedavi oranlarının düşük olduğu gözlenmiştir. 1.doz tedaviden sonra az düşüş veya büyümenin durması gibi sonuçlar gözlenirken 2.dozda tümörün büyümesi söz konusu olmuştur. Dozların 1'er hafta arayla uzun bir süre içerisinde yapılmasının etkisi olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4-78. Tümör boyutları yaklaşık 4 x 4 mm olan hayvanların doz enjeksiyon sonrası tümör hacmi grafiği 1: Ligand ile modifiye edilmemiş boş NPs, 2: Ligand ile modifiye edilmiş boş NPs, 3: Ligand ile modifiye edilmiş CK2 siRNA yüklü NPs, 4: Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L siRNA yüklü NPs, 5: Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L ve CK2 siRNA yüklü NPs, 6: ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect), 7: CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect), 8: CK2 ve ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect)

Tümör boyutu ortalama 4 x 4 mm'ye ulaşan hayvanlarla çalışılmaya başlanmış ve sonuçlar tedavinin etkililiği açısından daha olumlu görülmüştür. Ölçüm çalışmaları yukarıdaki hacimsel hesaplama baz alınarak yapıldığı için büyüme ve küçülme yüzdeleri de doğru orantılı olması sebebiyle %800 lere varan küçülmeler bundan kaynaklanmaktadır. Dozların 1'er hafta arayla uzun bir süre içerisinde yapılmasının etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Hayvan deneyleri sonuçlar incelendiğinde tedavinin ASH2L siRNA ile yüklenmiş olan partikül ve ticari taşıyıcının CK2 yüklü olanlara göre daha iyi bir tedavi sağladığı görülmektedir. Ticari taşıyıcı ve nanopartiküller kıyaslandığında ticari taşıyıcının 2. dozundan sonra tümör büyümesinin daha hızlı olduğu ancak partiküllerin 2. ve 3. dozlarından sonra tümör büyümesinin daha yavaş olduğu görülmektedir. Buda partiküllere yüklenmiş siRNA'lerin daha yavaş salınarak 1.dozdan sonra tümör doku büyümelerinin daha az olduğu sonucu çıkarılmıştır.

#### 4.4.2 Histolojik İncelemeler

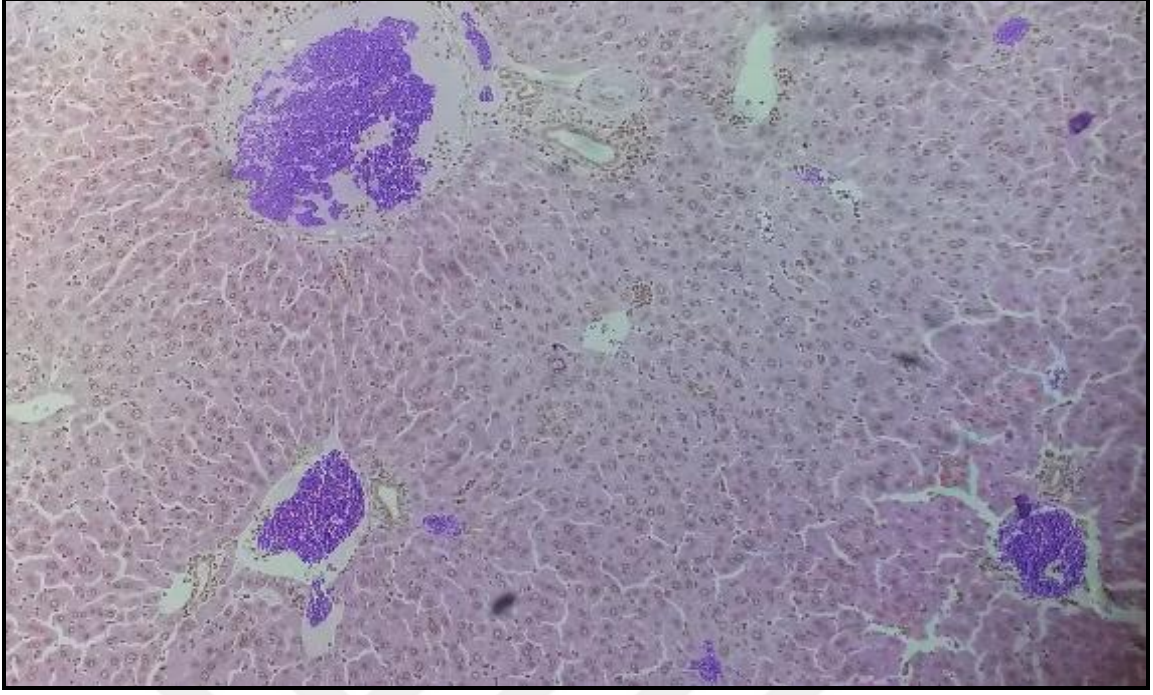
##### Organ Toksisite Çalışmaları

Tedavi sonrası kurbanıye edilen farelerden alınan karaciğer, dalak, böbrek, akciğer ve karaciğer dokuları eosin boya ile boyanarak mikroskopta incelenmiştir.

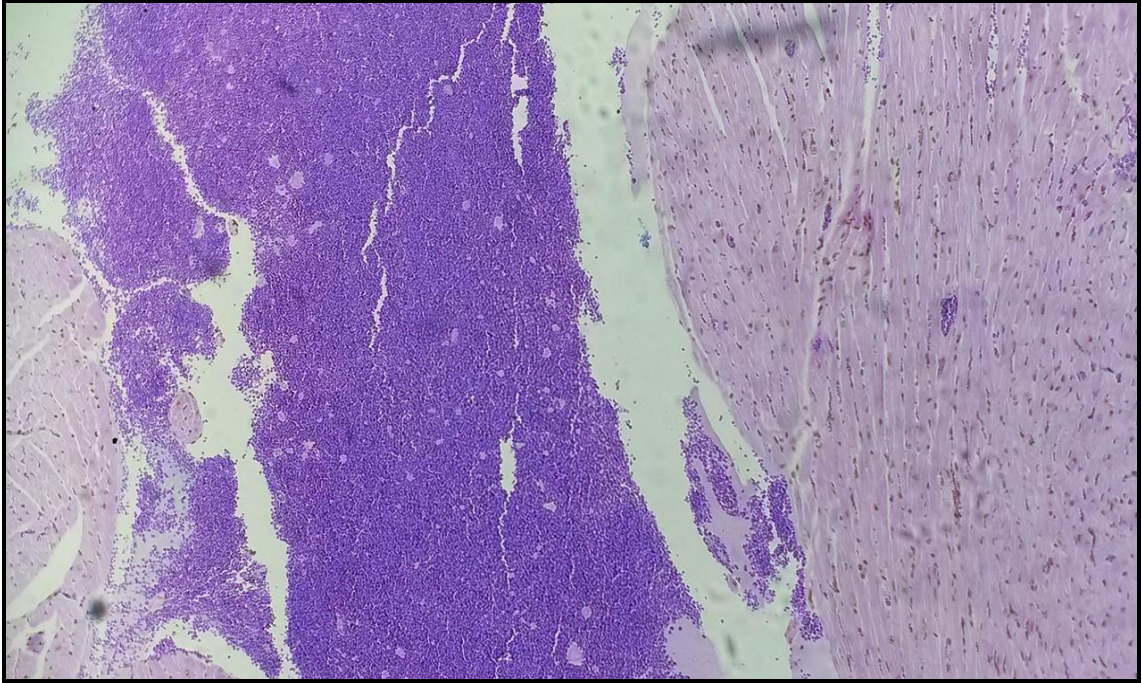


Şekil 4-79. ASH2L siRNA yüklü nanopartiküllü bazı gruplarda organ toksisitesi için H&E ile boyanan doku örneklerinin makroskopik kesitsel görünümü

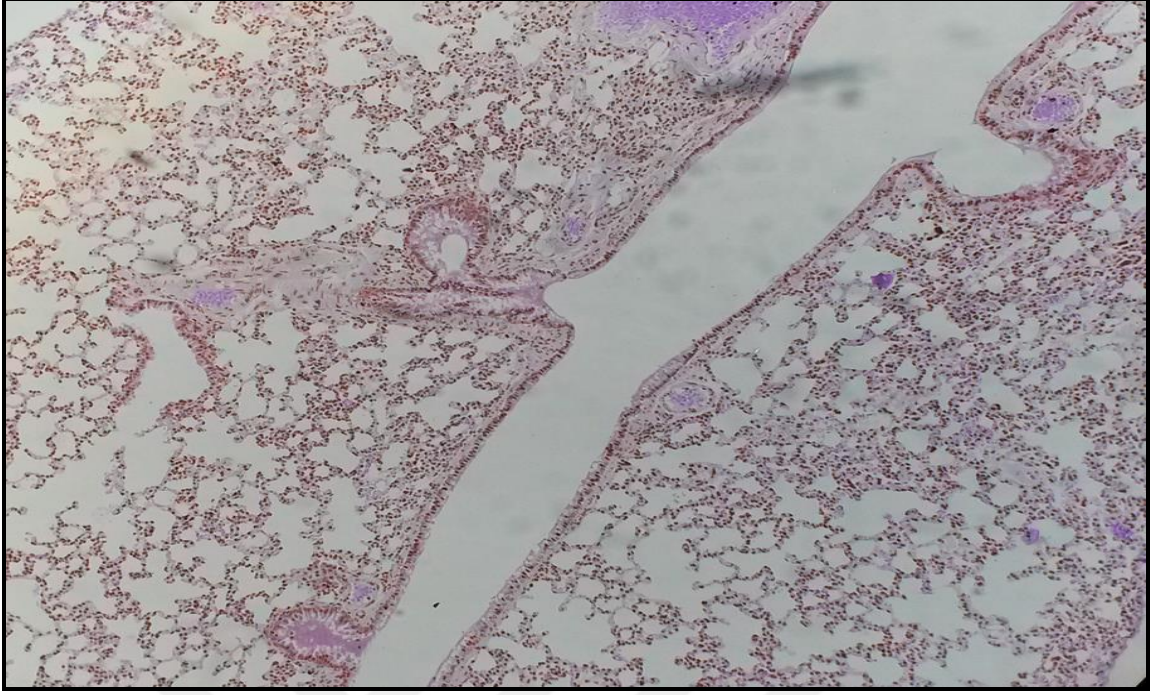
Histoloji çalışmalarında alınan kalp, dalak, karaciğer, böbrek ve akciğer dokuları incelendiğinde siRNA ile yüklenmemiş ve siRNA ile yüklenmiş nanopartiküller ile ticari taşıyıcılar, hiçbir grupta organ toksisitesi gözlenmemiştir. Bu sonuç hazırlanan nanopartiküllerin hedeflenerek tümör dokusunda birikmesinin haricinde aynı zamanda pasif hedefleme ile diğer organlara göç eden partiküllerin de hiçbir toksik etki yaratmayarak taşıyıcı sistem olarak kullanılması için olumlu sonuçlar vermiştir. Aşağıda sunulmuş olan doku örnekleri farklı tedavi gruplarından alınan hayvan dokularına örnek olarak sunulmuştur.



