T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Büşra CESUR ERGÜN
DOKTORA TEZİ
2025-ANTALYA

MEME KANSERİ TEDAVİSİ İÇİN RGD HEDEFLİ GEN TAŞIYICI NANOSİSTEMLERİN TASARIMI, *İN VİTRO* VE *İN VİVO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Büşra CESUR ERGÜN

DOKTORA TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MEME KANSERİ TEDAVİSİ İÇİN RGD HEDEFLİ GEN TAŞIYICI NANOSİSTEMLERİN TASARIMI, *İN VİTRO* VE *İN VİVO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Büşra CESUR ERGÜN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2024-6417 proje numarası ile desteklenmiştir

"Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir"

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Doktora Programında Doktara tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. S. Sadi ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mehtap SAVRAN
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER
Ege Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ……/……./…….... tarih ve ……/…….. sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Büşra CESUR ERGÜN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, bilgisi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisi, araştırmalarımda bana rehberlik ederek akademik gelişimime önemli katkılarda bulunmuştur.

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. S.Sadi ÖZDEM başta olmak üzere, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak sağladıkları destekten dolayı minnettarım.

Gen ve Hücre Tedavisi Anabilim Dalı laboratuvarının kapılarını bana açarak araştırmalarımda önemli bir rol oynayan ve laboratuvar altyapısını kullanma fırsatı sunan değerli hocam Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na ve Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na teşekkür ederim. Hücre temini konusunda yardımlarını sunan Prof. Dr. Nuray ERİN'e ve Öğr. Gör. Dr. Büşra ŞENSOY GÜN'e, plazmid DNA temininde bana yardımcı olan ve değerli katkılarını sunan Prof. Dr. Emine ŞALVA'ya özel teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, doktora sürecinde yurtdışında deneyim kazanmamı sağlayan ve laboratuvarında çalışmama olanak tanıyan Prof. Dr. Fabio SONVICO'ya şükranlarımı sunarım. Bu değerli deneyim, bilimsel ufkumu genişletmeme ve uluslararası bir bakış açısı kazanmama vesile olmuştur.

Bu süreçte yanımda olarak manevi desteğini esirgemeyen, her zaman motivasyon kaynağım olan sevgili yol arkadaşlarım Dr. Fulya ERENDOR CİHAN ve Büşra ÇETİN, Feride ÖNER'e ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Sizlerle paylaştığım bilgi ve deneyimler, bana yalnız olmadığımı hissettirdi.

TÜBİTAK' a 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Programı kapsamında bana vermiş olduğu desteği için teşekkür ederim. Ayrıca, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne idari ve akademik destekleri için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda yanımda olan, sevgileri ve destekleriyle bana güç veren annem Gönül CESUR'a, babam Mustafa CESUR'a ve biricik kardeşim Burak CESUR'a minnettarım. Sizi her zaman yanımda hissetmek, bu zorlu süreçte bana büyük bir moral kaynağı olmuştur.

Son olarak, bu sürecin en zor ve en yorucu anlarında bile bana sabırla destek olan, çalışırken ve tez yazarken yanımda yer alan, fedakarlık gerektiren bu süreçte beni motive eden ve her zaman yanımda olan değerli eşim Op. Dr. Muhammed ERGÜN'e ve ailesine en derin teşekkürlerimi sunarım. Sizin anlayışınız ve sabrınız, bu yolculuğu anlamlı kılan en değerli hediyemdir.

Bu çalışmaya doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunan, fikir ve önerileriyle bana ilham veren, yolculuğumda bana eşlik eden herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu tez çalışmasının temel amacı, üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK) tedavisinde kullanılmak üzere, RGD peptidi ile hedeflendirilmiş ve plazmid DNA (pDNA) taşıyan lipit-polimer hibrit gen taşıyıcı sistemlerin (LPH-GTS) geliştirilmesi ve bu sistemlerin *in vitro* ve *in vivo* etkinliğinin değerlendirilmesidir. Özellikle tümör anjiyogenezini tetikleyen vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gen ekspresyonunu hedefleyerek tümör progresyonunun baskılanması hedeflenmiştir.

Yöntem: Geliştirilen hibrit nanosistemler, DSPE-PEG-Maleimid ve tiyol grubu içeren siklik RGD peptidinin bağlanma özelliğinden yararlanılarak tasarlanmıştır. Fizikokimyasal karakterizasyon kapsamında dinamik ışık saçılımı (DLS) analizleri ile partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi (PDI) ölçülmüştür. Sistemlerin serum ve DNaz I stabilitesi ile sodyum dodesil sülfat (SDS) ortamında gen salım profilleri değerlendirilmiştir. *In vitro* etkinlik analizleri 4T1 ÜNMK hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiş, *in vivo* çalışmalar ise BALB/c fare tümör modeli üzerinden yürütülmüştür. Tümör doku ve serumdaki VEGF düzeyleri ELISA analizleri ile incelenmiştir.

Bulgular: Elde edilen RGD ile hedeflenmiş nanosistemlerin ortalama parçacık boyutu 19.40±0.43 nm, zeta potansiyeli +22.8±1.6 mV ve PDI değeri 0.25 olarak belirlenmiştir. *In vitro* veriler, sistemin hedefleme yeteneğine sahip ve etkin transfeksiyon yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. *In vivo* deneylerde ise tümör hacminde anlamlı küçülme ve VEGF ekspresyonunda baskılanma tespit edilmiştir.

Sonuç: RGD peptidiyle hedeflendirilmiş LPH-GTS, 4T1 ÜNMK ve L929 fibroblast hücre hatları üzerinde düşük toksisite, yüksek biyouyumluluk, kanser hücrelerinde etkin gen transferi ve tümöre özgü hedefleme özellikleriyle ileri tedavi tıbbi ürün potansiyeline sahip, umut vadeden bir gen taşıyıcı sistem olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Üçlü negatif meme kanseri, hedefleme, gen tedavisi, lipit polimer hibrit nanosistem.

ABSTRACT

Objective: The primary aim of this thesis study is to develop lipid–polymer hybrid gene delivery systems (LPH-GDS) carrying plasmid DNA (pDNA) and functionalized with RGD peptides for the treatment of triple-negative breast cancer (TNBC), and to evaluate the the efficacy of these systems *in vitro* and *in vivo*. The study particularly aims to suppress tumor progression by targeting the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), a key mediator of tumor angiogenesis.

Methods: The designed hybrid nanosystems were designed by utilizing the binding affinity between DSPE-PEG-Maleimide and thiol-functionalized cyclic RGD peptides. Physicochemical characterization was performed using dynamic light scattering (DLS) to determine particle size, zeta potential, and polydispersity index (PDI). The stability of the nanosystems in serum and against DNase I, as well as their gene release profiles in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS), were also evaluated. *In vitro* studies were conducted using the 4T1 TNBC cell line while BALB/c mouse tumor model were used to perform *in vivo* experiments. The levels of VEGF in tumor tissues and serum were assessed through ELISA analysis.

Results: The RGD-targeted nanosystems exhibited an average particle size of 19.40 ± 0.43 nm, zeta potential of $+22.8 \pm 1.6$ mV, and PDI value of 0.25. *In vitro* results demonstrated efficient transfection capability with tumor-targeting specificity. *In vivo* studies showed a significant reduction in tumor volume along with suppressed VEGF expression levels in the treatment group.

Conclusion: The RGD peptide-targeted LPH-GTS was evaluated as a promising gene delivery platform with advanced therapy medicinal product (ATMP) potential, owing to its low cytotoxicity and high biocompatibility in 4T1 TNBC and L929 fibroblast cell lines, as well as its effective gene transfer and tumor-specific targeting capacity in breast cancer cells.

Keywords: Triple negative breast cancer, targeting, gene therapy, lipid polymer hybrid nanosystem.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT ii

İÇİNDEKİLER iii

TABLOLAR DİZİNİ iv

ŞEKİLLER DİZİNİ v

SİMGELER ve KISALTMALAR vi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Kanser ve Genel Özellikleri 3

2.2. Meme Kanseri ve Epidemiyolojisi 4

2.3. Meme Kanserinin Moleküler Özelliklerine Göre Alt Tipleri 5

2.4. Meme Kanseri İçin Uygulanan Güncel Tedavi Yaklaşımları 6

2.5. Gen Tedavisi ve Meme Kanseri 8

2.5.1. Gen Tedavisinin Temel İlkeleri 8

2.5.2. Meme Kanserinde Gen Tedavisi Uygulamaları 23

2.6. Taşıyıcı Sistemlerin Hedeflenmesi 27

2.7. RGD Peptidi ve Hedeflenmiş Tedavi Yaklaşımları 29

2.7.1. RGD Peptidinin Yapısı ve Biyolojik Önemi 29

2.7.2. RGD Peptidi ile Hedeflenmiş Nanotaşıyıcılar 31

2.7.3. Meme Kanseri Tedavisinde RGD Tabanlı Yaklaşımlar 33

3. GEREÇ ve YÖNTEM 36

3.1. Çalışmada Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Bileşenler 36

3.2. Kullanılan Araç-Gereçler 37

3.3. Deneysel Çalışmalar 39

3.3.1. Kullanılacak Genetik Materyalin Belirlenmesi ve Elde Edilme Süreci 39

3.3.2. Genetik Materyalin Karakterizasyonu 40

3.3.3. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması 41

3.3.4. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu 43

3.3.5. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Organoleptik Özelliklerinin Belirlenmesi 44

3.3.6. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemin Stabilite Çalışmaları 44

3.3.7. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemin Sitotoksisite Çalışmaları 44

3.3.8. Genetik Materyal İçeren Komplekslerin Hazırlanması 44

3.3.9. Genetik Materyal (psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA) İçeren Gen Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu 45

3.3.10. Genetik Materyal (psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA) İçeren Gen Taşıyıcı Sistemin DLS Analizleri 45

3.3.11. Genetik Materyal (psiRNA- VEGFA/VEGFR2 pDNA) İçeren Gen Taşıyıcı Sistemlerin Stabilite Çalışmaları 45

3.3.12. Sitotoksisite Çalışmaları 46

3.3.13. Transfeksiyon Çalışmaları 47

3.3.14. Hücrelerin Migrasyon Hızının Değerlendirilmesi 47

3.3.15. Kanser Hücrelerinde VEGF Ekspresyonunun Susturulduğunun Gösterilmesi VEGF Protein Düzeyinin Analizi 48

3.3.16. *In Vivo* Çalışmalar 48

3.3.17. İmmünohistokimyasal Analizler 50

3.3.18. İstatistik Analizler 52

4. BULGULAR 53

4.1. Ön Formülasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular 53

4.2. Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması 55

4.3. Genetik Materyalin Saflığına ve Konsantrasyona Ait Bulgular 56

4.4. LPH-GTS:pDNA Komplekslerin Oluşumu 57

4.5. LPH-GTS:pDNA Komplekslerinin DNaz I Enzimi Varlığında Stabilitelerinin Değerlendirilmesi 57

4.6. SDS Salım Çalışmasına Ait Bulgular 58

4.7. LPH-GTS:pDNA Komplekslerinin Transfeksiyon Başarısının Değerlendirilmesi 59

4.8. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi 60

4.9. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin pDNA Komplekslerinin Oluşturulmasına Ait Bulgular 61

4.10. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu 62

4.11. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular 62
4.12. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksisite Bulguları 65
4.13.RGD Aracılı Hedefleme Etkinliğinin Kompetitif İnhibisyon ile Doğrulanması 67
4.14. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Invazyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi 68
4.15. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin *In vitro* Gen Susturma Etkinliğinin Protein Düzeyinde Değerlendirilmesi 70
4.16. RGD Bağımlı Hedeflemenin Gösterilmesi 71
4.17. *In vitro* ELISA Deney Sonuçları 71
4.18. *In vivo* Çalışmalar 72
4.19. Primer Tümörlerde Hücre Proliferasyonuns Bağlı Büyüme Hızındaki Değişimlerin İncelenmesi 73
4.20. Hayvan Ağırlığı Takibi 75
4.21. Primer Tümör Kitlelerinin Ağırlık Bulgularının Değerlendirilmesi 76
4.22. Primer Tümör Dokularının İmmünohistokimyasal Görüntülemesi 77
4.23. Gen Susturma Etkinliklerinin Değerlendirilmesi 78
5. TARTIŞMA 80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 94
EK 97
KAYNAKLAR 98
ÖZGEÇMİŞ 111

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Viral olmayan gen taşıyıcı sistemler ve uygulamalar alanları	20
Tablo 2.2.	Viral olmayan gen taşıyıcı sistemler ve kanserdeki uygulamaları	20
Tablo 2.3.	4T1 meme kanseri için hedeflenebilecek reseptörler/moleküller	28
Tablo 2.4.	Son yıllarda RGD stratejisinin meme kanseri tanı ve tedavisinde kullanımı	35
Tablo 3.1.	Önformülasyon çalışmalarına ait içerik ve yöntem	41
Tablo 4.1.	Önformülasyon çalışmasına ait bulgular	53
Tablo 4.2.	Hazırlanan sistemlerin partikül çapı, yüzey potansiyeli ve boyut dağılım verileri	62
Tablo 4.3.	Gen taşıyıcı sistemlere ait +5°C ± 3 °C ve +25°C± 2 °C'de fiziksel stabilite bulguları.	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Viral olmayan taşıyıcı sistemler	11
Şekil 2.2.	cRGD ve DSPE-PEG-Maleimit kimyasal yapıları	29
Şekil 2.3.	cRGD ve integrin bağlanmasının gösterimi	30
Şekil 3.1.	psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'sına ait gen haritası (Snapgene ile oluşturulmuştur).	39
Şekil 3.2.	Fare meme bezi bölgelerinin anatomik konumunu gösteren diyagram	49
Şekil 4.1.	Lipit polimer temelli hibrit sistemin hazırlanışı.	55
Şekil 4.2.	psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'sına ait agaroz elektroforez görüntüleri. **a.** psiRNA-VEGFA/VEGFR2 'nin elektroforetik kontrolü 1. 1 kb DNA ladder, 2. psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidi. **b.** psiRNA-VEGFA-VEGFR2'nin restriksiyon enzimiyle doğrulanması. 1. psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidi. 2. BsrGI restriksiyon enzimiyle kesim sonrası.	56
Şekil 4.3.	LPH-GTS: pDNA kompleksleşme çalışmalarına ait elektroforez jel görüntüleri. Kuyucuklara yüklenen örnekler sırasıyla; 1: serbest psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid, 2: taşıyıcı sistem, 3,4,5,6,7: sırasıyla LPH:GTS:pDNA 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 h/h oranlarında kompleksler.	59

Şekil 4.4. LPH-GTS:pDNA komplekslerinin DNaz I enzimi varlığında stabilitelerini gösteren agaroz jel fotoğrafı. Kuyucuklara yüklenen örnekler sırasıyla; 1: serbest pDNA, 2: DNaz I il dakika boyunca inkübasyona bırakılmış çıplak pDNA, 3: K19 (T19:pDNA 1:1 h/h)+ DNaz I , 4: K20 (T20:pDNA 5:1 h/h) + DNaz I, 5: K23 (T23:pDNA 1:1 h/h)+ DNaz I, 6: K32 (T32:pDNA 1:1 h/h)+ DNaz I, 7: K44 (T44:pDNA 1:1 h/h)+ DNaz I ile inkübasyonu sonrası jel görüntüleri. 58

Şekil 4.5. LPH-GTS:pDNA komplekslelerinden SDS teşviki ile pDNA'nın serbest hale geçirilmesine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kuyucuklara yüklenen örnekler sırasıyla; 1: SDS uygulanmamış serbest pDNA kontrolü; kuyucuk 2–7: SDS ile muamele edilen kompleks örnekleri. Sırasıyla LPH-GTS: pDNA (h/h) oranları 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1'tir. 59

Şekil 4.6. LPH-GTS:pDNA kompleksleriyle gerçekleştirilen transfeksiyon sonrası, 48. saatte elde edilen inverted floresan mikroskop görüntüleri. Görüntüler, genel görünümü temsil edecek şekilde ve 10X büyütmede kaydedilmiştir. 60

Şekil 4.7. Hedeflenebilir lipit polimer temelli hibrit sistemin hazırlanışı. 60

Şekil 4.8. LPH-GTS-cRGD:pDNA komplekslerinin şeması. 61

Şekil 4.9. LPH-GTS ve LPH-GTS-cRGD ile psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA arasında kompleksleşme çalışmalarına ait agaroz jel elektroforez görünütüleri. Kuyucuklara yüklenen örnekler sırasıyla; 1: serbest pDNA, 2: LPH-GTS, 3: LPH-GTS:pDNA 1:1 h/h, ,4: LPH-GTS:pDNA 2:1 h/h ,5: LPH-GTS:pDNA 3:1 h/h hedeflenmemiş sistem için kompleks oluşumları, 6: LPH-GTS-cRGD 7: LPH-GTS- 62

cRGD:pDNA 1:1 h/h,,8: LPH-GTS-cRGD:pDNA 2:1 h/h, 9: LPH-GTS-cRGD:pDNA 3:1 h/h kompleks oluşumları.