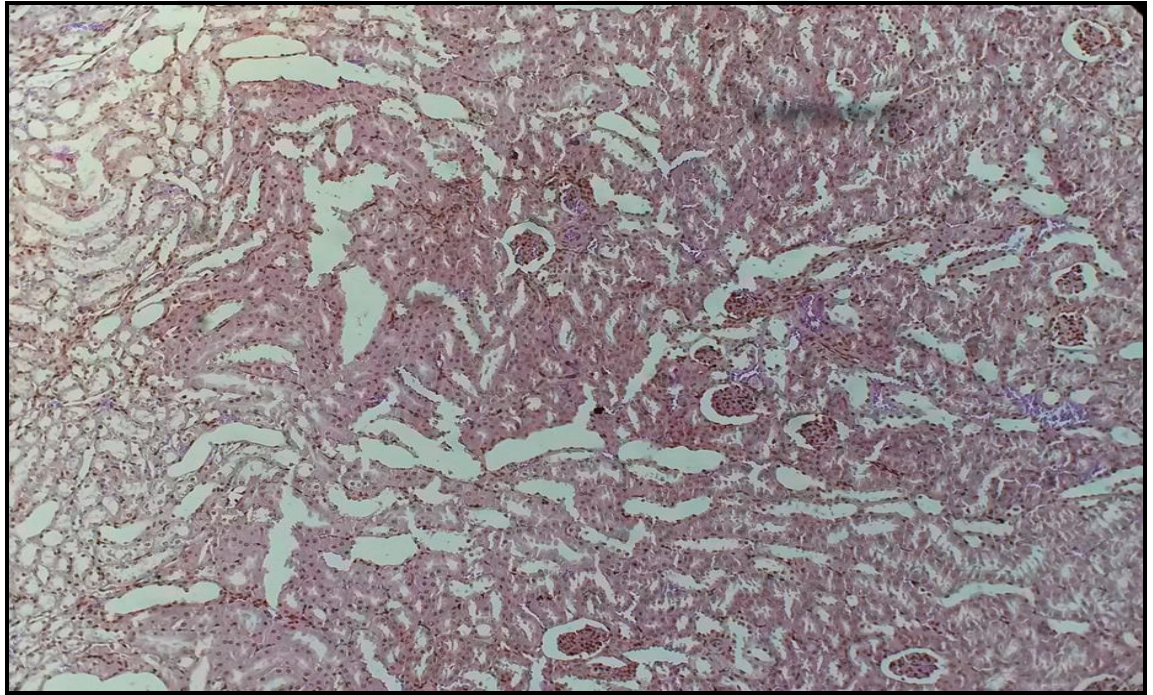
Şekil 4-80. CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan karaciğer dokusu (10X10 Büyütme)



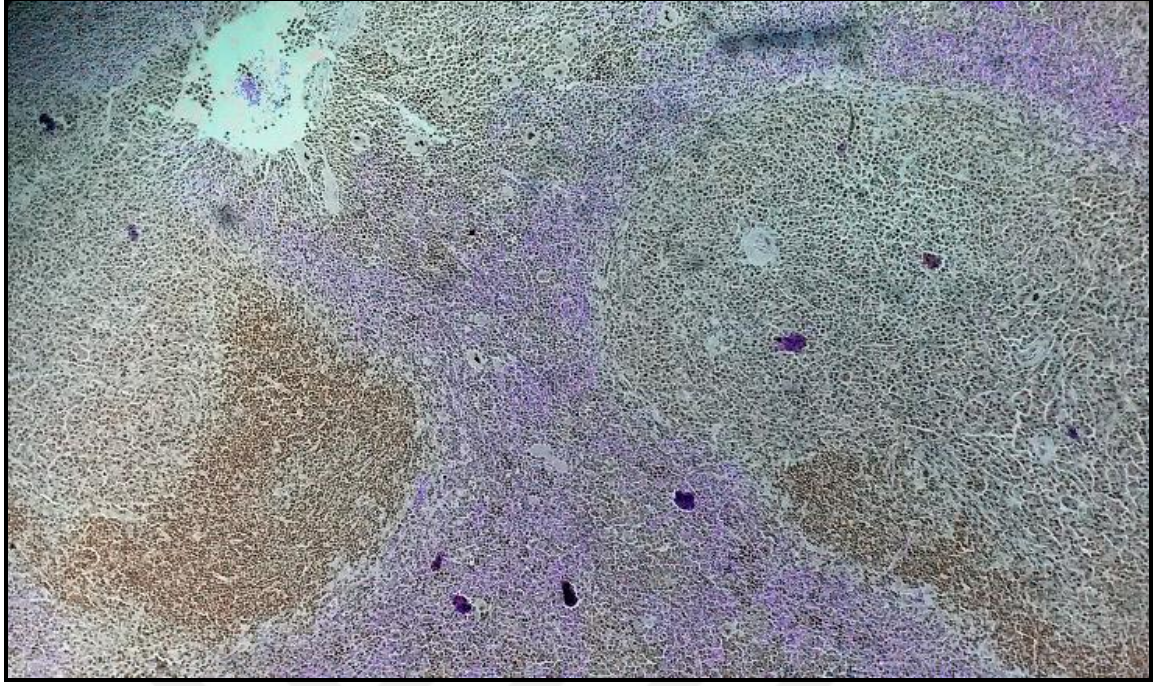
Şekil 4-81. ASH2L siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan kalp dokusu (10X10 Büyütme)



Şekil 4-82. ASH2L ve CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan akciğer dokusu (10X10 Büyütme)



Şekil 4-83. CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan böbrek dokusu (10X10 Büyütme)

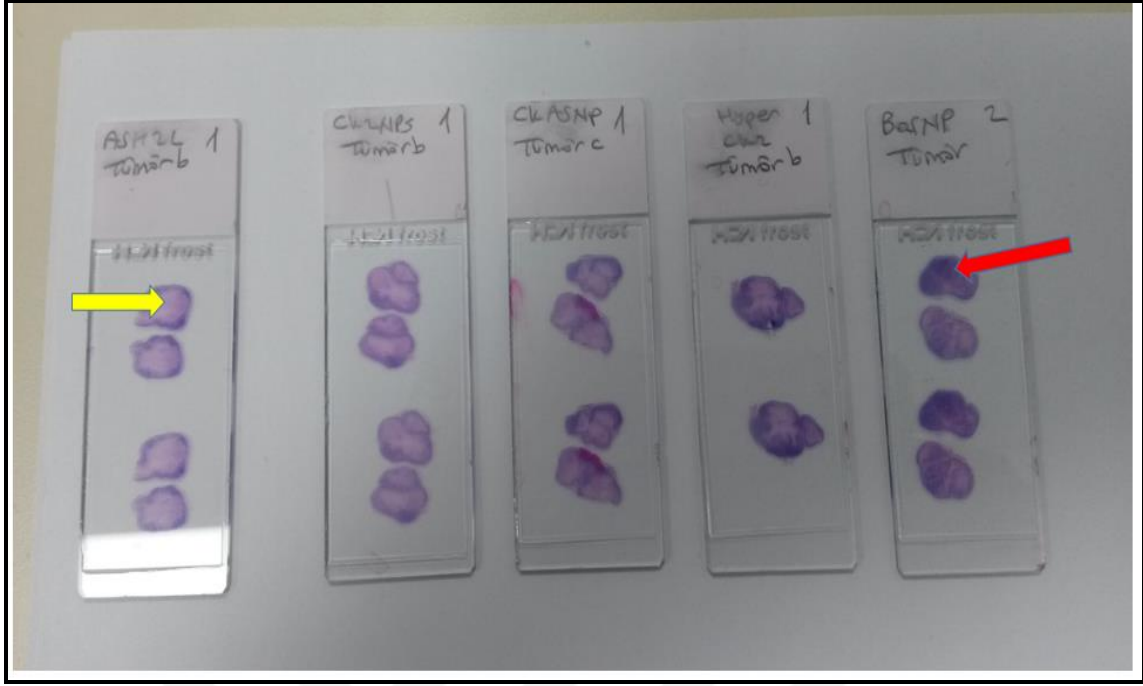


Şekil 4-84. ASH2L ve CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı ile tedavi edilmiş hayvan dalak dokusu (10X10 Büyütme)

#### Tümör Doku Nekroz Çalışmaları

3 doz tedavi aşamasından sonra 27. gün sakrifiye edilen farelerin tümör dokuları alınmış ve sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra 80 °C'de saklanmıştır. Frozen cihazında kesit alındıktan sonra çözündürülen dokular formalinde fikse edilmiş ve hematoksilin eosin ile dokular boyanarak mikroskop altında inceleme yapılmıştır. Şekil 94'te siRNA ile yüklenmiş ve hiçbir yükleme yapılmamış boş nanopartikül ve ticari taşıyıcı ile tedavi edilmiş bazı farelerin tümör dokusunun H&E boyamada makroskopik kesitsel görünüşleri örnek olarak sunulmuştur.

Tedavi sonrasında sakrifikasyon ile alınan tümör dokuları H&E ile boyama yöntemiyle boyanmış ve mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Tümör Alanı/ Nekroz alanı oranı hesaplama yöntemi ile her gruptan 3 hayvanın tümör dokusunun en geniş kesidinden seçilmiş 5'er alanından 10x10 büyütmede 100'er hücre sayılarak elde edilmiştir. Elde edilen tümör dokularından elde edilen Tümör Alanı/ Nekroz alanı oranı hesaplamaları Tablo 4-12'de sunulmuştur. Tabloda yer alan hesaplamalar 1'e oranlanarak yazılmıştır.



Şekil 4-85. Boş ve siRNA ile yüklenmiş nanopartikül/ticari taşıyıcı ile tedavi edilmiş bazı farelerin tümör dokusunun h&e boyamada makroskopik kesitsel görünümü. Kırmızı okla işaretlenen koyu mavi alanlar yoğun tümör dokusunu gösterirken sarı okla işaretlenen açık mavi alanlar ise nekrotik alanları ifade etmektedir.

Tablo 4-11. Tedavi sonrası grupların Tümör Alanı/ Nekroz alanı oranı hesaplamaları

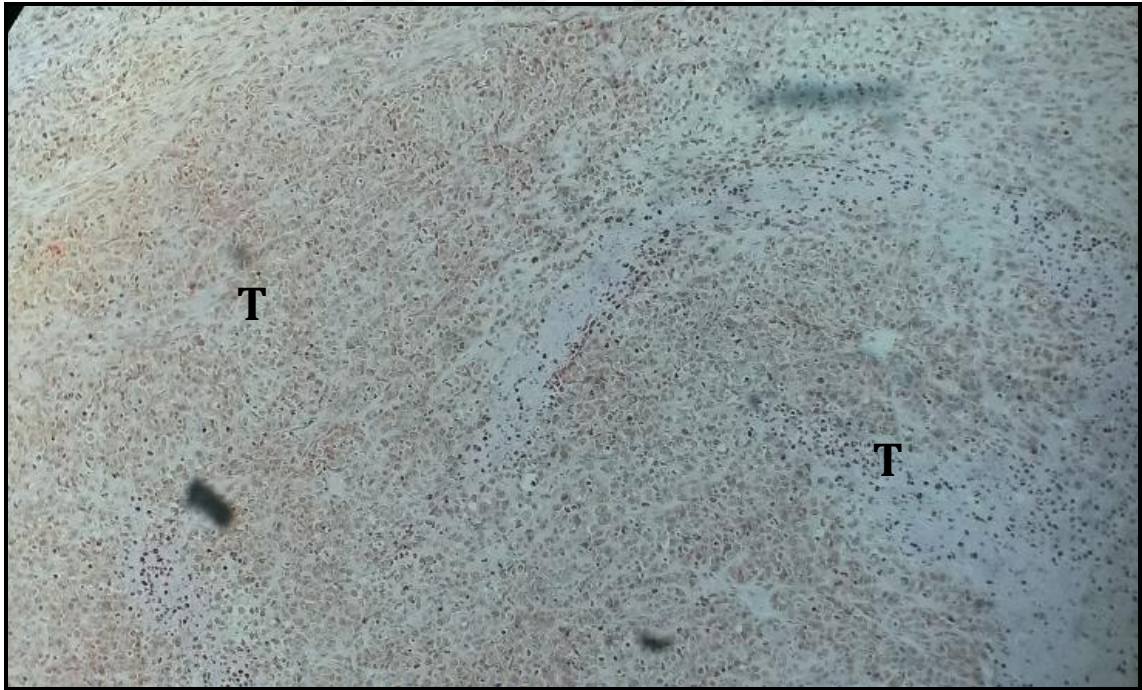
| Tedavi Grubu                                             | Tümör Alanı | Nekroz Alanı |
|----------------------------------------------------------|-------------|--------------|
| Ligand ile modifiye edilmemiş boş NPs                    | 2,5         | 1            |
| Ligand ile modifiye edilmiş boş NPs                      | 2,5         | 1            |
| Ligand ile modifiye edilmiş CK2 siRNA yüklü NPs          | 1           | 6            |
| Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L siRNA yüklü NPs        | 1           | 8            |
| Ligand ile modifiye edilmiş ASH2L ve CK2 siRNA yüklü NPs | 1           | 6,5          |
| CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect)              | 1           | 2            |
| ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect)            | 1           | 2,5          |
| CK2 ve ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı (HiperFect)     | 1           | 3            |

Tablo 4-11'deki oranlar incelendiğinde boş nanopartiküllerde tümör alanının geniş olduğu yüklü taşıyıcılarda ise nekrotik alanın geniş olduğu görülmektedir. Ligand ile modifiye edilmemiş boş nanopartiküller ve ligand ile modifiye edilmiş boş nanopartiküller ile tedavi edilen farelerin tümör dokuları incelendiğinde (Şekil 95) hiçbir nekrotik alan gözlenmemiştir. Tümör dokusunun küçülme oranının en yüksek

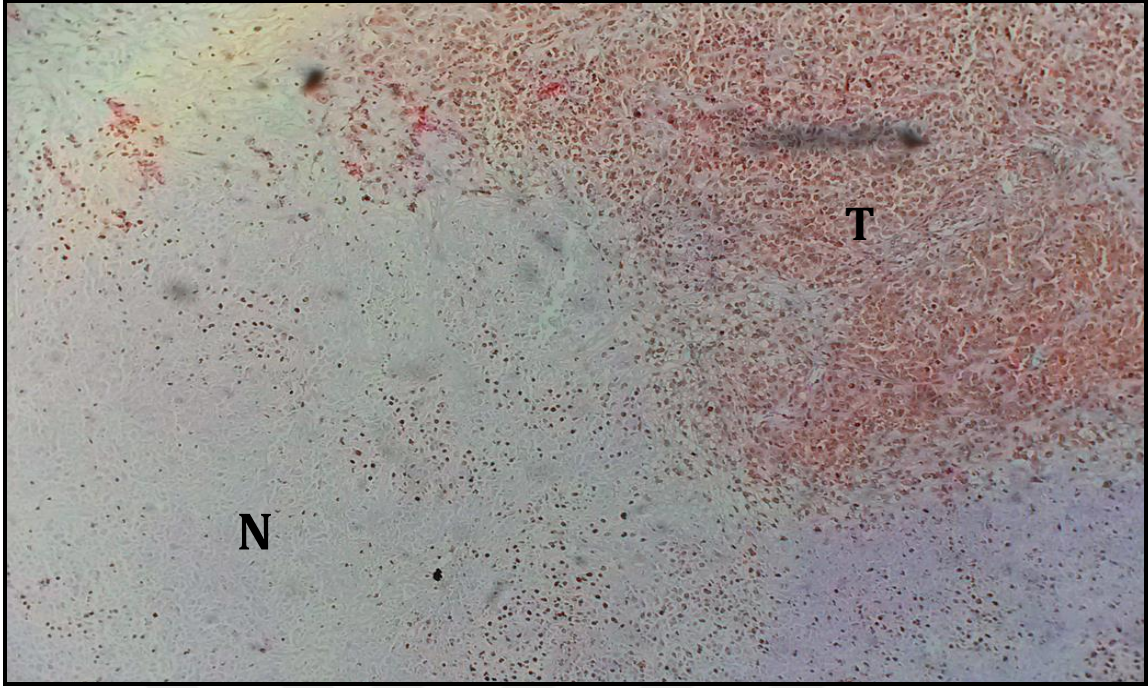
olduğu örnek ligand ile modifiye edilerek hedeflenmiş ASH2L siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş fareler olduğu görölmüştür. ASH2L siRNA yüklü ticari taşıyıcı ile kıyaslandığında nanopartiküler taşıyıcının daha etkin olması;

1. Nanopartiküllerin ligand ile hedeflenerek (Hyaluronik asit) tedaviye sunulması, ancak ticari taşıyıcının hedefli olmaması,
2. Hiperfect ticari taşıyıcının daha çoğunlukla intravenöz uygulamalardaki başarısının olduğu ancak intraperitoneal uygulama için uygun olmayabileceği, olarak yorumlanmıştır.

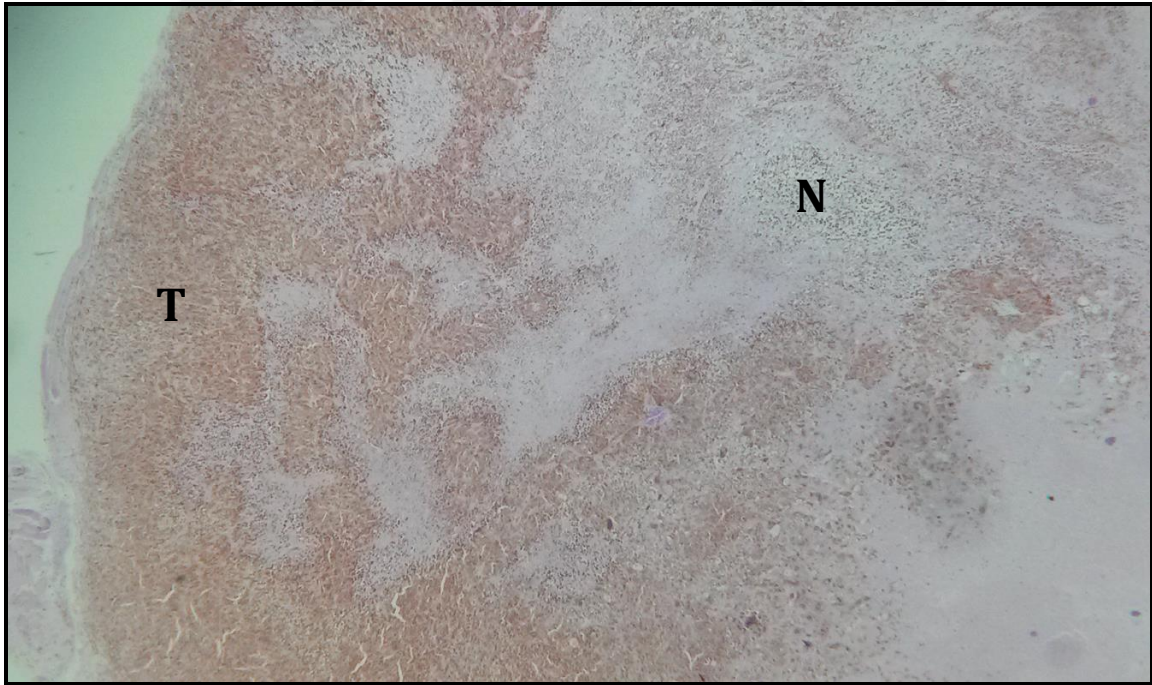
Aşağıda örnek bazı gruptan alınan Tümör dokuların mikroskopik görüntüleri sunulmuş ve tümör alanları (T) ve Nekrotik alanlar (N) ile gösterilmiştir.