Şekl 4.10. pH değerleri. 63

Şekil 4.11. Serumda inkübasyon yapılan örneklerin agaroz jel görüntüsü. Örnekler 0, 1, 3 ve 24 saat boyunca serum ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Kuyucuklara yüklenen örnekelr sırasıyla; 1: 0.sa, 2: 1.sa, 3: 3.sa, 4: 24.sa LPH-GTS-cRGD: psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid (1:1, h/h) kompleksi, 5: 1.sa, 6: 3.sa, 7: 24.sa, LPH-GTS: psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid (1:1, h/h) kompleksi, 8: 1.sa, 9: 3.sa, 10: 24.sa çıplak pDNA. 64

Şekil 4.12. LPH-GTS:pDNA komplekslerinin DNaz I enzimi varlığında stabilitelerini gösteren agaroz jel fotoğrafı. Kuyucuklara yükleme sırası; 1: serbest pDNA, 2: DNaz I ile 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmış çıplak pDNA, 3: LPH-GTS-cRGD:pDNA 1:1 h/h, 4: LPH-GTS-cRGD:pDNA 1:1 h/h oranında oluşturulmuş komplekslerin DNaz I ile inkübasyonu. 64

Şekil 4.13. LPH-GTS:pDNA komplekslelerinden SDS teşviki ile pDNA'nın serbest hale geçirilmesine ait agaroz jel elektroforez görüntüleri. Kuyucuklara yükleme sırası; 1: serbest pDNA, SDS ile muamele edilen kompleks örnekleri; sırasıyla 2: LPH-GTS: pDNA 1:1 h/h, 3: LPH-GTS-cRGD:pDNA 1:1 h/h oranında. 65

Şekil 4.14. L929 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarına ait bulgular. 66

Şekil 4.15. 4T1 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarına ait bulgular. 66

Şekil 4.16. L929 hücre hattı üzerinde pDNA konsantrasyon değişiminin sitotoksisite üzerine etkisi. 67

Şekil 4.17. 4T1 hücre hattı üzerinde pDNA konsantrasyon değişiminin sitotoksisite üzerine etkisi. 67

Şekil 4.18 RGD'ye bağımlı transfeksiyon sonrası 4T1 hücrelerinin inverted floresan görünütüleri (10X). A LPH-GTS-cRGD:psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid komplekslerinin uygulanmasından 30 dakika önce hücreler 10 μM serbest cRGD ile muamele edilmiştir. B Serbest cRGD uygulanmadan sadece kompleksler ile muamele edilmiştir. 68

Şekil 4.19. İnvazyon deneyine ait bulgular. (A) Mikroskop görüntüleri (10X) ve (B) migrasyon % grafiği. 69

Şekil 4.20. *In vitro* ELISA deney sonuçları. 70

Şekil 4.21. Transfeksiyon görüntüleri (inverted floresan görüntüleri, 10X). 71

Şekil 4.22. 4T1 hücrelerinde VEGF-A ekspresyon düzeyi 72

Şekil 4.23. *In vivo* çalışma dizaynı 73

Şekil 4.24. Meme kanseri modeli oluşturulan hayvan fotoğrafı şekilde gösterilmiştir. 74

Şekil 4.25. Çıkarılan primer tümörlerin görüntüleri. 74

Şekil 4.65. Tümör hacmindeki değişim grafiği. 74

Şekil 4.27. Tedavi süresince ve sakrifikasyona kadar geçen süre boyunca hayvanların vücut ağırlıklarının (gram cinsinden) ölçüm grafiği. 75

Şekil 4.28. Sağkalım analiz grafiği. 75

Şekil 4.29. Tümör ağırlığı değişim grafiği. 77

Şekil 4.30. Tümör modeli oluşturulan ve farklı gruplara ait primer tümör dokularının hematoksilen eosin (H&E) boyama ile elde edilen kesit görüntüleri. 78

Şekil 4.31. TM ve TM+LPH-GTS-cRGD:pDNA gruplarına ait tümör dokularının Ki-67 immünohistokimyasal boyama görüntüleri. 78

Şekil 4.32. Tümör meme doku örneklerinde ve kan serumlarında ELISA deneyine göre VEGF-A düzeyleri (pg/mg protein, pg/mL) verilmiştir. Çubuklar, ortalama ± standart sapma (SD) değerlerini temsil eden hata çubukları ile gösterilmiştir (n=5). İstatistiksel anlamlılık: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir. 78

SİMGELER ve KISALTMALAR

a/h :Ağırlık/Hacim Oranı

Bcl-2 :B hücreli lenfoma 2

BPEI :Dallanmış Polietilenimin

CAR :Kimerik Antijen Reseptörü

CO_2 :Karbondioksit

cRGD :siklik Arjinin–Glisin–Aspartik asit

DLS :Dinamik ışık saçılımı

DMEM :Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA :Deoksiribonükleik Asit

DOPE :1,2-di-oleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin

DOTAP :1,2-di-oleoil-3-trimetilamonyum propan

DOTMA :1,2-di-oleoil-3-trimetilamonyum-propil klorür

DOX :Doksorubisin

DPBS :Dulbecco Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

DSÖ :Dünya Sağlık Örgütü

E. coli :Escherichia coli

EDC :1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit

EGFR :Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EMA :Avrupa İlaç Ajansı

EPR :Artmış Geçirgenlik ve Tutulum

ER :Östrojen Reseptörü

FBS :Fetal Bovine Serum

FDA :Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

GFP :Yeşil Floresan Protein

GTMPs :Gen Tedavisi Tıbbi Ürünleri

h/h :Hacim/Hacim Oranı

H&E :Hematoksilen-Eozin

HER2 :İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü2

IFN- β :İnterferon Beta

IHK :İmmünohistokimyasal

IL-12 :İnterlökin-12

İTTÜ :İleri Tedavi Tıbbi Ürünleri

αvβ :İntegrin beta αvβ

kb :Kilobaz

kDa :Kilodalton

LB :Luria-Bertani

LNP :Lipit Bazlı Nanopartiküller

LPH-GTS :Lipit Polimer Hibrit Gen Taşıyıcı Sistem

mL :Mililitre

MNP :Manyetik Nanopartiküller

mPEG :Metoksi Polietilen Glikol

MRI :Manyetik Rezonans Görüntüleme

mRNA :Haberci Ribonükleik Asit

MTT :3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

mV :Milivolt

NHS :N-Hidroksisüksinimit

nm :Nanometre

nM :Nanomolar

PARP :Poli (ADP-riboz) Polimeraz

PD-1 :Programlanmış Hücre Ölüm Proteini-1

PD-L1 :Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı-1

PDI :Polidispersite İndeksi

pDNA :Plazmid Deoksiribonükleik Asit

PEG :Polietilen Glikol

PEI :Polietilenimin

pg :Pikogram

PLGA :Polilaktik-ko-glikolik asit

PR :Progesteron Reseptörü

RGD Arginin-glisin-aspartik asit

RNA :Ribonükleik Asit

RNAi :RNA İnterferansı

ROS :Reaktif Oksijen Türleri

SDS :Sodyum Dodesil Sülfat

shRNA : Kısa Halkalı RNA

siRNA : Küçük Girişimci RNA

TE : Tris-EDTA

TM : Tümör Grubu

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

TRAIL : Tümör Nekroz Faktörü İlişkili Apoptoz İndükleyic Ligand

UV : Ultraviolet

ÜNMK : Üçlü Negatif Meme Kanseri

VEGF : Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

µg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

µM : Mikromolar

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde çok sayıda yeni vakanın olduğu ve ölümle sonuçlanma riski yüksek olan ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Küresel ölçekte bakıldığında kanser, gelişmiş ülkelerde olduğu gibi gelişmekte olan ülkelerde de başlıca ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (Schwartz, 2024).

Kadınlarda meme kanseri, akciğer kanserini geçerek en sık teşhis edilen kanser türü olmuştur ve 2,3 milyon yeni vaka ile tüm kanser teşhislerinin %11,7'sini oluşturmaktadır. Meme kanseri aynı zamanda 685 bin ölümle kadınlarda kanser kaynaklı ölümlerin başında gelmektedir. Meme kanseri mortalite oranları, düşük ve orta insani gelişim indeksine sahip ülkelerde daha yüksektir, bu da meme kanserinin dünya çapında önemli bir sağlık sorunu olduğunu ve erken teşhis ve tedavi hizmetlerinin iyileştirilmesine duyulan ihtiyacı göstermektedir (Sung ve ark., 2021; Siegel ve ark., 2025).

Meme kanserinin bir alt türü olan üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK); östrojen (ER), progesteron reseptörleri (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (HER2) reseptörleri eksikliği nedeniyle diğer türlere göre daha agresif seyretmekte ve tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. Geleneksel kemoterapiler ve hedeflenmiş monoklonal antikor tedavileri sınırlı etkili olmakta; özellikle bu tür, tümör bölgesine yeterli dozda ulaşamayan ilaçlar ve sistemik toksisite gibi sorunlarla ilişkilendirilmektedir. Bu durum, hastalığın hedefe yönelik tedaviler ve yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (Sydlowski ve ark., 2021).

Bu bağlamda, anti-vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) stratejileri, tümör anjiyogenezini hedefleyen umut verici bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir. Buna ek olarak, integrin alfa v ve integrin beta 3 reseptörü gibi tümör spesifik hedeflerin kullanımı, gen tedavisi ve diğer inovatif yaklaşımların etkinliğini artırabilir. Özellikle RGD (arjinin-glisin-aspartik asit) peptidi gibi moleküller, bu reseptörlere yüksek afinite ile bağlanarak hedefli tedavi imkanı sunmaktadır (Cesur-Ergün ve ark., 2023).

Bu bilgiler ışığında, tez çalışmamız meme kanserinde anti-VEGF temelli gen tedavisi uygulamalarını, RGD peptit ile hedeflenmiş lipit polimer hibrit gen taşıyıcı sistemler (LPH-GTS) aracılığıyla *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırmayı hedeflemektedir. Bu, hem tedavi etkinliğini hem de sistemik yan etkileri azaltmayı amaçlayan önemli bir çalışmadır. Bu yaklaşım, güncel literatürde de vurgulanan hedefe yönelik tedavi stratejileri ve nanoteknolojik taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisindeki yükselen rolü ile paralel bir doğrultuda ilerlemiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Genel Özellikleri

Kanser, hücre büyüme ve farklılaşma süreçlerinin bozulması sonucunda ortaya çıkan; kontrolsüz hücre çoğalması, doku invazyonu ve metastaz yapma yeteneği ile karakterize edilen multifaktöriyel bir hastalıktır. Genetik mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin oluşumuyla gelişen kanser, moleküler, hücresel ve sistem düzeyinde değişikliklerle organizmanın homeostazını bozar (Sydlowski ve ark., 2021). Kanser, hücrelerin genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle kontrolsüz ve anormal bir şekilde çoğalmasıyla oluşan kompleks bir hastalıktır. Bu kontrolsüz büyüme, zamanla çevre dokulara zarar vererek vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. Kanser ciddi bir halk sağlığı sorunu olup küresel ölçekte başlıca mortalite nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu süreç, hücre içindeki DNA tarafından kontrol edilir. Sağlıklı hücreler, belirli bir düzen içinde büyür, çoğalır ve ölürler. Ancak DNA'da meydana gelen hasarlar veya mutasyonlar, hücre proliferasyonunun kontrolsüz hale gelmesine ve sonuç olarak kanser oluşumuna neden olabilir. Bu mutasyonlar, genetik yatkınlık, bazı kimyasallar, hava kirliliği, stres, yaşam tarzı alışkanlıkları, tütün kullanımı, radyasyon, enfeksiyon ajanları, sigara ve alkol kullanımı, obezite, sağlıksız beslenme gibi faktörler kanserin gelişiminde rol oynayan majör risk etmenlerindendir (Islami ve ark., 2022).

Ayrıca immün sistemin baskılanması, yaş ve hormonal dengesizlikler de kanser yatkınlığını artıran diğer unsurlar arasında yer alır (Hanahan, 2022; Tian ve ark., 2024). Tümörler, benign veya malign olabilir. İyi huylu tümörler genellikle çevre dokulara yayılmazken, kötü huylu tümörler invaziv özellik göstererek metastaz yapabilirler. Kanserler, köken aldıkları hücre veya doku türüne göre sınıflandırılırlar. Başlıca kanser türleri şunlardır:

- **Karsinomlar:** Epitel hücrelerinden kaynaklanan kanserlerdir ve en yaygın kanser türüdür. Meme, prostat, akciğer ve kolon kanserleri bu gruba girer.
- **Sarkomlar:** Bağ dokusu, kas ve kemik gibi mezenkimal dokulardan gelişen kanserlerdir.

- **Lösemiler:** Kemik iliğinde başlayan ve kan dolaşımına yayılan kan kanserleridir.
- **Lenfomalar:** Lenfatik sistemin hücrelerinden kaynaklanan kanserlerdir.

Kanserin belirtileri, türüne ve etkilenen organa göre değişiklik gösterirken, genel olarak ani ve açıklanamayan kilo kaybı, sürekli yorgunluk ve halsizlik, ciltte iyileşmeyen yaralar veya renk değişiklikleri, nedeni bilinmeyen ağrılar, lenf düğümlerinde şişlikler, idrar veya dışkılama alışkanlıklarındaki değişiklikler olarak tanımlanabilir. Bu belirtilerden bir veya birkaçının olması durumunda, erken tanı ve tedavi için bir an önce sağlık profesyoneline başvurmak oldukça önemlidir. Erken tanı ve uygun tedavi yaklaşımlarıyla kontrol altına alınabilir. Bireylerin periyodik sağlık kontrolleri yaptırmaları, sağlıklı yaşam alışkanlıkları edinmeleri ve risk faktörlerinden kaçınmaları, kanserle mücadelede önemli adımlardır (Fortarezza ve ark., 2024; Shi ve ark., 2024b).

2.2. Meme Kanseri ve Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, dünya genelinde 2,3 milyon yeni meme kanseri vakası bildirilmiş olup, bu durum meme kanserini tüm yeni kanser vakalarının %11,6'sını oluşturarak küresel ölçekte en sık teşhis edilen ikinci kanser haline getirmiştir. Meme kanseri ayrıca 185 ülkenin 157'sinde kadınlar arasında en sık teşhis edilen kanserdir (Sung ve ark., 2021; Bray ve ark., 2024).

2050 yılına kadar meme kanseri vakalarında ve ölüm oranlarında önemli bir artış olacağı ön görülmektedir. 2050 yılına kadar her yıl 3,2 milyon yeni meme kanseri vakası ve 1,1 milyon ölüm öngörülmektedir (Tian ve ark., 2024). Özellikle, yeni vakaların %71'i ve ölümlerin %79'u 50 yaş ve üzeri kadınlarda görülmektedir. Yaş, meme kanseri için en önemli risk faktörlerinden biridir. Hastalık çoğunlukla postmenopozal dönemde, yani 50 yaş ve sonrasında görülmektedir. Ancak son yıllarda, özellikle agresif alt tiplerin genç yaş gruplarında da görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir (Cameron ve ark.; Ponde ve ark., 2019). Etnik farklılıklar da meme kanseri epidemiyolojisinde belirleyicidir. Örneğin, Afrika kökenli Amerikalı kadınlarda ÜNMK alt tipi daha sık görülmekte ve bu grup daha kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (Zhang L. ve ark., 2015a).

Bu gidişata engel olabilmek için DSÖ 2021'de küresel meme kanseri mortalite oranını azaltmayı amaçlayan, erken teşhis için sağlık teşviki, zamanında teşhis ve kapsamlı meme kanseri yönetimi olan üç temel stratejiyle Küresel Meme Kanseri Girişimi'ne odaklanmıştır. Mevcut bulgular, meme kanserinin kadın popülasyonu içerisinde en sık

karşılaşılan malign tümörlerden biri olduğunu ve kansere bağlı yaşam kayıpları açısından da önemli bir yer tuttuğunu ortaya koymaktadır. Türkiye özelinde değerlendirildiğinde ise, meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser tipi olup, kadınlara özgü kanser olgularının yaklaşık dörtte birini teşkil etmektedir.

Sağlık Bakanlığı'nın 2025 yılı verilerine göre, bir yıl içinde toplam 223.000 kişiye kanser tanısı konulmuş olup, bu vakaların önemli bir kısmını meme kanseri oluşturmaktadır. Meme kanseri insidansı, dünya genelinde bölgesel, kültürel ve sosyoekonomik farklılıklara göre değişkenlik göstermektedir. Genellikle yüksek gelirli ülkelerde daha sık teşhis edilirken; düşük ve orta gelirli ülkelerde geç tanı, sınırlı tedavi erişimi ve düşük farkındalık düzeyleri nedeniyle mortalite oranları daha yüksektir (Qi ve ark., 2021; Sung ve ark., 2021; Siegel ve ark., 2023; Kim J. ve ark., 2025).