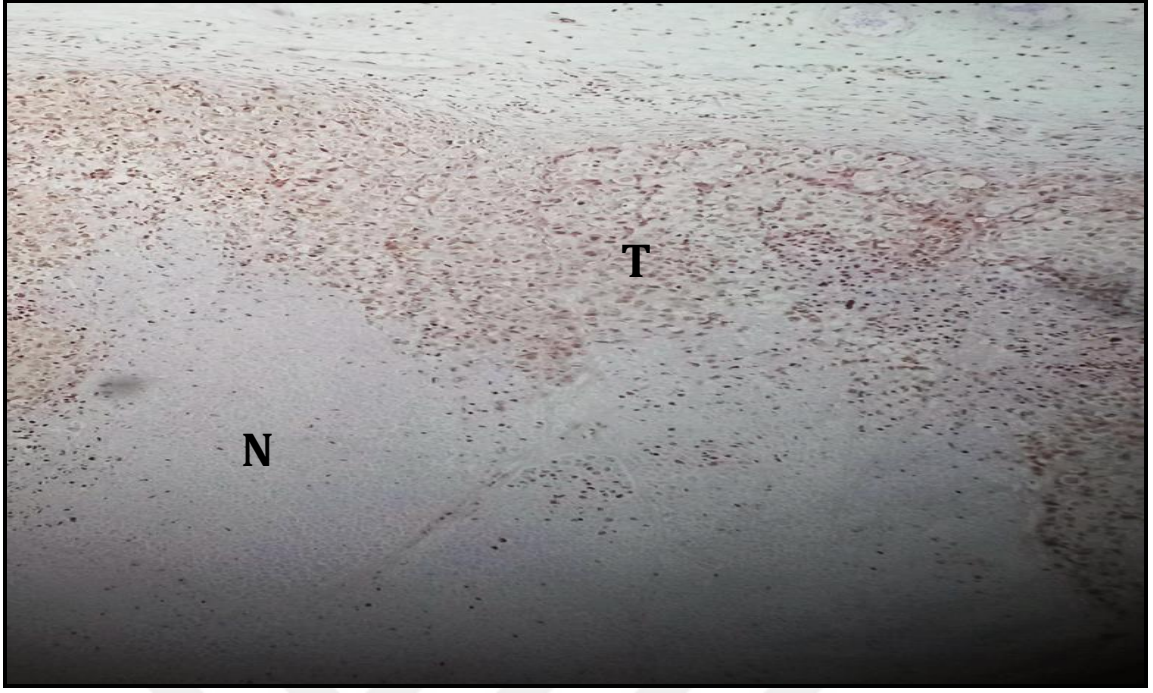
Şekil 4-86. Boş nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme)  
T:Tümör Dokusu N: Nekroz



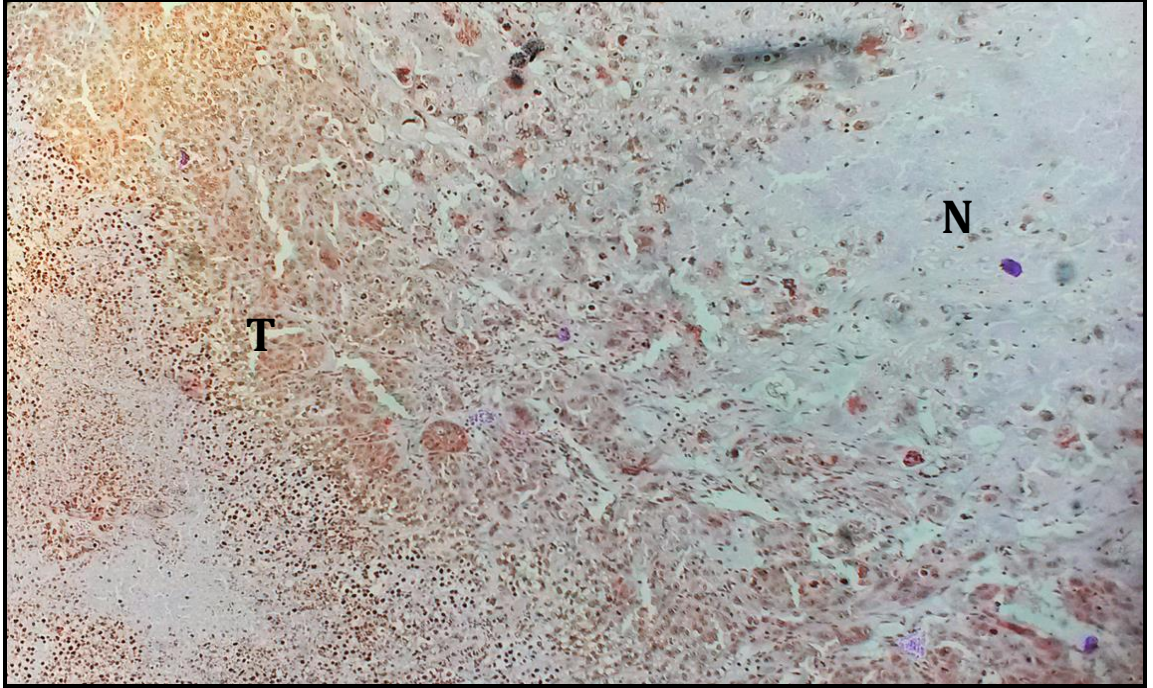
Şekil 4-87. CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz



Şekil 4-88. CK2 siRNA yüklü ticari taşıyıcı ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz



Şekil 4-89. ASH2L siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz



Şekil 4-90. ASH2L ve CK2 siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş hayvan tümör dokusu (10X10 Büyütme) T:Tümör Dokusu N: Nekroz

## 5. SONUÇLAR

- Bu çalışmada ilk olarak farklı ipek proteinlerinin albumin ile farklı oranlarda oluşan dokuz adet ipek protein nanopartikülü siRNA için taşıyıcı olarak desolvasyon tekniği ile üretilmiş ve karakterize edilmiştir.
- Sentez aşamasında farklı parametrelerin (desolvasyon ajanı, pH etkisi, çapraz bağlayıcı miktarı) nanopartiküllerin boy-boy dağılımına ve yüzey yüküne etkileri DLS analizi ile incelenmiştir.
- Üretilen malzemelerin morfolojik ve yapısal incelenmesinde SEM, FTIR, NMR ve DSC/TGA teknikleri kullanılmıştır. Elde edilen partiküllerin beklenen yapısal ve morfolojik karakteristik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir.
- Elde edilen sonuçlara bakıldığında dokuz nanopartikülden boyut, yüzey yükü ve termal davranış olarak sonraki çalışmalar için en uygun olanının Alb:Ser (2:1) olduğu tespit edilmiş ve devamındaki deneyler bu nanopartikül ile yapılmıştır.
- Alb:Ser (2:1) nanopartiküllerinin raf ömrünün ve degradasyon davranışlarının Alb ve Ser nanopartiküllerine göre daha avantajlı olduğu gösterilmiştir.
- Nanopartiküller (Alb:Ser (2:1)) hyaluronik asit (HA) ligandı ile modifiye edilerek larinks kanseri hücrelerine seçimli hale getirilmiş ve katyonik yapıdaki PLL ile etkileştirilerek negatif yüklü siRNA'ların bağlanması için daha uygun hale getirilmiştir.
- siRNA yükleme çalışmalarında farklı miktarlarda siRNA'lar nanopartiküllerle etkileştirilerek bağlanma verimi spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. En yüksek bağlanma verimi %61,25 olarak elde edilmiştir.
- Yapılan biyouyumluluk çalışmalarında farklı miktarlardaki Alb, Ser ve Alb:Ser 2:1 nanopartiküllerinin hücreler üzerinde çok az miktarda toksik etkiye neden olduğu XTT testi ile ortaya konmuştur.

- Farklı miktarlardaki ASH2L, CK2 ve Siklin D1 siRNA ile yüklenmiş nanopartiküllerin HEp-2 hücreleri üzerinde önemli derecede toksik etkiye neden olmuştur. siRNA'nın uygun şekilde hücrelere taşınması için optimize edilmiş lipozomal yapıdaki ticari taşıyıcı olan HiperFect ile kıyaslandığında nanopartiküllerin siRNA'ları hücre içine ulaştırma başarısı ticari ürünle benzer şekilde veya yakın bir sonuç verdiği görülmektedir. siRNA'lar herhangi bir taşıyıcı sistem olmadan HEp-2 hücreleriyle muamele edildiğinde hücreler üzerindeki toksik etkinin daha az olduğu ortaya konmuştur.
- Gerçek zamanlı hücre proliferasyon analizi ile nanopartiküller olmadan siRNA'ların hücrelere verilmesinin nanopartiküllere kıyasla önemli derecede proliferasyonu etkilemediği gösterilmiştir.
- RT-PCR analizinde herhangi bir taşıyıcı olmaksızın sadece siRNA'larla hücreler muamele edildiğinde yaklaşık % 25 bağıl gen susturulması gözlenmiştir. HiperFect kullanıldığında ise bu oran oldukça artmıştır. Sonuçlara göre, her üç genin ekspresyonunun inhibe edilmesinde tez kapsamında sentezlenen HA ile modifiye edilmiş, PLL ile dekore edilmiş Alb-Ser 2:1 nanopartiküllerinin taşıyıcı olarak üstünlüğü görülmektedir. Üç gen kendi içinde incelendiğinde Siklin D1 genine göre ASH2L ve CK2 genleri nanopartikül aracılığıyla daha çok baskılandığı gözlenmiştir.
- Akış Sitometrisi ile yapılan Annexin V-PI analiz sonuçlarına göre HEp-2 hücrelerinde önemli işlevi olan her iki genin (CK2 ve ASH2L) siRNA'lar ile inhibe edildiğinde apoptozun indüklediği görülmüştür. Hücrelerle muamele edilen gruplara bakıldığında HA modifiye edilmiş PLL bağlı Alb-Ser 2:1 nanopartiküllerinin siRNA taşınımında ticari ve siRNA'nın tek başına kullanımına olan üstünlüğü görülmektedir.
- Hayvan deneyleri sonuçları incelendiğinde farelerde sırtta oluşturulan kanser modelinin büyük boyuta gelmeden tedaviye başlandığında tümör küçülme yüzdesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Sonuçlarda, ASH2L siRNA ile yüklenmiş olan partikül ve ticari taşıyıcının CK2 yüklü olanlara

göre daha iyi bir tedavi sağladığı görülmektedir. Ticari taşıyıcı ve nanopartiküller kıyaslandığında ticari taşıyıcıda 2. dozdan sonra tümör büyümesinin daha hızlı olduğu ancak partiküllerin 2. ve 3. dozlarda tümör büyümesinin daha yavaş olduğu görülmektedir. Bu da partiküllere yüklenmiş siRNA'lerin daha yavaş salınarak 1.dozdan sonra tümör doku büyümelerinin daha az olduğu sonucu çıkartılmıştır.