2.3. Meme Kanserinin Moleküler Özelliklerine Göre Alt Tipleri

Meme kanseri, klinik, histolojik ve moleküler düzeyde heterojen bir patolojik durum olup, moleküler alt tiplerine göre prognoz ve tedaviye yanıt açısından önemli farklılıklar göstermektedir. Son yıllarda moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte meme kanserleri gen ekspresyon profiline göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflama, hem hastalığın seyrini hem de tedavi stratejilerini belirlemede kritik rol oynamaktadır.

Meme kanserinin moleküler alt tipleri, genellikle immünohistokimyasal (IHK) belirteçler kullanılarak tanımlanan ER, PR ve HER2 varlığına göre sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflamaya göre temel dört moleküler alt tip tanımlanmıştır:

1. **Luminal A Tipi:** ER, PR pozitif, HER2 negatif ve düşük proliferatif indeks ile karakterizedir. Bu alt tip iyi prognoza sahip olup hormon tedavisine oldukça duyarlıdır (Abubakar ve ark., 2019).
2. **Luminal B Tipi:** ER pozitif, genellikle PR negatif veya düşük ekspresyonlu, HER2 pozitif ya da negatif olabilir. Ki-67 proliferasyon indeksi daha yüksektir. Prognozu Luminal A'ya göre daha kötüdür ve kemoterapiye de ihtiyaç duyabilir. Hormon tedavisinin yanı sıra, HER2 pozitif olanlar için hedefe yönelik tedaviler uygulanabilir. Bu alt tipte, kemoterapi ve hormon tedavisinin kombinasyonuna daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır (Abubakar ve ark., 2019).
3. **HER2 pozitif (non-luminal) Tip:** ER ve PR negatif, HER2 pozitif olan tümörleri içerir. Agresif seyreder ancak trastuzumab, pertuzumab gibi anti-HER2

hedefli tedavilere yanıt verme potansiyeli yüksektir (von Minckwitz ve ark., 2019).

4. **Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK):** ER, PR ve HER2'nin hiçbirinin eksprese edilmediği bu alt tiptir. Genç kadınlarda daha sık görülür ve kötü prognozludur. Kemoterapi standart tedavi olarak uygulanmaktadır. Hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle nüks oranı yüksektir . Daha yüksek mortalite oranına sahip olduğu bildirilmiştir (Schmid ve ark., 2018).

Moleküler alt tipler yalnızca prognostik değil, aynı zamanda prediktif bilgi de sağlamaktadır. Özellikle genetik mutasyonlarla ilişkili alt gruplar tedavi planlamasında önemlidir. Bu doğrultuda bazı çalışmalarda ÜNMK alt tipleri bazal-benzeri, mezenkimal, immünomodülatör ve luminal androjen reseptör pozitif olarak daha ileri düzeyde alt sınıflamalara ayrılmıştır (Bareche ve ark., 2018; Wang D. Y. ve ark., 2019). Moleküler alt tiplerin belirlenmesi, bireye özgü tedavinin temel yapı taşlarından biri haline gelmektedir. Çünkü farklı alt tipler farklı biyolojik davranışlar sergiler, metastaz yayılım biçimleri değişkenlik gösterir ve tedaviye verdikleri yanıtlar farklılık göstermektedir. Her alt tipin kendine özgü özellikleri, tedavi yaklaşımlarını ve prognozları etkileyerek etkili bir tedavi planı oluşturmak için kritik öneme sahiptir. Günümüzde klinikte, moleküler profilin değerlendirilmesi neredeyse her vakada zorunlu hale gelmiştir (Jallah ve ark., 2023; Thuc Nguyen ve ark., 2023).

2.4. Meme Kanseri için Uygulanan Güncel Tedavi Yaklaşımları

Meme kanserine yönelik tedavi, tümörün moleküler alt tipi, evresi, hastanın yaşı, menopoz durumu, komorbiditeleri ve hastanın tercihleri doğrultusunda kişiselleştirilmiş şekilde planlanır. Tedavi yaklaşımları genellikle cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi, hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapiler gibi multidisipliner yöntemleri kapsar (Hung ve ark., 2023; Bertozzi ve ark., 2025; Mesa-Eguiagaray ve ark., 2025). Günümüzde hedefe yönelik ve biyolojik tedavi stratejilerinin gelişmesiyle birlikte, klasik tedavilere kıyasla daha etkin ve toksisitesi düşük tedavi modelleri geliştirilmektedir.

Cerrahi Tedavi

Cerrahi, erken evre meme kanseri tedavisinin temel yapı taşını oluşturur. Meme koruyucu cerrahi (lumpektomi) ve mastektomi (memenin tamamının çıkarılması) olmak

üzere iki ana cerrahi yöntem uygulanmaktadır. Meme koruyucu cerrahi, genellikle adjuvan radyoterapi ile kombine edilmektedir. Lokal lenfatik yayılımın belirlenmesinde, sentinel lenf nodu biyopsisi ile aksiller diseksiyon başlıca cerrahi değerlendirme yöntemleri arasında yer almaktadır (Burstein ve ark., 2019).

Kemoterapi

Kemoterapi, adjuvan, neoadjuvan ya da metastatik hastalıkta palyatif amaçlı uygulanmaktadır. Neoadjuvan kemoterapi özellikle tümörün küçültülmesi ve meme koruyucu cerrahi için kullanılmaktadır. En yaygın kullanılanlar antrasiklin ve taksan türevleridir (Untch ve ark., 2010).

Radyoterapi

Radyoterapi, lokal nüksü azaltmak amacıyla genellikle cerrahi sonrası uygulanmaktadır. Meme koruyucu cerrahi sonrası tüm meme alanına veya mastektomi sonrası riskli alanlara ışınlama yapılır. Ayrıca ileri evre veya lokal olarak ilerlemiş tümörlerde, palyatif amaçla da kullanılabilmektedir (Recht ve ark., 2017).

Hormon Tedavisi

ER ve/veya PR pozitif olan hormon reseptör pozitif meme kanserlerinde, hormonal tedavi önemli bir yer almaktadır. Premenopozal kadınlarda tamoksifen, postmenopozal kadınlarda ise aromataz inhibitörleri (letrozol, anastrozol, eksemestan) tercih edilmektedir. Bu tedavi genellikle 5–10 yıl süreyle uygulanmaktadır. Hormon tedavisi, nüks riskini azaltmakta ve sağkalımı artırmaktadır (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2015).

Moleküler Hedeflere Dayalı Tedavi Yaklaşımları

Hedefe yönelik ajanlar, yalnızca kanser hücrelerinde bulunan özgül yapıları hedef alarak tedavide seçiciliği artıran modern yaklaşımlar arasında yer almaktadır. En yaygın kullanılanı, HER2 pozitif meme kanserlerinde kullanılan trastuzumab ve pertuzumab gibi anti-HER2 monoklonal antikorlardır. Bu ajanlar kemoterapi ile kombine edildiğinde sağkalımı anlamlı şekilde uzatmaktadır. Ayrıca lapatinib ve neratinib gibi HER2/EGFR tirozin kinaz inhibitörleri de ileri evre tedavide kullanılmaktadır (Mendes D. ve ark., 2015).

İmmünoterapi

Son yıllarda özellikle ÜNMK gibi immünojenik alt tiplerde immünoterapi umut verici sonuçlar göstermektedir. PD-1/PD-L1 (Programlanmış Hücre Ölüm Proteini-1, Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı-1) inhibitörleri kemoterapi ile kombine olarak metastatik ÜNMK'de kullanılmaktadır (Schmid ve ark., 2018).

PARP (Poli (ADP-riboz) Polimeraz) İnhibitörleri ve Diğer Biyolojik Ajanlar

BRCA mutasyonu taşıyan hastalarda DNA onarımında görevli PARP enzimlerini inhibe eden ajanlar kullanılarak selektif sitotoksisite sağlanmaktadır. Bu ajanlar, özellikle kemoterapiye dirençli hastalarda önemli bir tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadır (Robson ve ark., 2017).

Bireye Özgü Tedavi Yaklaşımı

Günümüzde hastaların tümör profili, genetik mutasyonları ve immünolojik özellikleri doğrultusunda tedavi algoritmaları belirlenmektedir. Moleküler biyobelirteçlerin kullanımı, tedaviye uygun hasta alt gruplarının seçilmesine olanak sunmaktadır. Aynı zamanda tedavi etkinliğini artırmakta ve toksisiteyi azaltmaktadır (Rodrigues-Ferreira ve ark., 2022; Ultimescu ve ark., 2024).

2.5. Gen Tedavisi ve Meme Kanseri

2.5.1. Gen Tedavisinin Temel İlkeleri

Gen tedavisi, düzenleyici otoriteler tarafından terapötik amaçlarla hücrelere genetik materyalin aktarılması temelinde tanımlanmaktadır. FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi), gen tedavisini "bir kişinin genetik materyalini hastalıkları tedavi etmek veya iyileştirmek amacıyla değiştirmeye yönelik bir yaklaşım" olarak tanımlamaktadır. Genetik bozuklukların düzeltilmesi, hatalı genlerin susturulması ya da işlevsel yeni genlerin eklenmesi gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleştirilebilmektedir. FDA'ya göre gen tedavisi ürünleri; kalıtsal hastalıklar, kanser ve viral enfeksiyonlar da dahil olmak üzere birçok hastalık için geliştirilmekte olan biyolojik ürünlerdir (Demir-Dora ve ark., 2023; Baroukhian ve ark., 2024; Roskoski, 2024; von Fritschen ve ark., 2024).

EMA (Avrupa İlaç Ajansı) ise gen tedavisini, "terapötik, tanısal veya profilaktik etkiyi genetik materyalin hücrelere doğrudan veya dolaylı aktarımı yoluyla gösteren ileri tedavi tıbbi ürünleri" olarak sınıflandırmaktadır. EMA'ya göre gen tedavisi tıbbi ürünleri (GTMPs), insan genomunun kalıcı olarak değiştirilmesini hedefleyen veya genetik

materyalin ifadesine dayalı etki gösteren ürünleri kapsamaktadır. Gen tedavisi ürünleri, EMA'nın "advanced therapy medicinal products" (ATMP) çerçevesinde değerlendirilmektedir (Salmikangas ve ark., 2015; Kim J. ve ark., 2022; McGrath ve ark., 2022).

Bu iki büyük regülatör kurumun yaklaşımı, gen tedavisinin moleküler temelli, hedefe yönelik ve potansiyel olarak küratif bir tedavi stratejisi olduğunu vurgulamaktadır. Aynı zamanda bu ürünlerin üretimi, kontrolü ve klinik uygulanabilirliği açısından biyogüvenlik standartlarına uyum zorunluluğu bulunmaktadır (Demir-Dora, 2021).

Gen tedavisinde kullanılan genetik materyaller farklı stratejilere dayanmaktadır:

- **Gen ekleme:** Mutasyona uğramış veya eksik bir genin yerine, fonksiyonel bir genin eklenmesi esasına dayanmaktadır. Genellikle pDNA ve vektör aracılığıyla hedef hücreye gen transferi yapılır. Örnek olarak; p53 tümör baskılayıcı genin inaktive olduğu kanser tiplerinde, bu genin yeniden ekspresyonu ile tümör supresyonu sağlanabilir (Feng ve ark., 2019).
- **Gen susturma:** Hastalığa sebep olan aşırı veya anormal şekilde eksprese edilen genlerin susturulmasıdır. siRNA (küçük girişimci RNA) veya shRNA'lar (kısa halkalı RNA) hedef mRNA'ya (haberci RNA) bağlanarak translasyonu engeller veya mRNA'yı degradasyona uğratmaktadır.
- **Gen düzenleme:** CRISPR/Cas9 gibi sistemlerle doğrudan genomun düzenlenmesini ve mutasyonun düzeltilmesini hedeflemektedir (Oh ve ark., 2020).
- **İmmünoterapiye yönelik gen transferi:** T hücrelerine CAR (Kimerik Antijen Reseptörü) genlerinin verilmesiyle kanserle savaşan hücrelerin yeniden programlanması sağlanmaktadır (June ve ark., 2018).

Bu yaklaşımlar, hedef hastalığın moleküler alt yapısına bakılarak belirlenmektedir:

Hedef Hücre ve Doku Seçimi

Gen tedavisinin başarısı, genetik materyalin istenen hücre veya dokuya iletilmesiyle doğrudan ilişkilidir. Kanser gibi hastalıklarda, hedefleme stratejileri büyük önem taşımaktadır.

Gen Taşıyıcı Sistemler

Genetik materyalin stabilitesini koruyarak hücre içine alınabilmesi için taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sistemler iki ana gruba ayrılabilir:

- **Viral vektörler:** Lentivirüs, adenovirüs ve adeno-ilişkili virüs gibi vektörler, yüksek transfeskiyon verimine sahip olsalar da immünojenisite ve toksisite gibi aşılması gereken kısıtlamaları bulunmaktadır.
- **Viral olmayan vektörler:** Nanopartiküller, lipit temelli sistemler, dendrimerler, niozomlar, miseller gibi taşıyıcı sistemler daha güvenli, ölçeklenebilir ve özelleştirilebilir olmaları nedeniyle tercih edilmektedir (Wang C. ve ark., 2023).

Viral olmayan gen taşıyıcılar, sentetik veya doğal kaynaklı malzemelerin yardımıyla genetik materyalin stabilizasyonu ve taşınması için tasarlanmış sistemlerdir (Demir-Dora, 2020). Genellikle pozitif yüklü materyaller, negatif yüklü genetik materyallerle elektrostatik etkileşim kurarak kompakt yapılar (kompleksler) oluşturur. Bu kompleksler, hücre zarından geçişte yardımcı olur ve genetik materyali nükleaz gibi yıkıcı enzimlerden korur.

Viral olmayan taşıyıcı sistemlerin başlıca avantajı, biyolojik olarak türetilmiş viral proteinleri içermemesi nedeniyle immünojenisite riskinin düşük olmasıdır. Ayrıca laboratuvar koşullarında üretim kolaylığı, ölçeklenebilirlik ve kimyasal olarak modifiye edilebilme özellikleri ile dikkat çeker.

Gen tedavisinde kullanılan taşıyıcı sistemler, terapötik nükleik asitlerin hedef hücrelere aktarılmasını ve hücre içine alınmasını sağlayarak gen ekspresyonunu gerçekleştiren temel araçlardır. Geleneksel viral vektörler yüksek verimlilik sunsalar da, immün yanıt oluşturma riskleri, potansiyel mutajenik etkileri ve genetik entegrasyon problemleri nedeniyle kısıtlamalar taşımaktadır (Bulcha ve ark., 2021; Wang C. ve ark., 2023). Bu sebeple, viral olmayan gen taşıyıcı sistemler, daha güvenli, özelleştirilebilir, üretimi kolay ve ucuz olmaları nedeniyle dikkat çekmektedir. Ancak bu sistemlerin de bazı zorlukları bulunmaktadır. Transfeksiyon verimliliği genellikle viral sistemlerin gerisinde kalmaktadır. Ayrıca, *in vivo* ortamda dolaşım süreleri, biyoyararlanım, endozomal kaçış ve hedef dokuya ulaşma konularında ciddi optimizasyonlar gerekmektedir (Gajbhiye ve ark., 2023).

Viral olmayan taşıyıcılar; polimerik taşıyıcılar, lipit bazlı sistemler, inorganik nanopartiküller, peptit tabanlı yapılar ve hibrit nanosistemler gibi birçok farklı yapısal sınıfa ayrılabilmektedir (Şekil 2.1.) (Cesur-Ergün ve ark., 2023). Gen tedavisi, terapötik genetik materyalin hücrelere aktarılması yoluyla hastalıkların moleküler düzeyde tedavi edilmesini amaçlayan bir tedavi yaklaşımdır. Ancak genetik materyallerin (pDNA, siRNA, mRNA) stabil olmamaları, enzimatik degradasyona açık olmaları, hedef hücrelere taşınmalarının zor olması ve hücre membranlarını doğrudan geçememeleri gibi nedenlerle doğrudan uygulanmaları mümkün değildir. Bu sorunların aşılması noktasında gen taşıyıcı sistemler önemli bir rol oynamaktadır (Wang C. ve ark., 2023). Gen taşıyıcı sistemler, terapötik genlerin stabilitesinin korunması, hücrelere etkili şekilde taşınması, endozomal kaçış sağlanması ve sitoplazma ya da nükleer lokalizasyona yönlendirilmesi gibi kritik görevleri üstlenmektedir (Gajbhiye ve ark., 2023). Viral olmayan sistemler hem genetik materyalin korunmasını sağlar hem de yüzey modifikasyonları yoluyla hedefleme ve kontrollü salım imkanı sunmaktadır (Tshivhase ve ark., 2024). Kanserin moleküler düzeyde sürecine bakıldığında, gen taşıyıcı sistemlerin önemi daha da artmaktadır. Çünkü tümör mikroçevresi kompleks ve heterojendir; bu nedenle sadece pasif hedefleme değil, aynı zamanda tümöre özgü ligandlar (RGD, folat, transferrin) aracılığıyla aktif hedefleme gerekebilmektedir. Ayrıca, sistemik uygulamalarda dolaşım stabilitesi, hemoliz riski ve non spesifik alımın azaltılması gibi faktörler de dikkate alınmalıdır (Wang G. ve ark., 2024b). Özellikle meme kanserinde, gen taşıyıcı sistemler sayesinde kemoterapiye dirençli hücrelere hedefli gen iletimi yapılabilmekte, angiogenez inhibitör genler, apoptozu tetikleyen genler ya da immünojenik ajanlar hedefli olarak taşınabilmektedir. Bu da hem tedavi etkinliğini artırmakta hem de sağlıklı hücrelerdeki yan etkileri azaltmaktadır. Gen taşıyıcı sistemler gen tedavisinin klinik başarıya ulaşabilmesi için vazgeçilmez unsurlardır. Bu sistemlerin biyouyumluluğunun artırılması, hedefleme kabiliyetlerinin iyileştirilmesi ve hücre içi dağılımlarının kontrol edilmesi, gelecekte gen tedavileri onkolojide daha yaygın kullanımına olanak sağlayacaktır (Wang G. ve ark., 2024b).