- Histoloji çalışmalarında alınan kalp, dalak, karaciğer, böbrek ve akciğer dokuları incelendiğinde siRNA ile yüklenmemiş ve siRNA ile yüklenmiş nanopartiküller ile ticari taşıyıcılar, hiçbir grupta organ toksisitesi gözlenmemiştir. Bu sonuç hazırlanan nanopartiküllerin hedeflenerek tümör dokusunda birikmesinin haricinde aynı zamanda pasif hedefleme ile diğer organlara göç eden partiküllerin de hiçbir toksik etki yaratmayarak taşıyıcı sistem olarak kullanılması için olumlu sonuçlar vermiştir.
- Tedavi sonrasında sakrifikasyon ile alınan tümör dokuları H&E ile boyama yöntemiyle boyanmış ve tümör doku / nekroz alanlarının mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Boş nanopartiküllerde tümör alanının geniş olduğu, siRNA yüklü taşıyıcılarda ise nekrotik alanın geniş olduğu görülmektedir. Ligand ile modifiye edilmemiş boş nanopartiküller ve ligand ile modifiye edilmiş boş nanopartiküller ile tedavi edilen farelerin tümör dokuları incelendiğinde hiçbir nekrotik alan gözlenmemiştir. Tümör dokusunun küçülme oranının en yüksek olduğu örnek ligand ile modifiye edilerek hedeflenmiş ASH2L siRNA yüklü nanopartiküller ile tedavi edilmiş fareler olduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar, ligand; hyaluronik asit ile modifiye edilmiş, PLL ile etkileştirilmiş Alb:Ser (2:1) nanopartiküllerin siRNA taşıyıcı sistemi olarak üstün özelliklere sahip olduğunu, yapılan *in vitro* ve *in vivo* analizlerle larinks kanseri tedavisinde umut vaat edici terapötik potansiyelin olduğunu göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] R. N. Adams, C. E. Mosher, C. K. Blair, D. C. Synder, R. Sloane, W. Demark-Wahnefried, Cancer survivors' uptake and adherence in diet and exercise intervention trials: An integrative data analysis, *Cancer*, vol. 121, no. 1, pp. 77- 83, **2015**.
- [2] R. A. Garcia, V. Morales, S. Martin, E. Vilches, A. Toledano, "Volatile organic compounds analysis in breath air in healthy volunteers and patients suffering epidermoid laryngeal carcinomas", *Chromatographia*, vol. 77, pp. 501–509, **2014**
- [3] H. Zhang, D. Yang, H. Wang, S. Wen, J. Liu, Q. Luan, Y. Huang, B. Wang, C. Lin, H. Qian, Metastasis-associated gene 1 promotes invasion and migration potential of laryngeal squamous cell carcinoma cells, *Oncology Letters*, vol. 7, no. 2, pp. 399- 404, **2014**.
- [4] H. Ramroth, A. Schoeps, E. Rudolph, G. Dyckoff, P. Plinkert, B. Lippert, K. Feist, K. W. Delank, K. Scheuermann, G. Baier, I. Ott, S. Chenuoda, H. Becher, A. Dietz, Factors predicting survival after diagnosis of laryngeal cancer, *Oral Oncology*, vol. 47, no. 12, pp. 1154- 1158, **2011**.
- [5] D. Wang, B. Fei, L. V. Halig, X. Qin, Z. Hu, H. Xu, Y. A. Wang, Z. Chen, S. Kim, D. M. Shin, Z. Chen, Targeted iron-oxide nanoparticle for photodynamic therapy and imaging of head and neck cancer", *ACS Nano*, vol. 8, no. 7, pp. 6620- 6632, **2014**.
- [6] W. H. Chen, R. L. Lecaros, Y. C. Tseng, L. Huang, Y. C. Hsu, Nanoparticle delivery of HIF1 $\alpha$  siRNA combined with photodynamic therapy as a potential treatment strategy for head and neck cancer, *Cancer Letters*, vol. 359, no. 1, pp. 65- 74, **2015**
- [7] H. E. Gee, C. Camps, F. M. Buffa, S. Patiar, S. C. Winter, G. Betts, J. Homer, R. Corbridge, G. Cox, C.M. L. West, J. Ragoussis, A. L. Harris, "hsa-miR-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer" *Cancer*, vol.116, no.9 pp. 2148–2158, 2010.
- [8] R. Guerrero-Preston, C. Michailidi, L. Marchionni, C. R. Pickering, M. J. Frederick, J. N. Myers, S. Yegnasubramanian, T. Hadar, M. G. Noordhuis, V. Zizkova, E. Fertig, N. Agrawal, W. Westra, W. Koch, J. Califano, V. E.

- Velculescu, D. Sidransky, Key tumor suppressor genes inactivated by greater promoter methylation and somatic mutations in head and neck cancer, *Epigenetics*, vol. 9, no. 7, pp. 1031- 1046, **2014**.
- [9] S. Virani, M. Sartor, J. McHugh, D. B. Chepeha, T. E. Carey, L. A. Peterson, E. Bellile, J. M. Taylor, G. T. Wolf, L. S. Rozek, Epigenetic Alterations are associated with survival from head and neck cancer, *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, vol. 88, no. 2, pp. 495, **2014**.
- [10] X. Wang, J. Ren, X. Qu, Targeted RNA interference of cyclin A2 mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes induces proliferation arrest and apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. *ChemMedChem*, vol. 3 pp. 940-945, **2008**
- [11] Y. Song, Y. Dong, W. Bai, X. Ma, Silencing of Src by siRNA inhibits laryngeal carcinoma growth through the Src/ PI-3 K/ Akt pathway in vitro and in vivo, *Tumor Biology*, vol. 35, no. 9, pp. 9009-9014, **2014**.
- [12] M. H. Choe, J. W. Min, H. B. Jeon, D. H. Cho, J. S. Oh, H. G. Lee, S. G. Hwang, S. An, Y. H. Han, J. S. Kim, ERp57 modulates STAT3 activity in radioresistant laryngeal cancer cells and serves as a prognostic marker for laryngeal cancer, *Oncotarget*, vol. 6, no. 5, pp. 2654- 2666, **2015**
- [13] R. Contran, V. Kumar, S. Robbins, *Pathologic Basis of Disease*, 4, **1989**.
- [14] Angiogenesis Inhibitors Therapy: National Cancer Institute. A fact sheet that describes the process of eliminating the blood supply to tumors. [[www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/angiogenesis-inhibitors](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/digestpage/angiogenesis-inhibitors)].
- [15] G.T. Diamandopoulos, Cancer An historical perspective, *Anticancer Res*, vol. 16 pp. 1595–1602, **1996**
- [16] D. W. Kufe, R. E. Pollock, R. R. Weichselbaum, R. C. Bast, M. D. Jr, T.S. Gansler, Cancer Medicine. Decker Inc; **2003**
- [17] Encyclopedia Britannica. See entries on Medicine, History of Cancer.
- [18] B. B. Gallucci, Selected concepts of cancer as a disease. From the Greeks to 1900. *Oncol Nurs Forum* 12:67–71, **1985**
- [19] R. Kalluri, Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis, *Nat Rev Cancer* 3, 422–433, **2003**

- [20] Progress against cancer.  
[[http://www.cancer.net/patient/Advocacy%20and%20Policy/Treatment\\_Advances\\_Timeline.pdf](http://www.cancer.net/patient/Advocacy%20and%20Policy/Treatment_Advances_Timeline.pdf) ]. 2009.
- [21] C. Kardinal, J. A. Yarbrow, Conceptual history of cancer, *Semin Oncol*, vol. 6 pp. 396–408, **1979**
- [22] A. S. Lyons, R. J. Petrucelli, *Medicine: An Illustrated History*. New York, Harry N. Abrams Publishers; **1978**.
- [23] M. B. Shimkin, For sale by the Superintendent of Documents. U.S. Printing Office; Washington D.C: 1976. Contrary to Nature: Cancer; p. 20401DHEW Publication No (NIH) 76–720
- [24] A. Sudhakar, C. S. Boosani, Signaling mechanisms of endogenous angiogenesis inhibitors derived from type IV collagen, *Gene Regulation and System Biology* vol. 1, pp. 217–226, **2007**
- [25] A. Sudhakar, C. S. Boosani, Inhibition of tumor angiogenesis by tumstatin: insights into signaling mechanisms and implications in cancer regression, *Pharm Res* vol. 25, pp. 2731–2739, **2008**
- [26] A. Sudhakar, The matrix reloaded: new insights from type IV collagen derived endogenous angiogenesis inhibitors and their mechanism of action, *J Bioequiv Availab* vol. 1 pp. 52–62, **2009**
- [27] The history of cancer.  
[http://www.bordet.be/en/presentation/history/cancer\\_e/cancer1.htm](http://www.bordet.be/en/presentation/history/cancer_e/cancer1.htm) **2009**.
- [28] Timeline: Milestones in cancer treatment. CureToday..  
[http://www.curetoday.com/index.cfm/fuseaction/article.show/id/2/article\\_id/631](http://www.curetoday.com/index.cfm/fuseaction/article.show/id/2/article_id/631) **2009**
- [29] W. S. Halsted, H. H. Young, J. G. Clark, Early contributions to the surgery of cancer, *Johns Hopkins Med J* vol. 135 pp. 399–417, 1974
- [30] R. I. Haddad and D. M. Shin, Recent Advances in Head and Neck Cancer *N Engl J Med* vol. 359 no. 1143 pp. 54, **2008**
- [31] S.J. Jang, I. Chiba, A. Hirai, W.K. Hong, L. Mao, Multiple oral squamous epithelial lesions: are they genetically related? *Oncogene* vol. 20 no. 2235 pp. 42, **2001**
- [32] B. J. Braakhuis, M.P. Tabor, J.A. Kummer, C.R. Leemans, R.H. Brakenhoff, A genetic explanation of Slaughter's concept of field

- cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*, vol. 63 no. 8 pp.1727-30, **2003**
- [33] C. Jin, Y. Jin, J. Wennerberg, J. Akervall, M. Dictor, F. Mertens, Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Genet Cytogenet* vol. 132 no.2 pp. 85-96, **2002**
- [34] H. R. Choi, E.M. Sturgis, D.I. Rosenthal, M.A. Luna, J.G. Batsakis, A.K. El-Naggar, Sarcomatoid carcinoma of the head and neck: molecular evidence for evolution and progression from conventional squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*, vol. 27, no. 9, pp. 1216-20, **2003**.
- [35] F. Janot, J. Klijanienko, A. Russo, J.P. Mamet, F. de Braud, A.K. El-Naggar, J.P. Pignon, B. Lubinski, E. Cvitkovic, Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis, *Br J Cancer* vol. 73 no. 4 pp531-8. **1996**
- [36] N. Diwakar, M. Sperandio, M. Sherriff, A. Brown, E.W. Odell, Heterogeneity, histological features and DNA ploidy in oral carcinoma by image-based analysis, *Oral Oncol*, vol. 41 pp. 416-22. 2005
- [37] X. Wang, M. Fan, X. Chen, S. Wang, M.J. Alsharif, L. Wang, L. Liu, H. Deng, Intratumor genomic heterogeneity correlates with histological grade of advanced oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncol* vol. 42 no. 7 pp. 740-4, **2006**
- [38] L. Battaglia, M. Gallarate, Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery, *Expert Opin Drug Deliv*. Vol. 9 no. 5 pp. 497-508, **2012**
- [39] A. Garud, D. Singh, N. Garud, Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications, *International Current Pharmaceutical Journal* vol. 1 no. 11 pp. 384-393, **2012**
- [40] I. H. El-Sayed, Nanotechnology in Head and Neck Cancer: The Race Is On, *Curr Oncol Rep*, vol. 12 no.2 pp. 121–128, **2010**
- [41] P.D. Zamore, T. Tuschl, P.A. Sharp, D.P. Bartel, RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals, *Cell* vol. 101 pp. 25-33, **2000**

- [42] Y.A. Zhao, D. Srivastava, A Developmental view of microRNA function, *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 32 no. 4 pp. 189-97, **2007**
- [43] E. Bernstein, A.A. Caudy, S.M. Hammond, G.J. Hannon, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature* vol. 409 pp. 363-366, **2001**
- [44] R.I. Gregory, T.P. Chendrimada, R. Shiekhattar, MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex, *Methods Mol Biol* vol. 342 pp. 33-47, **2006**
- [45] R.I. Gregory, T.P. Chendrimada, N. Cooch, R. Shiekhattar, Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing, *Cell* vol. 123 pp. 631-640, **2005**
- [46] P.J.F. Leuschner, S.L. Ameres, S. Kueng, J. Martinez, Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.* vol. 7 no. 3 pp. 314-20, **2006**
- [47] S. Bagga, J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus, A.E. Pasquinelli, Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation, *Cell*, vol. 122 no. 4 pp. 553-63, **2005**
- [48] B. Şenel, siRNA Taşıyıcı Sistem Geliştirme ve Değerlendirme Çalışmaları, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 131, **2012**
- [49] S. Guo, K.J. Kemphues, par-1, A gene Required For Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes A Putative Ser/Thr Kinase That is Asymmetrically Distributed, *Cell*, vol.81, no. 4, pp. 611- 620, **1995**
- [50] A. Fire, S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, vol. 391 pp. 806-811, **1998**.
- [51] P.M. Waterhouse, M.W. Graham, M.B. Wang, Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95 no. 23 pp. 13959-64, **1998**
- [52] L. Misquitta, B.M. Paterson, Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic

- somatic muscle formation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. vol. 96 pp. 1451-1456, **1999**
- [53] F. Wianny, M. Zernicka-Goetz, Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development, *Nat Cell Biol.*, vol. 2 no. 2 pp. 70-75, **2000**
- [54] S.M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature*, vol. 411 no. 6836, pp. 494-8, **2001**
- [55] M. Banan, N. Puri, The ins and outs of RNAi in mammalian cells, *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 5, pp. 441-450, **2004**
- [56] S.H. Jang, M.G. Wientjes, D. Lu, J.L. Au, Drug delivery and transport to solid tumors, *Pharm Res.*, vol. 20, pp. 1337-1350, **2003**
- [57] C.V. Pecot, G.A. Calin, R.L. Coleman, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer* vol. 11 pp. 59-67, **2011**
- [58] L. Illum, S.S. Davis. The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using a non-ionic surfactant (Poloxamer 338) *FEBS letters*, vol. 167 pp. 79-82, **1984**
- [59] M.E. Norman, P. Williams, L. Illum. Influence of block copolymers on the adsorption of plasma proteins to microspheres. *Biomaterials* vol. 14 pp. 193-202, **1993**
- [60] B. Rippe, B.I. Rosengren, O. Carlsson, D. Venturoli, Transendothelial transport: the vesicle controversy, *Journal of vascular research*, vol. 39 pp. 375-390, **2002**
- [61] R. Juliano, J. Bauman, H. Kang, X. Ming, Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides, *Molecular pharmaceuticals*, vol. 6, pp. 686-695, **2009**
- [62] A. Akinc, W. Querbes, S. De, J. Qin, M. Frank-Kamenetsky, K.N. Jayaprakash, vd. ark., Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms, *Mol Ther.*, vol. 18, pp. 1357-1364, **2010**
- [63] R. Kanasty, J.R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson, Delivery materials for siRNA therapeutics, *Nature materials*, vol. 12, pp. 967-977, **2013**

- [64] M.A. Depristo, E. Banks, R. Poplin, K.V. Garimella, J.R. Maguire, C. Hartl  
vd ark., A framework for variation discovery and genotyping using next-  
generation DNA sequencing data, *Nat Genet*, vol. 43, pp. 491-498, **2011**
- [65] M.S. Draz, B.A. Fang, P. Zhang, Z. Hu, S.Gu, K.C. Weng, J.W. Gray, F.F.  
Chen, Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of  
Cancers and Viral Infections, *Theranostics*, vol. 4, no. 9, **2014**
- [66] W. Jiang, B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan, Nanoparticle-mediated  
cellular response is size-dependent, *Nature Nanotechnology*, vol. 3, pp.  
145-150, **2008**
- [67] S.E. McNeil, Nanoparticle therapeutics: a personal perspective, *Wiley*  
*Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 1  
pp. 264-271, **2009**
- [68] H.K. Sajja, M.P. East, H. Mao, Y.A. Wang, S. Nie, L. Yang, Development  
of Multifunctional Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and  
Noninvasive Imaging of Therapeutic Effect, *Current drug discovery*  
*technologies*. vol. 6 pp. 43-51, **2009**
- [69] K.A. Whitehead, R. Langer, D.G. Anderson, Knocking down barriers:  
advances in siRNA delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, vol.8 pp.  
129-138, **2009**
- [70] W. Gao, Z. Xiao, A. Radovic-Moreno, J. Shi, R. Langer, O.C. Farokhzad,  
Progress in siRNA Delivery Using Multifunctional Nanoparticles, *Methods*  
*in Molecular Biology*, vol. 629 pp. 53-67, **2010**
- [71] L. Huang, B. Sullenger, R. Juliano, The role of carrier size in the  
pharmacodynamics of antisense and siRNA oligonucleotides, *Journal of*  
*Drug Targeting*, vol. 18 pp. 567-574, **2010**
- [72] G. Liu, M. Swierczewska, S. Lee, X. Chen, Functional nanoparticles for  
molecular imaging guided gene delivery, *Nano Today*, vol. 5 pp. 524-539,  
**2010**
- [73] M.G. Stanton, S.L. Colletti, Medicinal Chemistry of siRNA Delivery.  
*Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 53, pp. 7887-7901, **2010**
- [74] J. Soutschek, A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M.  
Donoghue, vd ark, Therapeutic silencing of an endogenous gene by

- systemic administration of modified siRNAs, *Nature*, vol. 432, pp. 173-178, **2004**
- [75] C. Wolfrum, S. Shi, K.N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R.K. Pandey, vd. ark., Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs, *Nature Biotechnology*, vol. 25 pp. 1149-1157, **2007**
- [76] M. Naito, T. Ishii, A. Matsumoto, K. Miyata, Y. Miyahara, K. Kataoka, A phenylboronate-functionalized polyion complex micelle for ATP-triggered release of siRNA, *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 51 pp. 10751-10755, **2012**
- [77] S.J. Lee, M.S. Huh, S.Y. Lee, S. Min, S. Lee, H. Koo, vd ark. Tumor-Homing Poly-siRNA/Glycol Chitosan Self-Cross-Linked Nanoparticles for Systemic siRNA Delivery in Cancer Treatment, *Angew Chem Int Edit*, vol. 51 pp. 7203-7207, **2012**
- [78] V. Torchilin, Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect, *Adv Drug Deliver Rev*, vol. 63 pp. 131-135, **2011**
- [79] J. Kundu, Y. I. Chung, Y. H. Kim, G. Tae, S. C. Kundu, Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release, *Int. J. Pharm.*, vol. 388 no. 242, **2010**
- [80] S. C. Kundu, B. Kundu, S. Talukdar, S. Bano, S. Nayak, J. Kundu, B. B. Mandal, N. Bhardwaj, M. Botlagunta, B. C. Dash, C. Acharya, A.K. Ghosh, Invited review nonmulberry silk biopolymers, *Biopolymers*, vol. 97 no. 455, **2012**
- [81] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: From bench to bedside Molecular Aspects of Medicine, vol. 33, no.3, pp. 209-290, **2012**
- [82] M.J. Grooves, Prenteral drug delivery systems. In: E. Mathiowitz, M.R. Kreitz, L.B. Peppas, Encyclopedia of controlled drug delivery, *New York: John Wiley & Sons* vol. 2. pp. 743–777, **1999**
- [83] R. Arshady, Preparation of microspheres and microcapsules by interfacial polycondensation techniques. *J Microcaps* vol. 6 pp.13–28, **1989**
- [84] D.F. Horrobin, In: Medical physiology and biochemistry, *London: Edward Arnold*. Pp. 47–56, **1968**