Nanopartikül tabanlı gen taşıyıcı sistemler, terapötik genlerin hücre içine taşınması için geliştirilen en yenilikçi ve etkili araçlardan biridir. Bu sistemler; viral olmayan sistemlerin düşük toksisite, immün hafıza oluşturmama nedeniyle tekrarlayan

uygulamalara uygunluk, farklı uygulama yollarına adapte olabilme, uzun raf ömrü, büyük ölçekli üretime elverişlilik ve yüzey modifikasyonuna açıklık gibi avantajlarını; nanoteknolojinin sağladığı hedeflenebilirlik ve hücre içi iletim kabiliyetiyle birleştirmektedir (Jiang ve ark., 2023). Konvansiyonel taşıyıcı sistemlerle kıyaslandığında, bu gen taşıyıcı nanopartiküller çok sayıda avantaj sunmaktadır. pDNA, siRNA, mRNA gibi nükleik asit temelli terapötikler, serumda hızla degradasyona uğrayabilen kararsız moleküllerdir. Nanopartiküller bu materyalleri çevresel faktörlere karşı koruyarak biyolojik sıvılarda stabil kalmalarını sağlamaktadırlar. Özellikle polimerik ve lipidik taşıyıcılar, genetik materyalin enkapsülasyonunu ve korunmasını sağlayan fizikokimyasal bariyerler oluşturmaktadır (Hamimed ve ark., 2022). Yüzeyleri ligandlarla fonksiyonlandırılmış nanopartiküller, spesifik hücre veya doku tiplerine yönlendirilebilmektedir. Böylece genlerin sağlıklı dokulara değil, sadece hastalıklı hedef hücrelere aktarılmasına imkan sunmaktadır. Bu aktif hedefleme mekanizması, tümör mikroçevresine seçici birikim sağlayarak terapötik etkinliği artırırken sistemik toksisiteyi azaltmaktadır (Jiang ve ark., 2023).

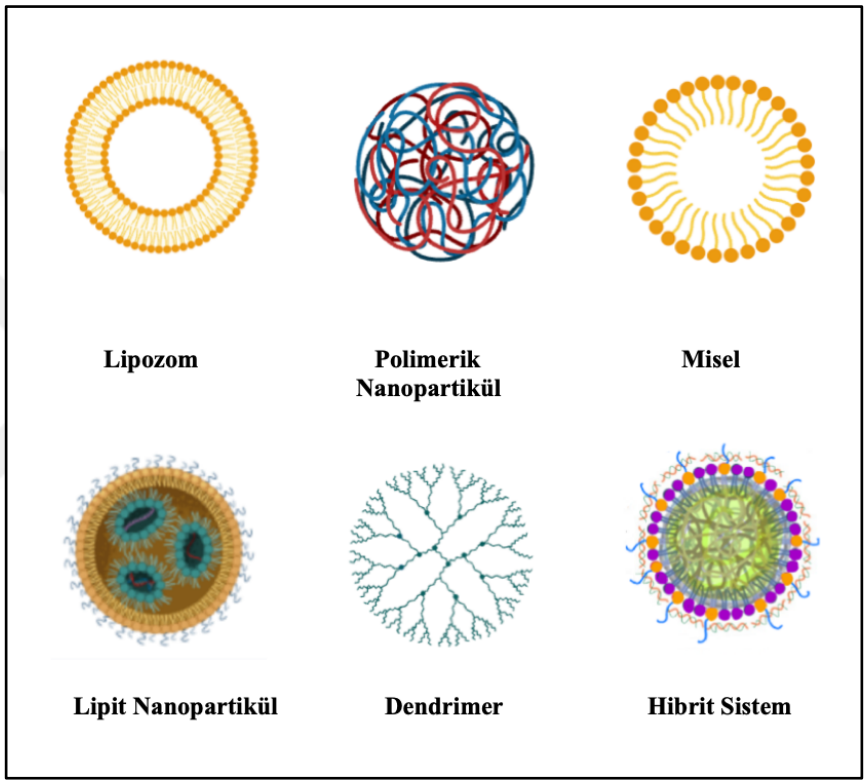
Nanopartiküller, hücre zarını geçmek için endositoz mekanizmalarını kullanmaktadır. Ancak gen tedavisi için kritik olan, taşıyıcıların endozomdan sitoplazmaya kaçabilme kapasitesidir. Bazı taşıyıcı sistemler, endozomal membranları bozarak yüklerini sitozole başarılı bir şekilde bırakabilmektedirler (Kim M. ve ark., 2024).

Nanopartiküller, genetik materyali kontrollü ve istenen yere serbest bırakacak şekilde tasarlanabilmektedir. pH, sıcaklık, enzimatik aktivite veya redoks potansiyeli gibi tümöre özgü mikroçevresel koşullar kullanılarak uyarıya duyarlı sistemler geliştirilebilmektedir. Bu sayede, yalnızca hedef bölgedeki hücrelerde gen ekspresyonu sağlanmaktadır (Li J. ve ark., 2023b). Nanopartikül sistemler, laboratuvar ortamından endüstriyel üretime kolayca aktarılabilecek şekilde ölçeklendirilebilmektedir. Ayrıca yüzeylerine PEG gibi polimerler bağlanarak dolaşım süresi uzatılabilir ve immün sistemden kaçış sağlanabilmektedir. Böylece *in vivo* biyoyararlanım artırılmış olmaktadır.

Nanopartiküller aynı anda birden fazla terapötik ajan gen + ilaç ya da gen + siRNA taşıyabilmektedir. Bu stratejiler, çoklu patolojik mekanizmaların aynı anda hedeflenmesini mümkün kılmaktadır. Özellikle kemoterapiye dirençli kanser

hücrelerinde, gen-ilaç kombinasyonları ile sinerjik tedavi etkinliği sağlanabilmektedir (Lee ve ark., 2025).

Gen taşıyıcı nanopartiküller, hedefleme kapasitesi, yüksek yükleme verimi, hücre içi iletimi ve sistemik güvenlik profili açısından klasik gen taşıma yöntemlerine üstünlük sağlayan sistemlerdir. Bu özellikleri sayesinde özellikle kanser gibi karmaşık hastalıklarda bireye özgü tedavi stratejilerinin temelini oluşturmaktadır.



Şekil 2.1. Viral olmayan taşıyıcı sistemler.

♦ **Polimer Tabanlı Viral Olmayan Taşıyıcılar**

Polimerler, genetik materyalle elektrostatik etkileşim yoluyla kompleks oluşturarak hücre içine alınmalarını kolaylaştıran yapılardır. Yaygın kullanılan polimerik taşıyıcılar (Pan ve ark., 2018; Cao ve ark., 2019):

- **Polietilenimin (PEI)**: En yaygın kullanılan katyonik polimerdir. Yüksek gen taşıma verimi sağlar ancak yüksek molekül ağırlıklı PEI'ler hücre toksisitesi gösterebilmektedirler. Proton süngeri etkisi sayesinde endozomal kaçış yeteneği yüksektir. PEI, etilenimin halkasının açılmasıyla elde edilen amin grupları bakımından zengin bir yapıdadır. Lineer ve dallanmış formları bulunmaktadır. Dallanmış PEI, hem primer hem sekonder hem de tersiyer amin grupları içerir;

lineer PEI, sadece sekonder amin grupları içerir. Bu farklılıklar, gen kondensasyon kapasitesi ve biyolojik etkileşimler üzerinde doğrudan etkilidir.

Genetik materyali (DNA, siRNA, mRNA) kompakt hale getirerek polipleks adı verilen stabil kompleksler oluşturur. Bu yapı; genetik materyalin nükleazlar tarafından parçalanmasını önler, hücre zarından geçişi kolaylaştırır, hücre içi hedeflere taşınma sırasında stabilite sağlar (Demir-Dora ve Öner, 2023).

Yüksek Transfeksiyon Verimliliği: PEI, özellikle yüksek moleküler ağırlıklı dallı formu ile güçlü gen kondensasyon kabiliyeti sergiler ve viral vektörlere yakın seviyelerde gen transfer etkinliği gösterebilir. PEI özellikleri:

- Proton Sünger Etkisi: PEI'nin bol amin grubu, endozomların asidik ortamında protonları tutarak ozmotik basınç artışı sağlar. Bu etki, endozomal membranı destabilize ederek genetik materyalin sitoplazmaya kaçmasına (endozomal kaçış) yardımcı olur.
- Yüzey Modifikasyonlarına Uygunluk: PEI, ligandlarla konjuge edilerek hedefleme özelliği kazandırılabilir. Ayrıca polimer zincir uzunluğu ve dallanma derecesi ayarlanarak istenen biyolojik özellikler elde edilebilir.
- PEI, yüksek pozitif yük yoğunluğu nedeniyle: hücre zarını bozabilen ve membran bütünlüğünü zedeleyen etkiler gösterebilir, hücre içi proteinlerle etkileşerek sitotoksisite yaratabilir.

Bu nedenle, yüksek moleküler ağırlıklı ve yüksek yoğunluklu PEI gen taşıyıcı sistemleri genellikle daha toksiktir. Klinik uygulamalarda, düşük moleküler ağırlıklı PEI veya modifiye edilmiş PEI türevleri (örneğin, PEG-PEI, biyobozunur PEI) tercih edilmektedir. Son yıllarda, PEI'nin olumsuz etkilerini azaltmak ve biyouyumluluğu artırmak için çeşitli modifikasyon stratejileri geliştirilmiştir:

- **PEGleştirme (PEG-PEI):** Polietilen glikol (PEG) eklendiğinde polimerin hücre zarına bağlanma oranı dengelenir ve toksisite azalır.
- **Biyobozunur PEI Türevleri:** Ester veya disülfid bağları içeren PEI varyantları, hücre içinde parçalanarak toksisiteyi düşürür.
- **Hedefleme Ligandlarıyla Konjugasyon:** Hücreye özgü hedefleme için RGD peptidi, folat gibi ligandlarla konjüge edilerek seçici gen transferi

sağlanabilir. PEI bazlı gen taşıyıcı sistemler, kanser tedavisi, kardiyovasküler hastalıklar ve genetik bozuklukların tedavisi gibi çok sayıda uygulama alanında test edilmiştir. Özellikle *in vitro* ve preklinik çalışmalarda yüksek verimlilikleri nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak *in vivo* uygulamalarda sitotoksisite ve biyolojik stabilite sorunları nedeniyle daha ileri modifikasyonlar veya hibrit sistemlerle desteklenmeleri önem arz eder. PEI, yüksek transkripsiyon verimliliği ve esnek modifikasyon potansiyeli ile viral olmayan gen taşıyıcı sistemler arasında öne çıkmaktadır. Günümüzde, daha düşük toksisite ve daha iyi biyouyumluluk sağlamak için yeni gen taşıyıcı sistemler ve modifikasyon yaklaşımları ile PEI bazlı taşıyıcıların potansiyeli daha da güçlendirilmektedir (Demir-Dora; 2023).

- **Kitosan**: Doğal, biyouyumlu ve biyobozunur bir polimerdir. Katyonik yapısıyla DNA ile kompleks oluşturabilir, ancak çözünürlük ve düşük transfeksiyon verimi dezavantaj olabilir.
- **Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA)**: FDA onaylı, biyobozunur bir polimerdir. Nükleik asitlerin enkapsülasyonu yoluyla taşınmasını sağlar. Kontrollü salım için uygundur.
- **Polikarbamatlar, poliamidoamin (PAMAM) dendrimerler** gibi ileri jenerasyon polimerler de gen taşıma için geliştirilmiştir. Dendrimersel yapılar sayesinde yüksek yükleme kapasitesine sahiptir.

♦ **Lipit Tabanlı Taşıyıcılar**

Lipit bazlı taşıyıcı sistemler, biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri ve hücre membranına benzerlikleri nedeniyle ilaç ve gen taşımada sıkça tercih edilen sistemlerdir. Bu sistemler; fosfolipitler, kolesterol, trigliseritler, steroller ve bunların türevleri gibi doğal veya sentetik lipit bileşenlerden oluşur. Lipit bazlı taşıyıcılar, hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların taşınmasına ve kontrollü salımının sağlanmasına imkan tanır. En önemli avantajları arasında, hücre zarının lipit yapısına benzerlik göstermesi nedeniyle hücresel alım kolaylığı sağlamaları, biyolojik bariyerleri aşabilme yetenekleri ve farmakokinetik profilleri iyileştirme potansiyelleri yer almaktadır.

Lipit bazlı taşıyıcı sistemler genel olarak lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, mikroemülsiyonlar, nanoemülsiyonlar ve misel sistemler gibi farklı yapılarda olabilirler.

Lipozomlar, hidrofilik ilaçları vezikül içinde, hidrofobik ilaçları ise fosfolipit tabakasında taşıyabilen çift katmanlı yapılar sunar. PEGilasyon, hedefleme ligandlarının eklenmesi gibi yüzey modifikasyonları ile dolaşım süresi ve hedefleme yeteneklerini artırılabilir. Katı lipit nanopartiküller ise katı lipit çekirdeğine sahip olmaları sayesinde stabiliteyi artırır ve kontrollü salım sağlar. Katı ve sıvı lipitleri bir arada bulunduran sistemlerde ise daha yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve uzun süreli stabilite özellikleri de mevcuttur. Mikroemülsiyonlar ve nanoemülsiyonlar ise termodinamik olarak stabil sistemler olup, özellikle biyoyararlanımı düşük ilaçların çözünürlüğünü artırmak için tercih edilmektedirler. Lipit bazlı miseller ise mukozal yollardan uygulamalar ve yavaş salım sistemleri için uygun yapılar sunmaktadırlar. Bu taşıyıcı sistemler yalnızca küçük moleküllü ilaçları değil, aynı zamanda genetik materyalleri de taşıma potansiyeline sahiptir. Katyonik lipitler ve bazı lipit polimer hibrit (LPH) sistemler, nükleik asitlerle elektrostatik etkileşimler sonucu kompleks oluşturarak gen tedavisi uygulamalarında da kullanılmaktadır. Lipit bazlı taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı başlıca hastalıklar arasında kanser, enfeksiyon hastalıkları, inflamatuvar hastalıklar, cilt hastalıkları, nörolojik hastalıklar ve oftalmolojik hastalıklar yer alır. Kanser tedavisinde, lipit bazlı taşıyıcılar hem geleneksel kemoterapötiklerin hem de gen tedavisi ürünlerinin hedefleme ile taşınmasını sağlayarak sistemik toksisiteyi azaltabilmektedirler. Örneğin, Doxil® (lipozomal Doxorubisin) gibi lipozom bazlı sistemler, meme kanseri ve over kanseri tedavisinde uzun dolaşım süreleri ve düşük yan etki profilleri ile öne çıkmıştır. Ayrıca, lipit bazlı nanopartiküller COVID-19 aşılarında (BNT162b2) mRNA taşıyıcısı olarak da kullanılmakta, bu sayede stabilite ve hücresel alım açısından büyük avantajlar sağlamaktadır. Lipit bazlı taşıyıcı sistemler sahip oldukları fizikokimyasal özellikler, biyolojik uyumluluk ve fonksiyonel modifikasyon kabiliyetleri sayesinde günümüzde pek çok hastalığın tedavisinde yenilikçi çözümler sunmaya devam etmektedir. İlaçların ve genetik materyallerin etkili bir şekilde taşınmasını ve hedeflenmesini sağlamak üzere lipit bazlı sistemlerin kullanımı, farmasötik ve biyoteknolojik araştırmaların öncelikli alanlarından biri olarak önemini korumaktadır.