- [85] M.L. Rand, R.K. Murray, Plasma proteins, immunoglobulins, and blood coagulation, *Harper's biochemistry, 25th international ed. Stanford*, **2000**
- [86] Q. Chen, C. Liang, C. Wang, vd ark. An imagable and photothermal "Abraxane-like" nanodrug for combination cancer therapy to treat subcutaneous and metastatic breast tumors, *Adv Mater*, vol. 27 pp. 903-10, **2015**
- [87] F. Kratz, Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *J Control Release*, vol. 132 pp. 171-83, **2008**
- [88] J. Gong, M. Chen, Y. Zheng, vd ark. Polymeric micelles drug delivery system in oncology, *J Control Release*, vol. 159 pp 312-23, **2012**
- [89] R. Tong, L. Yala, T.M. Fan, vd. ark, The formulation of aptamer-coated paclitaxel-poly lactide nanoconjugates and their targeting to cancer cells, *Biomaterials*, vol. 31 pp. 3043-53, **2010**
- [90] A.O. Elzoghby, W.M. Samy, N.A. Elgindy, Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *J Control Release*, vol. 157 pp.168-82, **2012**
- [91] I.M. Steinhauser, K. Langer, K.M. Strebhardt, vd. ark., Effect of trastuzumab-modified antisense oligonucleotide-loaded human serum albumin nanoparticles prepared by heat denaturation, *Biomaterials*, vol. 29, pp. 4022-8, **2008**
- [92] M.I. Syga, E. Nicoli, E. Kohler, vd. ark, Albumin Incorporation in Polyethylenimine-DNA Polyplexes Influences Transfection Efficiency, *Biomacromolecules*, vol. 17 pp. 200-7, **2016**
- [93] J. Look, N. Wilhelm, H. von Briesen, vd. ark, Ligand-Modified Human Serum Albumin Nanoparticles for Enhanced Gene Delivery, *Mol Pharm.* Vol. 12, pp. 3202-13, **2015**
- [94] S. Wagner, F. Rothweiler, M.G. Anhorn, vd. ark., Enhanced drug targeting by attachment of an anti  $\alpha$ v integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles, *Biomaterials*, vol.31 pp. 2388-98, **2010**
- [95] R. Langer, D.A. Tirrell, Designing materials for biology and medicine. *Nature* vol. 428 pp. 487–92, **2004**

- [96] M.P. Ho, H. Wang, K.T. Lau, Effect of degumming time on silkwormsilk fibre for biodegradable polymer composites, *Appl Surf Sci* vol. 258 pp. 3948–55, **2012**
- [97] Y. Cao, B.C. Wang, Biodegradation of silk biomaterials, *Int J Mol Sci* vol. 10 pp. 1514–24, **2009**
- [98] G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J.S. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials* vol.24 pp. 401–16, **2003**
- [99] A.C. MacIntosh, V.R. Kearns, A. Crawford, P.V. Hatton, Skeletal tis-sue engineering using silk biomaterials, *J Tissue Eng Regen Med* vol. 2 pp. 71–80, **2008**
- [100] L. Meinel, R. Fajardo, S. Hofmann, R. Langer, J. Chen, B. Snyder, G. Vunjak-Novakovic, D. Kaplan, Silk implants for the healing of critical sizebone defects, *Bone* vol. 37 pp. 688–98, **2005**
- [101] C. Cassinelli, G. Cascardo, M. Morra, L. Draghi, A. Motta, G. Catapano, Physical–chemical and biological characterization of silk fibroin-coated porous membranes for medical applications, *Int J ArtifOrgans*, vol. 29 pp. 881–92, **2006**
- [102] X.H. Zhang, C.B. Baughman, D.L. Kaplan, In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds for vascular cell growth, *Biomaterials*, vol. 29 pp. 2217–27, **2008**
- [103] X. Wang, X. Zhang, J. Castellot, I. Herman, M. Iafrati, D.L. Kaplan, Controlled release from multilayer silk biomaterial coatings tomodulate vascular cell responses, *Biomaterials* vol. 29 pp. 894–903, **2008**
- [104] D. L. Kaplan, S. M. Mello, S. Arcidiacono, S. Fossey, K. Senecal, W. Muller, Protein based materials, *Boston: Birkhauser*, pp. 103-31, **1998**
- [105] D. B. Hızal, Adsorption of olive leaf antioxidants on silk fibroin, İzmir İleri Teknoloji Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi, İzmir, **2006**
- [106] E. Bini, D. P. Knight, D. L. Kaplan, Mapping domain structure in silks from insects and spiders related to protein assembly, *J. Mol. Biol*, vol. 335 no. 1 pp. 27-40, **2004**

- [107] L. Pauling, R. B. Corey, A proposed structure for the nucleic acids, *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 39 pp. 253-26, **1953**
- [108] J. S. Ahn, H. K. Choi, K. H. Lee, J. H. Nahm, C. S. Cho, Novel mucoadhesive polymer prepared by template polymerization of acrylic acid in the presence of silk sericin, *J. Appl. Polym. Sci.* vol. 80 pp. 274, **2001**
- [109] M. Nagura, R. Ohnishi, Y. Gito, Y. Ohkoshi, Structure and physical properties of cross-linked sericin membranes, *J. Seric. Sci. Japan* vol. 70 p.149, **2001**
- [110] K. Y. Cho, J. Y. Moon, Y. W. Lee, K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kweon, K. H. Kim, S. C. Cho, Preparation of self-assembled silk sericin nanoparticles, *Int. J. Biol. Macromol.* vol. 32, **2003**
- [111] B. Subia, S. C. Kundu, Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin–albumin nanoparticles as carriers, *Nanotechnology* vol. 24 no. 3 pp. 11, **2013**
- [112] F. P. Seib, G. T. Jones, J. Rnjak-Kovacina, Y. Lin, D. L. Kaplan, pH-dependent anticancer drug release from silk nanoparticles, *Adv. Healthcare Mater.* vol. 2, pp. 1606, **2013**
- [113] B. Panilaitis, G. H. Altman, J. Chen, H. J. Jin, V. Karageorgiou, D. L. Kaplan, Macrophage response to silk, *Biomaterials* vol. 24 pp. 3079, **2003**
- [114] Y. Q. Zhang, M. L. Tao, W. D. Shen, J. P. Mao, Y. H. Chen, Synthesis of silk sericin peptides-L-asparaginase (SS-ASNase) bioconjugates and their characterization, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* Vol. 81 pp. 136, **2006**
- [115] Y.Q. Zhang, Y. Ma, Y.Y. Xia, W.D. Shen, J.P. Mao, R.Y. Xue, “Silk sericin-insulin bioconjugates: synthesis, characterization and biological activity”, *J. Control. Release*, vol. 115, pp. 307-315, 2006
- [116] V. Gupta, A. Aseh, C. N. Ríos, B. B. Aggarwal, Mathur, A. B. 2009. “Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy”, *International Journal of Nanomedicine*, 4 115–122.
- [117] K. Numata, B. Subramanian, H. A. Currie, D. L. Kaplan, Bioengineered silk protein-based gene delivery systems, *Biomaterials*, vol. 30 pp. 5775–5784, **2009**

- [118] K. Numata, M. R. Reagan, R. H. Goldstein, M. Rosenblatt, D. L. Kaplan, Spider Silk-Based Gene Carriers for Tumor Cell-Specific Delivery, *Bioconjug Chem*, vol. 22, no. 8, pp. 1605–1610, **2011**
- [119] S. K. Das, T. Dey, S. C. Kundu, Fabrication of sericin nanoparticles for controlled gene delivery, *RSC Adv.*, vol. 4 p. 2137, **2014**
- [120] B. Shahbazi, M. Taghipour, H. Rahmani, K. Sadrjavadi, A. Fattahi, Preparation and characterization of silk fibroin/oligochitosan nanoparticles for siRNA delivery, *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 1 no. 136 pp. 867-77, **2015**
- [121] E. Wenk, A.J. Wandrey, H.P. Merkle, L. Meinel, Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery, *J. Control. Release*. vol.132 pp. 26–34, **2008**
- [122] A. Taheri, F. Atyabi, F. S. Nouri, M. A. Derakshan, M. Amini, M. H. Ghahermani, S. N. Ostad, P. Mansoori, R. Dinarvand, Nanoparticles of Conjugated Methotrexate-Human Serum Albumin: Preparation and Cytotoxicity Evaluations, *J. Nanomater.*, Vol. 2011, ID 768201, 7 sayfa, **2011**
- [123] S. Arpicco, P. Milla, B. Stella, F. Dosio, Hyaluronic Acid Conjugates as Vectors for the Active Targeting of Drugs, Genes and Nanocomposites in Cancer Treatment, *Molecules*, vol. 19 pp. 3193-3230, **2014**
- [124] T. Pouyani, G.D. Prestwich, Functionalized derivatives of hyaluronic acid oligosaccharides: Drug carriers and novel biomaterials, *Bioconjugate Chem*. vol. 5, pp. 339–347, **1994**
- [125] C.E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T.F. Vandamme, Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* Vol. 85, pp. 469–489, **2011**
- [126] M.N. Collins, C. Birkinshaw, Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering, *Carbohydr. Polym.* vol. 92, pp. 1262–1279, **2013**
- [127] S.C. Ghosh, A.S. Neslihan, J. Klostergaard, CD44: A validated target for improved delivery of cancer therapeutics, *Expert Opin. Ther. Targets*, vol.16, pp. 635–650, **2012**