Lipit bazlı taşıyıcılar, DNA veya RNA ile lipopleks oluşturarak membranla füzyon yoluyla hücre içine geçişi kolaylaştırmaktadır (Hald Albertsen ve ark., 2022; Mendonca ve ark., 2023):

- **Katyonik lipitler**: DOTMA (1,2-di-oleoil-3-trimetilamonyum-propil klorür), DOTAP (1,2-di-oleoil-3-trimetilamonyum propan), DOPE (1,2-di-oleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin) gibi lipitler, DNA ile elektrostatik kompleks oluşturur. Ancak serumda stabiliteleri düşüktür.
- **Lipozomlar**: Fosfolipit tabanlı veziküllerdir. Nükleik asitleri enkapsüle veya yüzeye absorbe ederek taşımaktadırlar. PEG ile modifiye edildiklerinde dolaşım süreleri uzatılabilmektedir.
- **Niozomlar**: İyonik olmayan yüzey aktif madde içeren veziküllerdir. Lipozomlara alternatif olarak daha stabil, ucuz ve toksik olmayan taşıyıcılardır.
- **Katı Lipit Nanopartiküller**: Lipit matris yapısı sayesinde yüksek stabilite sağlamaktadırlar. RNA ve DNA gibi moleküllerle yüzey yüküne bağlı olarak kompleks oluşturulmaktadır.

♦ **İnorganik Nanopartiküller**

İnorganik nanopartiküller, genellikle metal, metal oksit, silikat gibi inorganik materyallerden sentezlenen ve nano boyutta tanecikler şeklinde bulunan yapılar olarak tanımlanmaktadır. Bu nanopartiküller, sahip oldukları optik, manyetik, elektriksel ve katalitik özellikler sayesinde ilaç taşıma sistemlerinde ve biyomedikal uygulamalarda önemli bir yere sahiptir. Yüzey özelliklerinin kolaylıkla modifiye edilebilmesi, genellikle yüksek stabiliteye sahip olmaları ve biyolojik hedefleme gibi fonksiyonel yeteneklerinin geliştirilebilir olması, bu sistemleri özellikle ilgi çekici kılmaktadır. İnorganik yapıdaki nanotaşıyıcılar, yüzey modifikasyonuna açık yapıları sayesinde hedefleme ve taşıma amaçlı kullanılmaktadır (Unnikrishnan ve ark., 2023). Başlıca inorganik nanopartikül çeşitleri şunlardır:

- **Altın Nanopartikülleri:** Bu nanopartikülleri, inertlikleri ve biyouyumlulukları sayesinde biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. Yüzeylerinin kolaylıkla fonksiyonelleştirilebilmesi, protein, antikor veya peptit gibi biyomoleküllerle kaplanabilmesi, hedefli ilaç ve gen taşımada avantaj sağlar. Ayrıca, güçlü yüzey plazmon rezonansı özellikleri nedeniyle tanı ve görüntüleme uygulamalarında da kullanılmaktadır.
- **Gümüş Nanopartikülleri:** Antibakteriyel ve antifungal özellikleri nedeniyle yaygın olarak tercih edilirler. Toksisiteleri ve oksidatif stres oluşturma

kapasiteleri nedeniyle kanser hücrelerini seçici olarak öldürebilme potansiyelleri vardır. Bununla birlikte, kontrollü kullanım ve yüzey modifikasyonu gereklidir.

- **Demir Oksit Nanopartikülleri (Manyetik Nanopartiküller):** Süperparamanyetik özellikleri sayesinde manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanları olarak kullanılabilirler. Ayrıca, harici manyetik alanla yönlendirilerek hedefli ilaç taşıma sistemleri oluşturulabilir. Bu özellik, "manyetik hedefleme" yaklaşımı ile kanser tedavisinde ilgi çekicidir.
- **Silika Nanopartikülleri:** Özellikle mezopor yapıda hazırlanan silika nanopartikülleri, yüksek yüzey alanı ve ilaç yükleme kapasitesi nedeniyle dikkat çekicidir. Yüzey modifikasyonuna son derece uygun oldukları için hedefleme ve kontrollü salım sistemlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır.
- **Karbon Bazlı Nanopartiküller:** Elektriksel iletkenlikleri, yüksek mekanik dayanıklılıkları ve geniş yüzey alanları nedeniyle çeşitli biyomedikal uygulamalarda yer alırlar. Bununla birlikte, biyolojik ortamda uzun süre kalmaları ve potansiyel toksisiteleri nedeniyle güvenlik çalışmaları yoğun olarak sürmektedir.
- **Diğer Metal Oksitler ve İnorganik Yapılar:** Özellikle fotokatalitik özellikleri ve ışıkla aktive olabilen tedavi (fotodinamik tedavi) uygulamalarında ön plandadırlar. Örneğin, TiO_2 nanopartikülleri UV ışığı altında reaktif oksijen türleri üreterek kanser hücrelerini öldürebilir.

İnorganik nanopartiküller, sahip oldukları çok yönlü özellikler sayesinde pek çok hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. En yaygın kullanım alanları şunlardır:

Kanser Tedavisi: Hedefli ilaç ve gen taşıma, ısıya duyarlı hipertermi tedavisi (ör. manyetik nanopartiküller), fotodinamik/fototermal tedavi (ör. altın nanopartikülleri) gibi çoklu terapi yaklaşımlarında rol oynarlar. Ayrıca, hücre içi lokalize ısı üretimi yoluyla kanser hücrelerinin seçici ölümünü tetikleyebilirler.

Tanı ve Görüntüleme: MRI kontrast ajanı olarak demir oksit nanopartikülleri; fotoakustik görüntüleme için altın nanopartikülleri; floresan işaretleme veya Raman spektroskopisi için kuantum noktaları gibi yapılarda yer alırlar.

Antimikrobiyal Tedavi: Gümüş nanopartikülleri ve çinko oksit nanopartikülleri, özellikle yara iyileşmesi ve cilt enfeksiyonlarında bakterisidal ve fungisidal etkileriyle bilinirler.

Nörodejeneratif Hastalıklar: Silika nanopartikülleri gibi bazı inorganik nanopartiküller, kan-beyin bariyerini aşabilen taşıyıcı sistemler olarak araştırılmaktadır.

Aşı ve Gen Tedavisi: İnorganik nanopartiküller, DNA/RNA aşılarının taşınması için veya genetik materyalin stabilitesini artırmak için de kullanılabilmektedir.

İnorganik nanopartiküllerin başlıca avantajları, yüksek stabiliteleri, hedeflenebilirlikleri ve çoklu fonksiyonelliğe sahip olmalarıdır. Yüzey kimyası kolaylıkla modifiye edilebilir ve bu da hedefleme ligandlarının, polimerlerin veya peptitlerin bağlanmasına olanak tanır. Ayrıca, fototermal ve manyetik özellikleri sayesinde tedavi ve tanıda hibrit çözümler sunarlar. Ancak, biyolojik ortamda potansiyel toksisite, uzun süreli vücutta kalma süresi ve immünojenite gibi zorluklar da göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, inorganik nanopartiküllerin klinik uygulamaya geçişinde detaylı toksikolojik ve farmakokinetik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, inorganik nanopartiküller; sahip oldukları fizikokimyasal özellikler, fonksiyonel modifikasyon yetenekleri ve çok amaçlı kullanıma uygunlukları nedeniyle günümüzde hem tanıda hem de tedavide önemli bir araç olarak değerlendirilmektedir. Geliştirilmeye devam eden yüzey modifikasyon stratejileri ve biyouyumluluk çalışmaları, bu sistemlerin gelecekteki klinik uygulamalarda daha yaygın bir şekilde yer almasını mümkün kılacaktır.

- **Hibrit Sistemler**

Hibrit taşıyıcı sistemler, lipitler, polimerler, inorganik nanopartiküller gibi farklı yapı ve özellikteki yapıların bir arada kullanılmasıyla oluşturulan çok bileşenli ve çok işlevli nanosistemlerdir. Bu sistemler, bileşenlerin avantajlarını bir araya getirerek tek başına kullanılan sistemlerin sınırlamalarını aşmayı ve farmakolojik etkileri artırmayı hedeflemektedir. Hibrit taşıyıcı sistemlerin tasarımında, bileşenlerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri titizlikle dengelenir ve sinerjistik etkiler gözetilir. Son yıllarda gen tedavisi, kanser tedavisi ve aşı uygulamaları gibi birçok alanda hibrit sistemlere yönelik araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu sistemlerin temel avantajları; hem hedefleme hem de kontrollü salım gibi çok işlevli özelliklerinin olması, stabilite özelliğinin yüksek olması,

biyouyumluluk ve yüksek yükleme kapasitesidir. Örneğin, manyetik çekirdeğe sahip bir hibrit sistem, hem manyetik yönlendirme hem de ilaç salımı yapabilmektedir.

- **Lipit Polimer Hibrit Sistemler:** Lipit tabakası ile kaplanmış polimer çekirdekli nanopartiküller, yaygın kullanılan hibrit sistemlerdir. PLGA, PEI gibi polimer çekirdek yapıya mekanik dayanıklılık ve kontrollü salım kabiliyeti sağlarken; lipit tabakası biyouyumluluk ve hücresel alım kolaylığı sunmaktadır. Bu yapı, hem hidrofilik hem de hidrofobik moleküllerin taşınmasını mümkün kılmaktadır.
- **Lipit İnorganik Hibrit Sistemler:** Altın, demir oksit veya silika nanopartiküller gibi inorganik çekirdeğin lipit tabakası ile kaplanmasıyla oluşturulan sistemlerdir. Örneğin, altın nanopartikülleri çekirdekli lipit kaplı yapılar, fototermal tedavi için kullanılabilirken; manyetik çekirdekli hibrit sistemler manyetik hedefleme ve görüntüleme gibi alanlarda tercih edilmektedir.
- **Polimer İnorganik Hibrit Sistemler:** Polimer kaplı inorganik nanopartiküller veya polimer matrisine inorganik nanopartiküllerin dağılmasıyla oluşturulan kompozit yapılar bu grupta yer almaktadır. Bu sistemler, hem ilaç salımını kontrol altında tutabilir hem de tanı ve görüntüleme gibi ek fonksiyonlar kazandırabilmektedir.
- **Lipit Polimer İnorganik Üçlü Hibrit Sistemler:** Son zamanlarda, polimer/altın çekirdekli ve lipit tabakalı üçlü hibrit yapılar geliştirilmektedir. Bu sistemler hedefleme, hipertermi, ilaç salımı gibi çok işlevli tedavi için ideal çoklu platformlar sunmaktadır.

Hibrit sistemler, sahip oldukları esnek tasarım ve çoklu fonksiyonellik nedeniyle özellikle kanser tedavisi, gen tedavisi ve tanı uygulamalarında öne çıkmaktadır.

Hibrit sistemlerin en önemli avantajı, çok işlevli ve özelleştirilebilir yapılarıdır. Ancak, kompleks yapıları nedeniyle üretim süreçlerinin standardizasyonu, uzun vadeli stabilite ve biyouyumluluk testleri önemlidir. Klinik uygulamaya giden süreçte, taşıyıcı bileşenlerin potansiyel toksisiteleri ve immün yanıtları ayrıntılı şekilde değerlendirilmelidir. Ayrıca, ölçeklenebilir üretim yöntemleri geliştirilerek klinik üretim sürecine uygun hale getirilmesi hedeflenmektedir.

Hibrit taşıyıcılar, polimerlerin stabilitesini ve lipitlerin hücre membran geçiş kolaylığını birleştirmektedirler. Yüksek taşıma verimi, düşük toksisite ve hedefleme imkanı sunmaktadırlar (Li Z. ve ark., 2022b). Özellikle:

- PEI ile pDNA polipleksi + niozom veya lipit vezikül kombinasyonu
- PLGA çekirdek + lipit dış kabuk yapıları
- Lipit-polimer-mPEG üçlü yapılar

Bu sistemler, PEG, peptit, antikor gibi modifiye edilebilir yüzeyler sayesinde hedeflenmiş gen tedavisi için oldukça avantajlı olmaktadırlar.

Güvenlik ve Etik İlkeler

Gen tedavisinin uygulanabilirliğinde güvenlik kriterleri ön plandadır. Off-target etkiler, genetik instabilite, mutagenez ve immün yanıt gibi faktörler dikkatle izlenmelidir. Klinik uygulamalarda FDA ve EMA gibi otoritelerin çerçevesinde, her gen tedavisinin biyogüvenlik profili detaylı olarak değerlendirilmelidir. Ayrıca genetik materyalin kalıtsal olarak germ hücrelerine geçişinin engellenmesi, etik sorumluluğun bir parçasıdır (Wang C. ve ark., 2023).

Gen tedavisi, moleküler düzeyde hedefleme, fonksiyonel onarım ve özelleştirilebilir yapısıyla modern tıbbın en umut verici alanlarından biridir. Başarılı bir gen tedavisi uygulaması; doğru gen seçimi, uygun taşıyıcı sistem tasarımı, hedef dokuya etkin ulaşım, kontrollü ekspresyon ve güvenlik ilkeleri çerçevesinde şekillendirilmelidir. Bu temel prensipler üzerine inşa edilen uygulamalar, hem nadir genetik hastalıklarda hem de onkolojik olgularda terapötik devrim yaratma potansiyeline sahiptir (Baki ve ark., 2023; Wifvat ve ark., 2024).

Sonuç olarak, hibrit taşıyıcı sistemler; sahip oldukları sinerjistik özellikler, yüksek stabilite, kontrollü salım kapasitesi ve hedefleme yetenekleriyle günümüzde ilaç taşıma ve gen tedavisi alanında umut verici bir platform olarak ön plana çıkmaktadır. Gelecekte, özelleştirilmiş hedefleme ligantları, akıllı salım stratejileri ve çoklu tedavi kombinasyonlarını destekleyen hibrit sistemlerin klinikte daha yaygın bir şekilde yer alacağı öngörülmektedir.

Tablo 2.1. Viral olmayan gen taşıyıcı sistemler ve uygulamalar alanları.

Taşıyıcı Sistemi	Uygulama Alanı / Hastalık	Özellikleri	PMID
Lipit Bazlı Nanopartiküller (LNP)	Genetik hastalıklar (örneğin, kistik fibrozis), enfeksiyon hastalıkları (COVID-19)	LNP'ler, genetik materyali stabilize ederek hedef hücrelere taşır. Özellikle mRNA aşılarında ve siRNA terapilerinde kullanılır.	(Wang Y. ve ark., 2022b)
Polimer Bazlı Taşıyıcılar (PEI, PAMAM, Kitosan)	Nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson), kardiyovasküler hastalıklar	Polimerler, genetik materyali kompakt hale getirerek hücre içine alınmasını sağlar. PEI ve PAMAM gibi polimerler, yüksek transfeksiyon verimliliği sunar.	(Al-Dosari ve ark., 2009)
Lipit Polimer Hibrit Sistemler (LPH)	Kanser tedavisi (meme kanseri, akciğer kanseri), metabolik hastalıklar	Lipit ve polimerlerin kombinasyonu, taşıyıcının stabilitesini ve hücre içi dağılımını artırır. Bu hibrit sistemler, hedefleme ve kontrollü salım avantajları sunar.	(Taghdiri ve ark., 2024)
Altın Nanopartiküller	Kanser tedavisi (prostat kanseri), genetik hastalıklar	Altın nanopartiküller, genetik materyali taşımanın yanı sıra fototermal terapi gibi ek tedavi yöntemleriyle kombine edilebilir.	(Wang K. ve ark., 2015)
Manyetik Nanopartiküller	Nörolojik hastalıklar (beyin tümörleri), kardiyovasküler hastalıklar	MNP'ler, harici manyetik alanlar kullanılarak hedefleme yapılmasına olanak tanır. Ayrıca, manyetik hipertermi ile tedavi etkinliği artırılabilir.	(Wang Y. ve ark., 2022b)

Tablo 2.2. Viral olmayan gen taşıyıcı sistemler ve kanserdeki uygulamaları.

Taşıyıcı Sistemi	Hedeflenen Kanser Türleri	Özellikleri	Kaynak
Lipit Bazlı Nanopartiküller (LNP)	Karaciğer kanseri, meme kanseri, akciğer kanseri, pankreas kanseri	LNP'ler, genetik materyali stabilize ederek hedef hücrelere taşır. Özellikle mRNA aşılarında ve siRNA terapilerinde kullanılır.	(Wang H. L. ve ark., 2022a)

Polimer Bazlı Taşıyıcılar (PEI, PAMAM, Kitosan)	Beyin tümörleri (glioblastoma), kolon kanseri, prostat kanseri	Polimerler, genetik materyali kompakt hale getirerek hücre içine alınmasını sağlar. PEI ve PAMAM gibi polimerler, yüksek transfeksiyon verimliliği sunar.	(Yousefpour Marzbali ve ark., 2017)
Lipit Polimer Hibrit Sistemler (LPH)	Meme kanseri, akciğer kanseri, pankreas kanseri	Lipit ve polimerlerin kombinasyonu, taşıyıcının stabilitesini ve hücre içi dağılımını artırır. Bu hibrit sistemler, hedefleme ve kontrollü salım avantajları sunar.	(Taghdiri ve ark., 2024)
Altın Nanopartiküller	Meme kanseri, prostat kanseri, cilt kanseri	Altın nanopartiküller, genetik materyali taşımanın yanı sıra fototermal terapi gibi ek tedavi yöntemleriyle kombine edilebilir.	(Mendes R. ve ark., 2017)
Manyetik Nanopartiküller	Beyin tümörleri, meme kanseri, pankreas kanseri	MNP'ler, harici manyetik alanlar kullanılarak hedefleme yapılmasına olanak tanır. Ayrıca, manyetik hipertermi ile tedavi etkinliği artırılabilir.	(Tietze ve ark., 2015)

2.5.2. Meme Kanserinde Gen Tedavisi Uygulamaları

Meme kanseri, küresel ölçekte kadınlarda en yaygın şekilde teşhis edilen malignitelerden biri olup heterojen, kompleks yapısı, moleküler alt tip çeşitliliği ve tedaviye direnç gelişimi nedeniyle karmaşık bir klinik tablo olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle ÜNMK, hormonal ve HER2 hedefli tedavilere cevap vermemesi nedeniyle sistemik kemoterapiye bağımlı kalmakta ve bu durum prognozu kötüleştirmektedir. Son yıllarda gelişen moleküler biyoloji teknikleri ve genomik analizler, meme kanserinin genetik temelli patogenezini aydınlatmaya başlamıştır. Bu sayede gen tedavisi stratejisinin, tedavi potansiyeli olarak değerlendirilmesi ön plana çıkmaktadır. Meme kanserinde genetik ve epigenetik değişiklikler tümör gelişiminde temel rol oynamaktadır. Bu bağlamda, gen tedavisi (Giannuzzi ve ark., 2025);

- siRNA, shRNA ile mutant genlerin susturulması,
- *p53*, *BRCA1* gibi tümör baskılayıcı genlerin geri kazandırılması,
- *TRAIL*, *IL-12*, *IFN- β* gibi apoptoz ve immün yanıtı indükleyen genlerin taşınması gibi çok yönlü yaklaşımlar içermektedir (Shokoohi ve ark., 2025).

Gen Tedavi Stratejileri

a) Onkogen Susturma

RNA interferansı (RNAi) teknolojisiyle *VEGF*, *Akt*, *Bcl-2*, *Survivin*, *c-Myc* gibi onkogenlerin ekspresyonu bastırılarak tümör büyümesi yavaşlatılabilmektedir. Örneğin, VEGF hedefli siRNA taşıyan nanopartiküllerle gerçekleştirilen tedavi modellerinde tümör anjiyogenezinde azalma gösterilmektedir.

b) Tümör Baskılayıcı Gen Transferi

Mutasyon veya delesyon sonucunda inaktive olmuş tümör baskılayıcı genlerin hücreye taşıyıcı sistemlerle iletilmesi, hücresel apoptozu tetikleyerek tümör büyümesini engelleyebilmektedir. Bu yaklaşım genellikle genetik materyalle veya mRNA temelli gen taşıyıcı sistemlerle iletilmektedir.

c) İmmünoterapötik Genler

İmmün sistemin tümöre karşı aktivasyonunu sağlamak için sitokinleri kodlayan genler meme tümörüne taşınabilmektedir. Bu genler, lokal veya sistemik antitümör immün yanıtı tetikleyebilmektedir (Dong et al., 2021).

d) Proapoptotik Genlerin Taşınması

TRAIL gibi apoptoz indükleyici genlerin iletilmesi, meme kanseri hücrelerinde seçici ölüm sağlayabilmektedir. Bu tür yaklaşımlarda genin tümör hücrelerine spesifik ekspresyon göstermesi için promotör seçimi kritik önem taşımaktadır (Zhou et al., 2018; (Cesur-Ergün ve ark., 2023).

Meme Kanserinde Kullanılan Gen Taşıyıcı Sistemler

Meme kanseri hücrelerine gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan non-viral gen taşıyıcı sistemler arasında şunlar yer alır:

- **Katyonik lipit bazlı lipopleksler**: Yüksek taşıma kapasitesine sahip olup hücre membranı ile kolay füzyon sağlamaktadır.
- **Polimer bazlı sistemler**: Düşük toksisite ve modifiye edilebilirlik avantajına sahiptir.
- **Niozomlar ve lipit polimer hibrit sistemler**: Stabilite ve hedeflenebilirlik açısından gelişmiş taşıma sistemleri olarak öne çıkmaktadır.

- **Hedefleme ajanları ile modifiye sistemler**: RGD peptit, HER2 antikoru gibi moleküller ile tümör hücrelerine spesifik taşıma sağlanabilir (Vaseghi ve ark., 2017; Zhang Y. ve ark., 2019)

Mevcut Zorluklar ve Gelecek Perspektifi

Meme kanserinde gen tedavisinin başarıya ulaşması için taşıyıcı sistemlerin aşağıdaki kriterleri taşıması gerekmektedir:

- Genetik materyali stabilize ederek serum nükleazlarına karşı koruma,
- Tümör mikroçevresini geçerek hedef hücreye taşıma,
- Endozomal kaçış ve nükleer transport mekanizmaları olması,
- Düşük immünojenisite ve toksisite özellikleri olması.

Meme kanseri, genetik temelli hedefleme açısından tedavi opsiyonu sunan bir hastalıktır. Gen tedavisi, kemoterapiye direnç geliştiren tümörlerde alternatif veya kombine tedavi olarak umut vaat etmektedir. Klinik başarı için hedefe yönelik, toksik etkisi az ya da olmayan ve yüksek transfeksiyon verimli gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi kritik öneme sahiptir. Özellikle RGD peptidi gibi hedefleme ajanlarıyla kombine edilen viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin, meme kanseri tedavisinde translasyonel potansiyele sahip olduğu görülmektedir (Hong ve ark., 2022; Giannuzzi ve ark., 2025; Shokoohi ve ark., 2025).

2.6. Taşıyıcı Sistemlerin Hedeflenmesi

Yeni nesil taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde en önemli hedeflerden biri, ilacın istenmeyen bölgelerde yan etkilere neden olmadan, doğrudan hedef doku veya hücrelere yönlendirilmesini sağlamaktır. Hedeflenmiş taşıyıcı sistemler, ilacın farmakokinetik profilini iyileştirerek, terapötik etkinliğini artırmak ve toksisiteyi azaltmak amacıyla tasarlanmıştır. Bu strateji, özellikle kanser, inflamatuvar hastalıklar ve gen tedavisi gibi alanlarda önemli avantajlar sunar (Cheng ve ark., 2023).

Hedefleme stratejileri genel olarak pasif hedefleme, aktif hedefleme ve uyaran yanıtlı hedefleme olmak üzere üç ana başlık altında toplanır.

- **Pasif Hedefleme**

Pasif hedefleme, özellikle tümör dokusu gibi anormal vasküler yapıya sahip bölgelerde EPR (Enhanced Permeability and Retention) etkisiyle gerçekleşir. Tümörlerde, damar geçirgenliğinin artması ve lenfatik drenajın yetersizliği nedeniyle nanopartiküller pasif

olarak tümör dokusunda birikir. Bu etki, 100–200 nm boyutundaki nanopartiküller için en yüksek oranda gerçekleşir (Li J. ve ark., 2023a).

Avantajları:

- Basit tasarım ve üretim süreçlerine sahip olmalarıdır.
- Özel hedefleme ligandı gerekmez.

Sınırlamaları:

- Sadece vasküler özellikleri uygun hedeflerde etkilidir.
- Sağlıklı dokulardaki EPR etkisi farklılık gösterebilir.

- **Aktif Hedefleme**

Aktif hedefleme, taşıyıcı sistemlerin yüzeyine hücre veya dokuya özgü ligandlar eklenerek gerçekleştirilir. Bu ligandlar, hedef hücrelerdeki reseptörlerle özgül etkileşim kurarak, nanopartikülün hücre içine alımını artırır (Cheng ve ark., 2023).

Başlıca Aktif Hedefleme Ligandları:

Peptitler ve Proteinler

RGD peptidi (integrin hedefleme), transferrin (kanser hücreleri için), antikorlar (trastuzumab, HER2+ meme kanseri için).

Şeker ve Türevleri

Hyaluronik asit (CD44 hedefleme), mannoz (makrofaj hedefleme).

Vitaminler ve Küçük Moleküller

Folat (folat reseptörü hedefleme), biotin.

Aktif Hedefleme Yöntemleri:

- Kovalent bağlama (EDC/NHS kimyası ile)
- Elektrostatiğe dayalı adsorpsiyon
- Kendiliğinden oluşan misel veya lipozom yapıları

Avantajları:

- Daha yüksek hücresel alım
- Seçici hedefleme ile sağlıklı dokularda toksisiteyi azaltma potansiyeli
- Daha düşük dozlarda etkinlik sağlayabilme

Sınırlamaları:

- Ligandların stabilitesi ve biyolojik ortamdaki kararlılığı
- Yüzey modifikasyonu sonrası taşıyıcı sistemin stabilitesini kaybetme riski

- Hedef dokuda ligand-reseptör düzeyi heterojenliği

Uyaran Yanıtlı Hedefleme

Bu hedefleme stratejisi, taşıyıcı sistemlerin yalnızca belirli fiziksel veya biyokimyasal uyaranlara maruz kaldığında etkin hale gelmesini sağlar. Böylece kontrollü salım ve hedef bölgeye özelleşmiş etki mümkün olur (Li L. ve ark., 2019).

Başlıca Uyaran Türleri:

pH Duyarlı Sistemler

Tümör mikroçevresinde genellikle düşük pH bulunur (6.5–6.8). pH-duyarlı polimerler veya lipitler, bu ortamda parçalanarak içeriği serbest bırakır.

Enzim Duyarlı Sistemler

Tümör veya inflamatuvar dokularda yüksek konsantrasyonda bulunan matriks metalloproteinazlar, taşıyıcıyı parçalayarak ilacı serbestleştirir.

Sıcaklık ve Işık Duyarlı Sistemler

Fototermal ajan içeren hibrit nanopartiküller, harici ısıtma veya ışık uyarısıyla taşıdıkları ilacı salabilir.

Redoks Duyarlı Sistemler

Kanser hücreleri gibi yüksek glutatyon konsantrasyonuna sahip hücrelerde redoks-aktif bağlar (disülfit bağları) parçalanır ve yük serbest kalır.

Hedeflenmiş Taşıyıcı Sistemlerin Klinik ve Preklinik Kullanımı

Hedeflenmiş taşıyıcı sistemler; kanser tedavisinde, gen tedavisinde, inflamatuvar hastalıklarda ve nörolojik bozukluklarda umut verici sonuçlar vermektedir. Örneğin, Doxil® (PEGile lipozom) pasif hedefleme özellikleriyle meme kanseri tedavisinde onaylanmış bir tedavidir. Aktif hedefleme alanında ise RGD peptidi taşıyan lipozomlar ve folat hedefli polimerik nanopartiküller klinik öncesi çalışmalarda etkinlik göstermektedir. Stimuli-duyarlı sistemlerin klinik uygulama süreci için halen erken aşamalardadır ancak laboratuvar ortamında umut verici sonuçlar elde edilmektedir (Lammers ve ark., 2012).

Karşılaşılan Zorluklar ve Gelecek Perspektifi

- *Hedefleme Ligandlarının Stabilitesi:* Biyolojik sıvılarda enzimatik parçalanma ve ligand kaybı riski

- *Hedefleme Spesifitesi:* Reseptör ekspresyon seviyelerinin heterojen olması nedeniyle bireyler arası farklılıklar
- *İmmün Yanıtlar:* Özellikle antikor ve peptit bazlı ligandlarda immünojenisite riski

Gelecekte, akıllı hedefleme ligandlarının keşfi, çoklu hedefleme stratejileri (birden fazla ligand kombinasyonu) ve bireyselleştirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler gibi yaklaşımlar, bu alandaki ilerlemeyi hızlandıracaktır (Zhao Z. ve ark., 2020).

Sonuç olarak, taşıyıcı sistemlerin hedeflenmesi, günümüzde nanoteknoloji ve biyoteknoloji temelli tedavilerin en önemli yapı taşlarından biri olarak öne çıkmaktadır. Hücre ve dokuya özgü hedefleme stratejileri, daha etkin ve güvenli tedavi yaklaşımlarının temelini oluşturarak modern farmakoterapide devrim yaratmaya devam edecektir (Sasaki ve ark., 2021).

Tablo 2.3. Üçlü negatif meme kanseri için hedeflenebilecek reseptörler/moleküller.

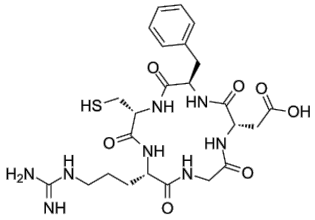
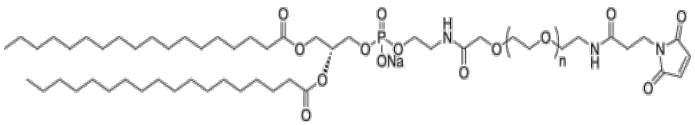
Hedef Molekül / Reseptör	**Özellik**	**Açıklama**	**Kaynak**
Integrin αvβ3	Hücre yüzeyi reseptörü	Tümör anjiyogenezinde rol alır, RGD peptidleriyle hedeflenebilir	(Danhier ve ark., 2012a)
CD44	Yüzey glikoprotein	Kanser kök hücre belirteci, HA (hyaluronik asit) ile hedeflenebilir	(Misra ve ark., 2011)
EGFR	Büyüme faktörü reseptörü	4T1'de aşırı eksprese olur, siRNA veya antikor ile hedeflenebilir	(Yang N. J. ve ark., 2015)
Transferrin Reseptörü	Demir alımında görevli	Yüksek proliferasyon oranına sahip tümörlerde artmış	(Qian ve ark., 2002)
Nükleolin	Hücre yüzeyinde de bulunabilir	DNA aptameri AS1411 ile hedeflenebilir	(Soundararajan ve ark., 2009)
P-selektin	Endotel hücre yüzeyi adezyon molekülü	Tümör invazyonu ve metastazda görevli	(Shamay ve ark., 2016)
Folat Reseptörü Beta	ÜNMK türlerinde aşırı eksprese olabilir	Folat ile hedefleme mümkün	(Sudimack ve ark., 2000)
CXCR4	Kemokin reseptörü	Metastazda görevli, antagonistlerle hedeflenebilir (AMD3100)	(Domanska ve ark., 2013)
VEGFR	Anjiyogenezde görevli	Anti-anjiyojenik tedavilerle kombinlenebilir	(Jain, 2014)

2.7. RGD Peptidi ve Hedeflenmiş Tedavi Yaklaşımları

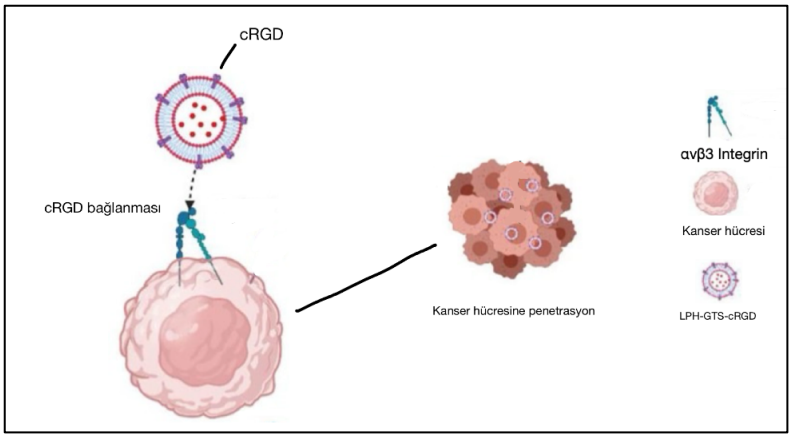
2.7.1. RGD Peptidinin Yapısı ve Biyolojik Önemi

RGD peptidi, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde rol oynayan, birçok biyolojik süreçte işlev gören bir amino asit sekansıdır. Arg-Gly-Asp (arginin-glisin-

aspartik asit) dizisini içeren bu peptit motifinin pek çok ekstraselüler matriks proteininde bulunduğu bildirilmiştir (Pally ve ark., 2024). Bu motif, özellikle integrin adı verilen transmembran reseptörler tarafından tanınmaktadır. Bu bağlanma aracılığıyla hücrelerin adezyon, proliferasyon, migrasyon ve sinyal iletim mekanizmalarında görev almaktadır. RGD motifi üç amino asitten oluşsa da, peptidin yapısı bu dizilim etrafında değiştirilebilmekte ve biyolojik aktivitesi optimize edilebilmektedir. Doğrusal (lineer) ve halkalı (siklik) yapılar şeklinde tasarlanabilen RGD peptitleri, hedef hücreye bağlanma ve stabilite açısından farklılık göstermektedir. cRGD peptitleri, konformasyonel olarak daha stabil oldukları için proteazlara karşı daha dirençlidir ve reseptör afinitesi genellikle daha yüksektir (Chen Z. ve ark., 2012). Bu nedenle ilaç taşıma sistemlerinde, özellikle cRGD türevleri tercih edilmektedir. DSPE-PEG-Maleimit ile cRGD (cyclo(RGDfC)) kendiliğinden kimyasal bağ oluşturabilir. Bu bağlanma, cRGD peptidinin C-terminalinde bulunan serbest tiyol (-SH) grubu ile DSPE-PEG-Maleimitin maleimit grubunun tiyoeter bağlanma reaksiyonu yoluyla gerçekleşir. Bu reaksiyon için aşağıda kimyasal yapılar verilmiştir:

	
Cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys) (Cyclo RGDfC)	DSPE-PEG-Maleimid (MW 2000)

Şekil 2.2. cRGD ve DSPE-PEG-Maleimid kimyasal yapıları.