- [128] B. Yang, B.L. Yang, R.C. Savani, E.A. Turley, Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein, *EMBO J.* Vol.13, pp. 286–296, **1994**
- [129] M.A. Solis, Y.H. Chen, T.Y. Wong, V.Z. Bittencourt, Y.C. Lin, L.L.H. Huang, Hyaluronan regulates cell behavior: A potential niche matrix for stem cells, *Biochem. Res. Int.* vol. 2012, ID. 346972, **2012**
- [130] J. Cichy, E. Puré, The liberation of CD44, *J. Cell Biol.* vol.161, pp. 839–843, **2003**
- [131] M. Allouche, R.S. Charrad, A. Bettaieb, C. Greenland, C. Grignon, F. Smadja-Joffe, Ligation of the CD44 adhesion molecule inhibits drug-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells, *Blood*, vol. 96, pp. 1187–1190, **2000**
- [132] S. Legras, J.P. Lévesque, R. Charrad, K. Morimoto, C. Le Bousse, D. Clay, C. Jasmin, F. Smadja-Joffe, CD44-mediated adhesiveness of human hematopoietic progenitors to hyaluronan is modulated by cytokines, *Blood* vol. 89, pp.1905–1914 **1997**
- [133] J. Lesley, V.C. Hascall, M. Tammi, R. Hyman, Hyaluronan binding by cell surface CD44, *J. Biol. Chem*, vol. 275, pp. 26967–26975, **2000**
- [134] B.D. Gates, Q.B. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C.G. Willson, G.M. Whitesides, New approaches to nanofabrication: Molding, printing, and other techniques, *Chem. Rev.* vol. 105, pp. 1171–1196, **2005**
- [135] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem. Rev.* vol.105 pp. 1103–1169, **2005**
- [136] R. Otero, J.M. Gallego, A.L. Vázquez de Parga, N. Martín, R. Miranda, Molecular self-assembly at solid surfaces, *Adv. Mater.* vol. 23 pp. 5148–5176, **2011**
- [137] Y. Zhou, W. Huang, J. Liu, X. Zhu, D. Yan, Self-assembly of hyperbranched polymers and its biomedical applications, *Adv. Mater.* vol. 22 pp. 4567–4590, **2010**
- [138] C.-L. Chen, M.B. Keith, J. Oradian-Odak, J.D. James, In situ AFM study amelogenin assembly and disassembly dynamics on charged surfaces

- provides insight on matrix protein self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.* vol. 133 pp. 17406–17413, **2011**
- [139] H. Agheli, J. Malmstrom, E.M. Larson, M. Textor, D.S. Sutherland, Large area protein nanopatterning for biological applications, *Nano Lett*, vol. 6 pp. 1165–1171, **2006**
- [140] K. Matsuura, Rational design of self-assembled proteins and peptides for nano and micro-sized architectures, *RSC Adv.* vol. 4 pp. 2942–2953, **2014**
- [141] P. Kumaraswamy, R. Lakshmanan, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, Self-assembly of peptides: influence of substrate, pH and medium on the formation of supramolecular assemblies, *Soft Matter* vol. 7 no. 6 pp. 2744–2754, **2011**
- [142] R. Huang, R. Su, W. Qi, J. Zhao, Z. He, Hierarchical, interface-induced self-assembly of diphenylalanine: formation of peptide nanofibers and microvesicles, *Nanotechnology*, vol. 22, no. 24, **2011**
- [143] A.N. Rissanou, E. Georgilis, E. Kasotakis, A. Mitraki, V. Harmandaris, Effect of solvent on the self-assembly of dialanine and diphenylalanine peptides, *J Phys Chem B*. Vol. 117, no. 15, pp. 3962–75, **2013**
- [144] T.O. Mason, D. Y. Chirgadze, A. Levin, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, T. P. J. Knowles, A. K. Buelt, Expanding the Solvent Chemical Space for Self-Assembly of Dipeptide Nanostructures, *ACS Nano*, vol. 8 no. 2, pp. 1243–1253, **2014**
- [145] J. Jeon, M.S. Shell, Self-assembly of cyclo-diphenylalanine peptides in vacuum, *J Phys Chem B*. Vol. 118, no. 24, pp. 6644–52, **2014**
- [146] L. Adams vd. ark, “Contributors,” in Murray and Nadel’s Text Book of Respiratory Medicine (Six Edition), Philadelphia: W. B. Saunders, pp. 6–19, **2016**
- [147] F. Meggio, L. A. Pinna, One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2, *FASEB J*, vol.17 pp. 349–368, **2003**
- [148] J. T. Wang, S. S. Gong, Effects of siRNA specific to the protein kinase CK2 $\alpha$  on apoptosis of laryngeal carcinoma cells, *Chin Med J (Engl)*, vol. 125 pp. 1581–1585, **2012**

- [149] C. M. Hughes, O. Rozenblatt-Rosen, T. A. Milne, T. D. Copeland, S. S. Levine, J. C. Lee, D. N. Hayes, K. S. Shanmugam, A. Bhattacharjee, C. A. Biondi, G. F. Kay, N. K. Hayward, J. L. Hess, M. Meyerson, Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus, *Mol Cell*. vol. 13, no. 4, pp. 587-97, **2004**
- [150] Y. Dou, T. A. Milne, A. J. Ruthenburg, S. Lee, J. W. Lee, G. L. Verdine, C. D. Allis, R. G. Roeder, Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components, *Nat Struct Mol Biol*. vol.13, no. 8 pp. 713-9, **2006**
- [151] J. L. Hess, MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia, *Trends Mol Med*, vol. 10, pp. 500-507, **2004**
- [152] J. Lüscher-Firzlaff, I. Gawlista, J. Vervoorts, K. Kapelle, T. Braunschweig, G. Walsemann, C. Rodgarkia-Schamberger, H. Schuchlautz, S. Dreschers, E. Kremmer, R. Lilischkis, C. Cerni, A. Wellmann, B. Lüscher, The human trithorax protein hASH2 functions as an oncoprotein, *Cancer Res*. vol. 68, no. 3, pp. 749-58, **2008**
- [153] A. K. Järvinen, R. Autio, S. Haapa-Paananen, M. Wolf, M. Saarela, R. Greânman, I. Leivo, O. Kallioniemi, A. A. Mäkitie, O. Monni, Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses, *Oncogene*, vol. 25, pp. 6997–7008, **2006**
- [154] G. Moreno-Bueno, S. Rodriguez-Perales, C. Sanchez-Estevez, D. Hardisson, D. Sarrio, J. Prat, J. C. Cigudosa, X. Matias-Guiu, J. Palacios, Cyclin D1 gene (*CCND1*) mutations in endometrial cancer, *Oncogene*, vol. 22, pp. 6115-6118, **2003**
- [155] J. P. Alao, The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention, *Molecular Cancer*, vol. 6, no. 24, pp. 1-16, **2007**
- [156] L. L. Gleich, F. N. Salamone, Molecular genetics of head and neck cancer, *Cancer Control*, vol. 9, no. 5, pp. 369-378, **2002**
- [157] A. Celetti, D. Testa, S. Staibano, F. Merolla, V. Guarino, M. D. Castellone, R. Iovine, G. Mansueto, P. Somma, G. D. Rosa, V. Galli, R. M. Melillo, M. Santoro, Overexpression of the Cytokine Osteopontin Identifies Aggressive Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and Enhances

- Carcinoma Cell Proliferation and Invasiveness, *Clin Cancer Res*, vol. 11, no. 22, **2005**
- [158] H. D. Singh, G. Wang, H. Uludag, L.D. Unsworth, Poly-L-lysine-coated albumin nanoparticles: Stability, mechanism for increasing in vitro enzymatic resilience, and siRNA release characteristics, *Acta Biomaterialia* vol. 6, no. 2010, pp. 4277–4284, **2010**
- [159] M. S. Draz, B. A. Fang, P. Zhang, Z. Hu, S. Gu, K. C. Weng, J. W. Gray, F. F. Chen, Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of Cancers and Viral Infections, *Theranostics*, Vol. 4, no. 9, **2014**
- [160] C. Zhipeng, C. Juan, W. Li, L. Weidong, C. Jun, C. Haibo, P. Jinhua, C. Baochang, Hyaluronic acid-coated bovine serum albumin nanoparticles loaded with brucine as selective nanovectors for intra-articular injection, *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3843-2853, **2013**
- [161] H. Di, C. Ying-Shan, R. Ilva, Hyaluronic Acid Coated Albumin Nanoparticles for Targeted Peptide Delivery to the Retina, *Molecular Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2, pp. 533-545, **2017**
- [162] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J.Immunol.Methods*, vol. 65, pp. 55-63, **1983**
- [163] L. F. Gao, L. J. Wen, H. Yu, L. Zhang, Y. Meng, Y. T. Shao, D. Q. Xu, X. J. Zhao, Knockdown of Stat3 expression using RNAi inhibits growth of laryngeal tumors in vivo, *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 27, no. 3, pp. 347-352, **2006**
- [164] Y. Matsuda, T. Schlange, E. J. Oakeley, A. Boulay, N.E. Hynes, WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth, *Breast Cancer Research* Vol. 11 No. 3, **2009**
- [165] P. Nigam, S. Waghmode, M. Louis, S. Wangnoo, P. Chavan, D. Sarkar, Graphene quantum dots conjugated albumin nanoparticles for targeted drug delivery and imaging of pancreatic cancer, *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 3190, **2014**

- [166] A. S. Lammel, X. Hu, S. Park, D. L. Kaplan, T. R. Scheibel, Controlling silk fibroin particle features for drug delivery, *Biomaterials*, vol. 31, **2010**
- [167] L. Thomas, S. Aubuchon, Heat Capacity Measurements Using Quasi-Isothermal MDSC, *Thermal Analysis & Rheology*,



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı Eda YALÇIN  
Doğum Yeri Malatya  
Medeni Hali Bekar  
E-posta edaylc85@windowslive.com  
Adresi Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Beytepe, Çankaya, Ankara

### Eğitim

Lisans Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi  
Yüksek Lisans Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

**Yabancı Dil ve Düzeyi** Almanca/iyi İngilizce/iyi

**İş Deneyimi** Araştırma Görevlisi, Aksaray Üniversitesi, 2010-2013  
T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 2013 - devam ediyor

**Deneyim Alanları** Nanofibriler yapılar, Polimerik Nanomalzemeler, ipek proteinleri

**Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi** TÜBİTAK 1001 Projesi (Proje No: 115R018, Bütçe: 498.240TL)

### Tezden Üretilmiş Yayınlar

---

### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Preparation and characterization of silk proteins based nanoparticles as siRNA carriers to be used in larynx cancer therapy (12th Nanoscience and Nanotechnology Conference, June 2016),
- Silk Protein Based siRNA Nanocarriers to be used in Larynx Cancer Therapy: Cellular Interactions Studies (Nanotech Middle East 2017 Conference and Exhibition NANOTECH ME 2017 December 2017 | Dubai - United Arab Emirates)



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Tarih:26/02/2018

Tez Başlığı / Konusu: Kanser Tedavisinde Kullanılmak Üzere İpek Protein Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 133 sayfalık kısmına ilişkin, 26/02/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.



26/02/2018

Adı Soyadı: Eda Yalçın  
Öğrenci No: N12145285  
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı  
Programı: Doktora  
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.



Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

(Unvan, Ad Soyad, İmza)