Şekil 2.3. cRGD ve integrin bağlanmasının gösterimi.

RGD peptidi, en çok αvβ3, αvβ5 ve α5β1 integrin reseptörleriyle etkileşim göstermektedir. Bu reseptörlerin fizyolojik süreçlerde olduğu kadar patolojik durumlarda da özellikle de kanserde yüksek düzeyde eksprese edildiği bilinmektedir. αvβ3 integrini; anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi tümör progresyon süreçlerinde merkezi rol oynamaktadır. Endotel hücreleri, tümör hücreleri ve stromal hücrelerde artmış ekspresyon göstermektedir. Bu özelliği sayesinde hedefleme stratejilerinde ideal bir moleküler hedef haline gelmiştir (Javid ve ark., 2024).

Anjiyogenez, tümörlerin büyümesi, gelişmesi ve metastazı için hayati öneme sahiptir. RGD peptitleri, bu sürecin kritik regülatörü olan αvβ3 integrin üzerinden endotel hücrelerine bağlanarak, tümör vaskülarizasyonunu seçici şekilde hedef alabilmektedir. Bu bağlanma, integrinlerin iç sinyal yolaklarını etkileyerek hücre davranışlarını modüle etmektedir. Bu nedenle RGD, hem anti-anjiyojenik tedaviler hem de tümör damarlarına yönlendirilmiş ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmaktadır (Liu S. ve ark., 2022).

RGD peptidi, taşıyıcı sistemlerin tümör hücrelerine spesifik olarak yönlendirilmesinde kullanılmaktadır. Yüzeyi RGD ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin, integrin ekspresyonu yüksek tümör hücrelerine veya endotel hücrelerine daha yüksek oranda internalize olduğu gösterilmiştir. Bu yönüyle RGD, pasif hedeflemenin ötesine geçerek aktif hedefleme mekanizması sunmaktadır. Bu, gen tedavisi uygulamalarında genetik materyalin spesifik olarak tümör dokularına taşınmasını mümkün kılmaktadır (Srivatsan ve ark., 2011).

RGD peptitlerinin kısa amino asit dizileri sayesinde sentezleri kolay olup, immünojenisiteleri düşüktür ve hedef dokuya yönlendirilebilirler. Bununla birlikte, *in*

vivo dolaşım sürelerinin uzatılması için genellikle PEGileştirme gibi ek modifikasyonlarla kombine edilebilmektedirler. Ayrıca, RGD ile taşıyıcı sistemlerin konjugasyonu genellikle EDC/NHS ya da maleimid-tiyol kimyası ile gerçekleştirilir; bu yöntemler kolayca kontrollü ve stabil bağlanmalar sağlamaktadır (Javid ve ark., 2024). RGD peptitleri, ilaç taşıyıcı sistemlerin yanı sıra görüntüleme ajanları ve anjiyogenez inhibitörlerinin iletilmesi için de kullanılmaktadır. Bazı RGD-tabanlı ajanlar klinik deneme aşamasına ulaşmıştır. Örneğin, 18F-galakto-RGD PET probu, αvβ3 integrin ekspresyonunu canlı olarak görüntüleyebilen bir araç olarak geliştirilmiştir (Liu S. ve ark., 2022). Bu da RGD'nin yalnızca tedavide değil, tanıda da kullanılabileceğini göstermektedir.

RGD peptidi, yapısal esnekliği, biyolojik özgüllüğü ve yüksek hedefleme kapasitesi sayesinde gen taşıyıcı sistemlerin yönlendirilmesinde stratejik bir araç olarak kabul edilmektedir. Özellikle meme kanseri ve diğer solid tümörlerde integrin ekspresyonunun artmış olması, RGD-tabanlı taşıyıcı sistemlerin klinik potansiyelini daha da artırmaktadır. Bu nedenle, RGD peptidleri, hem kanser biyolojisinin anlaşılması hem de yeni nesil hedefli tedavi sistemlerinin geliştirilmesi açısından önemli bir biyomoleküldür (Srivatsan ve ark., 2011; Zou ve ark., 2023; Javid ve ark., 2024).

2.7.2. RGD ile Hedeflenmiş Nanotaşıyıcılar

Nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler, terapötik ajanların biyoyararlanımını artırmak, hedef dokulara yönlendirmek ve sistemik toksisiteyi azaltmak için geliştirilen stratejik araçlardır. Bu taşıyıcı sistemlerin etkinliği, büyük ölçüde hedef dokuya spesifiklikle ilişkilidir. Bu noktada, RGD peptidi gibi hedefleme ligandlarının kullanımı, özellikle tümör mikroçevresine seçici yönlendirme sağladığı için büyük avantaj sunmaktadır. RGD peptidinin nanotaşıyıcı sistemlerle yüzey modifikasyonu, kanser hücrelerine veya tümör damarlarına aktif hedefleme olanağı sağlamakta ve böylece tedavi etkinliğini maksimize etmektedir (Wang B. ve ark., 2024a).

RGD peptidi, αvβ3 ve αvβ5 integrin reseptörlerine yüksek afinitesi nedeniyle tümör hücreleri ve neovasküler endotel hücreleri tarafından yüksek oranda internalize edilmektedir. RGD ile fonksiyonlandırılmış nanopartiküller, reseptör aracılı endositoz yoluyla hedef hücrelere alınmaktadır. Bu süreç, pasif hedeflemeye kıyasla daha hızlı ve spesifiktir (Hu ve ark., 2024). Böylece, genetik materyal, kemoterapötik ilaçlar veya

görüntüleme ajanları doğrudan hedef bölgeye ulaştırılabilmektedir. RGD'nin taşıyıcı sistemin yüzeyine bağlanması için başlıca şu kimyasal konjugasyon teknikleri kullanılmaktadır:

- **EDC/NHS yöntemi:** Karboksil grupları aktive edilerek primer amin gruplarına bağlanma sağlanmaktadır.
- **Maleimid-tiyol kimyası:** DSPE-PEG-maleimid gibi LPH-GTS tiyol grubu içeren cRGD kovalent bağlarla bağlanmaktadır.

Bu teknikler, taşıyıcının yapısal bütünlüğünü bozmadan RGD'nin yönlendirme fonksiyonunu korumaktadır.

RGD-modifiye nanopartiküllerle yapılan preklinik çalışmalarda, konvansiyonel sistemlere göre daha yüksek tümörde birikim, daha düşük sistemik toksisite ve daha etkili gen ekspresyonu gözlemlenmiştir (Park ve ark., 2012). RGD-siRNA konjugatları, tümör büyümesini inhibe etmekte ve anjiyogenezi baskılamakta başarılı olmuştur (Liao ve ark., 2021). RGD ile fonksiyonlandırılmış nanopartiküller, ÜNMK gibi birçok agresif kanser modelinde umut vaat etmektedir. RGD'nin hedef hücre spesifikliğini artırması, taşıyıcı sistemlerin hücre içine alım verimliliğini yükseltmesi, sistemik toksisiteyi azaltması ve daha düşük dozlarla yüksek tedavi etkinliği sağlaması gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Ancak bu avantajlara rağmen, RGD-reseptör etkileşimi hücre tipine ve tümör evresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Ayrıca, konjugasyon süreci nanoparçacıkların stabilitesini etkileyebilir; tümör içine nüfuz etme düzeyi ise taşıyıcının boyutu ve yüzey yükü gibi özelliklerden etkilenerek bazı kısıtlamalara yol açabilir (Sakurai ve ark., 2014) (Khabazian ve ark., 2022).

RGD peptidi ile yüzey modifiye edilmiş nanotaşıyıcı sistemler, klasik pasif hedefleme stratejilerinin ötesine geçerek, integrin reseptörleri üzerinden spesifik ve etkili hücre içine geçiş sağlamaktadır. Bu sistemler, kanser tedavisinde hem gen taşıyıcı hem de kemoterapötik ajanlar için yüksek hedefleme kabiliyeti sunarak terapötik etkinliği artırmakta ve yan etkileri azaltmaktadır. Nanotıp alanında bireye özgü tedavilerin geliştirilmesinde, RGD tabanlı sistemler önemli bir yer tutmaktadır.

2.7.3. Meme Kanseri Tedavisinde RGD Tabanlı Yaklaşımlar

Meme kanseri, heterojen moleküler yapısı, hastalar içinde değişken tedavi yanıtları ve metastatik potansiyeli nedeniyle günümüzde hala tedaviye dirençli seyreden en karmaşık

solid tümörlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durumun üstesinden gelmek amacıyla geliştirilen hedefe yönelik tedavi stratejileri, özellikle hücre yüzeyinde aşırı eksprese edilen reseptörlere yönelik taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasıyla yeni bir boyut kazanmıştır. Bu doğrultuda, RGD peptiti, özellikle αvβ3 ve αvβ5 integrinleri hedef alması sayesinde meme kanseri tedavisinde seçici hedefleme için son derece güçlü bir biyolojik araç haline gelmiştir (Bogdanovic ve ark., 2024). αvβ3 integrini, hem primer tümör dokusunda hem de metastatik lezyonlarda yüksek düzeyde eksprese edilen ve invazyon, anjiyogenez, migrasyon gibi süreçlerde anahtar rol oynayan bir reseptördür. RGD peptitlerin bu reseptöre yüksek afinitesi, taşıyıcı sistemlerin kanserli hücrelere ve tümör damarlarına seçici olarak yönlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu hedefleme özelliği hem tedavi etkinliğini artırmakta hem de sistemik toksisiteyi azaltmaktadır (Gao ve ark., 2023). Son yıllarda RGD peptidi ile modifiye edilmiş viral olmayan gen taşıyıcı sistemler, meme kanserinde umut vadeden yaklaşımlar arasında yer almıştır. Bu sistemlerde genetik materyaller lipozomlar, polimerik nanoparçacıklar veya LPH enkapsüle edilmiş; yüzeylerine RGD peptidi eklenerek αvβ3 integrin ekspresyonu yüksek hücrelere spesifik iletim sağlanmıştır (Qin ve ark., 2022). Bu sayede, özellikle ÜNMK gibi tedavisi zor alt tiplerde yüksek hücre içi alım ve uzun süreli gen ekspresyonu elde edilmiştir. RGD-tabanlı taşıyıcı sistemler yalnızca gen aktarımı sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda tümör vaskülarizasyonunu hedef alarak anjiyogenezi de baskılamaktadır. VEGF ekspresyonunu susturan genlerin RGD ile hedeflenmiş sistemlerle iletilmesi, neoanjiyogenez sürecini inhibe ederek tümör büyümesini durdurabilmektedir (Zhao Y. ve ark., 2014). Ayrıca, p53 gibi tümör supresör ve TRAIL gibi proapoptotik genlerin RGD-modifiye taşıyıcılarla tümör hücrelerine yönlendirilmesi, kemoterapiye dirençli hücre hatlarında bile etkili apoptoz indüksiyonu sağlamaktadır (Wu S. ve ark., 2025). Bireye özgü tedavi paradigmasında RGD peptidi, diğer hedefleme ligandları veya uyarıya duyarlı materyallerle birlikte kullanılarak akıllı sistemlerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Örneğin pH duyarlı polimerik sistemler, yalnızca tümör mikroçevresinde aktifleşirken; RGD peptidi, hücreye girişin yönlendirilmesini sağlamaktadır. Bu şekilde çift seviyeli hedefleme gerçekleştirilmiş olmaktadır (Xu ve ark., 2016). Ayrıca, RGD yüzeyli taşıyıcılarla siRNA kemoterapötik ajan taşınması, hem genetik baskılama hem de sitotoksik etki yoluyla sinerjik tedavi

etkisi yaratmakta, bu da özellikle metastatik meme kanseri tedavisinde çok umut verici bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. RGD-tabanlı taşıyıcı sistemler, halihazırda birçok preklinik çalışmada etkinliğini kanıtlamış olup, bazıları klinik araştırma aşamasına ulaşmıştır. Özellikle cRGD-PET probu gibi moleküller görüntüleme alanında kullanılırken, gen tedavi vektörlerinin klinik kullanımında da translasyonel çalışmalar artmaktadır. Günümüzde, RGD fonksiyonlu lipit polimer hibrit nanopartiküllerle intratumoral uygulamaya özel gen taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Bu, taşıyıcının sistemik toksisitesini azaltırken tümör içi dağılımını maksimize etmektedir (Gao ve ark., 2023; Bogdanovic ve ark., 2024). RGD peptidi, yalnızca moleküler hedefleme ajanı değil; aynı zamanda bireye özgü ve akıllı tedavi stratejilerinin temel yapı taşlarından biridir. Meme kanserinde özellikle αvβ3 integrin düzeyinin yüksek olduğu agresif ve tedaviye dirençli alt tiplerde, RGD-tabanlı gen taşıyıcı sistemler yeni bir terapötik pencere açmaktadır. Bu sistemler sayesinde hem daha etkili gen aktarımı hem de tümöre spesifik farmakolojik müdahale mümkün olmakta, böylece tedavi başarısı artarken sistemik yan etkiler minimuma indirilebilmektedir. Bu bağlamda, RGD tabanlı nanoformülasyonlar, önümüzdeki yıllarda kanser tedavisinin kişiye özel ve hedeflenmiş yönetiminde merkezi bir rol üstlenmeye en önemli adaylar arasında yer almaktadır. Henüz RGD tabanlı ya da doğrudan αvβ3 hedefli FDA ve EMA tarafından onaylanmış tedavi edici bir ilaç onayı yoktur. Cilengitide RGD tabanlı bir αvβ3 ve αvβ5 integrin inhibitörü, glioblastoma için faz III klinik çalışmalara kadar ilerlemiştir. Ancak Faz III'te klinik etkinlik eksikliği nedeniyle geliştirilmesi durdurulmuş ve FDA/EMA onayı alamamıştır (Reardon ve ark., 2008; Stupp ve ark., 2014). 18F-AH111585 ve benzeri PET/SPECT ajanları, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde αvβ3 integrin görüntüleme için klinik denemelerde yer almıştır (Mas-Moruno ve ark., 2010). Bunlar tanısal ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Bu durum, RGD peptidi tabanlı tedavilerde genel olarak karşılaşılan zorlukları yansıtmaktadır (Beer ve ark., 2005; Nabors ve ark., 2015; Bergonzini ve ark., 2022).

Tablo 2.4. Son yıllarda RGD stratejisinin meme kanseri tanı ve tedavisinde kullanımı.

Yıl	**RGD Stratejisi**	**Hedef/ Hücre Tipi**	**Tedavi/ Taşıyıcı Sistem**	**Kaynak bağlantısı**
2025	FA–RGD peptit konjugatı	MDA-MB-231	PET görüntüleme probu	(Okarvi ve ark., 2025)
2025	cRGD-dextran-kuersetin miselleri	MCF-7 *in vitro* ve *in vivo* fare modelleri	Apoptoz indüksiyon, antiproliferatif etki	(Yang C. ve ark., 2025)
2025	GO-HPAA-RGD@DOX, kombine PTT + DOX	*in vitro* (MCF-7) + *in vivo* fare modeli	Asidik ortamda kontrollü DOX salımı, lazer ile fototermal etki, tümör hedeflemede anlamlı artış ve tümör büyümesinde etkili inhibitör sonuçlar	(Zhu ve ark., 2025)
2024	RGD-modifikasyonlu shikonin yüklü lipozom	MCF-7 ve MDA-MB-231 *in vitro* ve fare modelleri	RGD-lipozomlar miR-34a + sisplatin taşıyıcı olarak tümör hedeflemede önemli artış sağlamıştır.	(Li J. ve ark., 2024)
2024	αvβ3 ekspresyonlu tümörlerde radionükleer RGD dimer kullanımı	*in vivo* fare modeli	Tümör ve neovaskülarizasyonda yüksek birikim; selektif organ temizliği; böbrekte en yüksek doz	(Josefsson ve ark., 2024)
2023	Siklik RGD ile modifiye pH/ROS-duyarlı nanopartikül	4T1 meme kanseri hücreleri	Doketaksel yüklü hibrit nanopartikül sistemi	(Yao ve ark., 2023)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Bileşenler

4T1 (Üçlü Negatif Meme Kanseri Fare Hücre Hattı)
Agar, Sigma
Agaroz Basica LE, Prona, EU
BPEI, Sigma
Compritol ® 888 ATO, Compritol ® HD ATO, Precirol ® ATO, Gattefossé
Cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys) (Cyclo RGDfC), MedChemExpress
DMEM, Serox
DMSO (Dimethyl Sulfoxide), Eco Tech Biotechnology
DNaz I, Serva
DPBS Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSPE-PEG (2000)-Maleimid, MedChemExpress
Etanol Merck KgaA, Darmstadt, Almanya
Ethidyum Bromid Sigma-Aldrich Co Inc., Steinheim, Almanya
F12, Sigma
Fetal Bovine Serum, SERVA
Gliserol Thermo Fisher Scientific, Massachusetts,ABD
Kloroform, Merck
Kolesterol-PEG 600, MedChemExpress
L-glutamin, Cytiva
L929 (Fibroblast Fare Hücre Hattı)
L929 (Fibroblast Fare Hücre Hattı)
Metanol, Merck
Moleküler ağırlık standardı GeneRuler 1kb ThermoFisher
MTT (3-(4 5-dimethylthiazol-2-yl)-2 5-diphenyltetrazolium bromide), Sigma

Non-essential Amino Acid, Sigma
Oktadesilamin, Sigma
PBS Sigma-Aldrich
Penisilin/Streptomisin, Cegrogen Biotech
Propilen glikol Merck KgaA, Darmstadt, Almanya
psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidi
RNase I (10 U/µL), ThermoFisher
Setil palmitat BASF, Ludwigshafen, Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Sigma-Aldrich
Sodyum Pyruvate, Capricon Scientific
Span 80 Sigma-Aldrich
Tripsin-EDTA, Cytiva
Tris (Trizma baz) Merck
Tween 80 Sigma-Aldrich Co Inc., Steinheim, Almanya
VEGF-A ELISA kit, SunRed
Zeocin, İnvivoGEN

3.2. Kullanılan Araç-Gereçler

BECKMAN COULTER Optima LE 80K Ultrasantrifüj
BEKO -20 Derin Dondurucu
BEKO Mikrodalga Cihazı
BINDER BD23 Benchtop İnkübatör
BIO-RAD Mini Trans-Blot Elektroforez Sistemi
BIO-RAD Mini-PROTEAN 3 Cell Elektroforez Sistemi
BIO-RAD PowerPac Basic Güç kaynağı
BIO-RAD PROTEAN II xi Cell and PROTEAN II xi 2-D Cell Elektroforez Sistemi
BIO-RAD SDS Poliakrilamid Jel Elektroforez Sistemi
BIO-RAD Sub-Cell GT Agaroz Jel Elektroforez Sistemi
BIO-RAD Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell
HANSHIN Diktip Otoklav

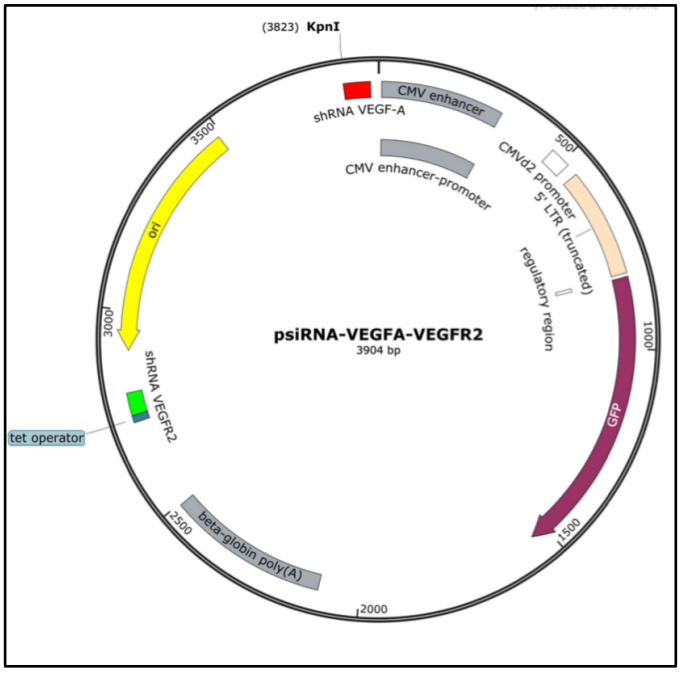
HEIDOLPH MR3001 Isıtıcı ve Manyetik Karıştırıcı
HEIDOLPH Rotamax 120 Rotator
HEIDOLPH Unimax 1010 İnkübatör 1000
HERA Safe KS12 Laminar Flow
HERAEUS Biofuge Fresco Santrifüj
HERAEUS Biofuge Stratos Santrifüj
HOLTEN Maxi Safe Laminar Flow
HUBER Polystat cc2 Heating Thermostat Su Banyosu
IKA T 18 Digital ULTRA-TURRAX
KODAK Image Station 2000 MM Multimodal Görüntüleme Sistemi
LEICA HI 1210 Parafin Su Banyosu
METTLER TOLEDO Excellence Plus XP Precision Balances (Hassas Terazi) (2x)
MILLIPORE Mili-Q A10 ve Elix 5 Su Saflaştırma Cihazı
OLYMPUS CKX41 Routine Inverted Fluorescent Microscope
OLYMPUS IX81 Fully Motorized Inverted Fluorescent Microscope
REGAL -20 Derin Dondurucu
SCOTSMAN AF 80 Kar Makinesi
SHELLAB SI9 Çalkalayıcı İnkübatör
SYSTEC VE-55 Otoklav
TECHNE DB-2D Dry-Block
TECHNE TE -10 D Tempunit Su Banyosu
THERMO -20 Dondurucu
THERMO Fluoroskan Ascent FL, Florometre + Luminometre
THERMO Forma -86 ULT Derin Dondurucu
THERMO HeraCell 240i Roller Bottle CO_2 İnkübatör
THERMO Locator 8 Plus Sıvı Nitrojen Tankı
THERMO MicroMax RF Santrifüj
THERMO Multi RF Santrifüj
THERMO Multiscan Spectrophotometer
THERMO Orion Star A111 pHmetre

THERMO Savant Gel Pump GEP Analyzer
THERMO Savant SPD111V SpeedVac Concentrator
THERMO Shandon Finesse 325 Mikrotom Cihazı
THERMO Smart2Pure Su Saflaştırma Cihazı
UĞUR +4 Dolap
VWR International Vorteks
ZEISS Discovery V8 SterEO Mikroskop

3.3. Deneysel Çalışmalar

3.3.1. Kullanılacak Genetik Materyalin Belirlenmesi ve Elde Edilme Süreci

Çalışma kapsamında, GFP (Yeşil Floresan Protein) ekspresyonu sağlayan ve zeocin direncini mümkün kılan psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid DNA (pDNA) yapısı model genetik vektör olarak tercih edilmiştir (ŞALVA, 2019). *Escherichia coli GT115* hücrelerine aktarılan pDNA, transformasyon sonrası çoğaltılmış ve elde edilen hücrelerden pDNA'sı izole edilerek karakterize edilmiştir. Genetik materyallerin izolasyonları alkali lizis yöntemiyle yapılmıştır (Delaney ve ark., 2018). Kullanılan pDNA'nın gen haritası Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'sına ait gen haritası (Snapgene ile oluşturulmuştur).

Bakteri Kültürünün Hazırlanması

E. coli GT115 suşu, Luria-Bertani (LB) agar ortamına ekilerek 37 °C'de inkübatörde bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Zeocin içeren LB agar besiyerinin hazırlanması amacıyla, LB agar (Sigma Aldrich, L289) 35 g olacak şekilde tartılmış ve 1 L distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan ortam, 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sterilizasyonun ardından besiyerinin sıcaklığı yaklaşık 50-55 °C'ye düşürüldükten sonra uygun konsantrasyonda Zeocin ilave edilmiştir. Daha sonra plaklara dökülerek katı hale gelmesi beklenmiştir. LB sıvı besi ortamı için 20 g LB *(Sigma Aldrich* L3022) tartıldıktan sonra 1L dH_2O'da çözülmüştür. Katı besi ortamının hazırlanışıyla benzer şekilde sıvı besiyeri ortamı hazırlanmıştır.

Bakteri hücrelerinin katı besiyerine ekimi

E.coli GT115 suşu içerisinde bulunan pDNA'ların izolasyonu için öncelikle bakteri hücreleri zeocin içeren LB katı besiyerine ekilmiş ve bakterilerin çoğalması için 1 gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişim göstermiş koloniler arasından rastgele bir tek koloni seçilerek, önceden hazırlanmış LB sıvı besiyerine inokülasyon yapılmıştır. Bakteri kültürü 150-200 rpm'de 1 gece çalkalanarak 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen bakteri solüsyonundan pDNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir.

Genetik Materyalin İzolasyonu

psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA plazmidini içeren *E. coli GT115* suşu çoğaltılmış ve pDNA alkali lizis yöntemiyle izole edilmiştir. İzolasyonu yapılan pDNA -20 ^oC'de muhafaza edilmiştir (Krupka ve ark., 2024).

3.3.2. Genetik Materyalin Karakterizasyonu

Genetik materyalin saflığının ve konsantrasyonunun belirlenmesi

psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'nın yapısal analizinde agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmış; ayrıca restriksiyon enzim kesimi ile doğrulama yapılmıştır. Çalışmada kullanılacak psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'nın spektrofotometrik olarak kontrolü yapılmıştır. 260 ve 280 nm'de absorbans ölçümleri alınarak elde edilen değerlerden pDNA'nın konsantrasyonu ve saflığı belirlenerek karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuca göre pDNA Tris-EDTA (TE) çözeltisiyle seyreltilmiştir. Son

konsantrasyon 100 µg/mL'ye ayarlanmıştır. Önformülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere -20 ºC'de saklanmıştır (Garcia-Alegria ve ark., 2020).

3.3.3. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

Tez kapsamında ÜNMK tedavisinde kullanılmak amacıyla genetik materyal taşınabilen, genetik aktarım sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilecek sistemlerin, istenilen genetik materyali stabil şekilde taşıyabilen, gerektiğinde salabilen, yüksek *in vitro* transfeksiyon verimliliği sunan ve *in vivo* ortamda gen susturma potansiyeline sahip olması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, hedeflenebilir özellik taşıyan, uygun partikül boyutuna, dar boyut dağılımına ve ideal zeta potansiyeline sahip formülasyonlar (gen taşıyıcı sistemler) elde edilmesi temel alınmıştır. Yürütülen önformülasyon çalışmaları sonucunda, ilerleyen deneysel aşamalarda değerlendirilmek üzere uygun fizikokimyasal niteliklere sahip aday yapılar oluşturulmuştur. Nihai olarak, belirlenen en uygun gen taşıyıcı sistem hedeflendirme stratejileriyle modifiye edilerek hem *in vitro* hem de *in vivo* deneysel sistemlerde test edilmiştir. Gen aktarımı amacıyla lipit ve polimer bileşenleri içeren hibrit nanosistemler tasarlanmıştır. Lipit polimer hibrit gen taşıyıcı sistemlerin (LPH-GTS) geliştirilmesinde, taşıyıcının fizikokimyasal özellikleri ve genetik materyal yükleme kapasitesi doğrudan gen taşıyıcı sistemde kullanılan lipit bileşimi, lipit:polimer oranı ve üretim yöntemine bağlıdır (Seo ve ark., 2023).

Tablo 3.1. Önformülasyon çalışmalarına ait içerik ve yöntem.

Kod	Lipit içeriği	Oran (%)	Yöntem
T1	Precirol	3	Vorteks
T2	Precirol	3	Sonikasyon
T3	Precirol	3	Prob sonikasyon
T4	Precirol	3	Ultra turrax
T5	Precirol	4	Vorteks
T6	Precirol	4	Sonikasyon
T7	Precirol	4	Prob sonikasyon
T8	Precirol	4	Ultra turrax
T9	Precirol	5	Vorteks

T10	Precirol	5	Sonikasyon
T11	Precirol	5	Prob sonikasyon
T12	Precirol	5	Ultra turrax
T13	Compritol 888	3	Vorteks
T14	Compritol 888	3	Sonikasyon
T15	Compritol 888	3	Prob sonikasyon
T16	Compritol 888	3	Ultra turrax
T17	Compritol 888	4	Vorteks
T18	Compritol 888	4	Sonikasyon
T19	Compritol 888	4	Prob sonikasyon
T20	Compritol 888	4	Ultra turrax
T21	Compritol 888	5	Vorteks
T22	Compritol 888	5	Sonikasyon
T23	Compritol 888	5	Prob sonikasyon
T24	Compritol 888	5	Ultra turrax
T25	Compritol HD	3	Vorteks
T26	Compritol HD	3	Sonikasyon
T27	Compritol HD	3	Prob sonikasyon
T28	Compritol HD	3	Ultra turrax
T29	Compritol HD	4	Vorteks
T30	Compritol HD	4	Sonikasyon
T31	Compritol HD	4	Prob sonikasyon
T32	Compritol HD	4	Ultra turrax
T33	Compritol HD	5	Vorteks

T34	Compritol HD	5	Sonikasyon
T35	Compritol HD	5	Prob sonikasyon
T36	Compritol HD	5	Ultra turrax
T37	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	3	Vorteks
T38	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	3	Sonikasyon
T39	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	3	Prob sonikasyon
T40	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	3	Ultra turrax
T41	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	4	Vorteks
T42	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	4	Sonikasyon
T43	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	4	Prob sonikasyon
T44	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	4	Ultra turrax
T45	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	5	Vorteks
T46	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	5	Sonikasyon
T47	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	5	Prob sonikasyon
T48	Oktadesilamin+kolesterol-PEG	5	Ultra turrax

Bu amaçla seçmiş olduğumuz Compritol 888, Compritol HD, Kolesterol, Kolesterol-PEG, Precirol HD lipitleri, Stearil amin, BPEI polimeri ve kloroform, etanol organik çözücüleri kullanılmıştır. Vorteks, sonikasyon banyosu, prob sonikasyon ve ultra-turrax gibi çeşitli yöntemlerle homojenizasyon sağlanmıştır. Kısa sürede hazırlanabilen ve tekrarlanabilirliği yüksek olan tek basamaklı yöntemle bu sistemler hazırlanmıştır. Lipit ve polimer fazı olarak iki farklı faz oluşturularak hazırlanmıştır (Wei ve ark., 2020). Lipit faz organik çözücü içerisinde çözülmüştür, sonra üzerine polimer faz yavaşça eklenmiş ve sistem, vorteks, sonikasyon, prob sonikasyon ve ultra-turrax yöntemleri kullanılarak homojenize edilmiştir.. Bu doğrultuda, çalışma kapsamında ilk olarak farklı lipit fazlarıyla önformülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, ardından optimum fiziksel özellikleri sağlayan sistemin seçimiyle nihai gen taşıyıcı sisteme ulaşılmıştır.

3.3.4. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

Lipit-polimer temelli hibrit taşıyıcı sistemlerin DLS analizleri

Parçacık boyutu analizleri, dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle Malvern Zetasizer NanoZS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan taşıyıcı sistemlerin yük (zeta potansiyel), partikül boyutları ve polidispersite indeksi (PDI) ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler 25 ºC'de her örnek için en az 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır (Rodriguez-Loya ve ark., 2023).

3.3.5. Lipit-Polimer temelli hibrit taşıyıcı sistemlerin organoleptik özelliklerinin belirlenmesi

Taşıyıcı sistemlerin pH, renk, faz ayırımı ve fiziksel görünümü değerlendirilmiştir.

3.3.6. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemin Stabilite Çalışmaları

Geliştirilmiş olan gen taşıyıcı sistemin raf ömrünü belirlemek için stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gen taşıyıcı sistemin gerçek zamanlı stabilite çalışmaları 5±3 ºC'de 6 ay süresince, hızlandırılmış stabilite çalışmaları 25±2 ºC'de 6 ay süresince gerçekleştirilmiştir (European Medicines Agency EMA, 2003).

3.3.7. Lipit-Polimer Temelli Hibrit Taşıyıcı Sistemin Sitotoksisite Çalışmaları

Sitotoksik etkinin belirlenmesinde, hücre canlılığı ve proliferasyonunu değerlendirmek amacıyla en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olan MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi uygulanmıştır. Bu yöntemde canlı hücreler, MTT bileşiğini metabolize ederek renkli formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan formazan miktarı, 570–630 nm dalga boyları arasında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. MTT analizi, yalnızca hücre canlılığını ve sitotoksisiteyi değerlendirmekle kalmayıp, aynı zamanda hücre proliferasyon oranları hakkında da dolaylı bilgi sunmaktadır (Ghasemi ve ark., 2021).

3.3.8. Genetik Materyal içeren Komplekslerin Hazırlanması

Hazırlanan hibrit sistemlerin, nükleik asitlerle kompleks oluşturma kapasiteleri, bu komplekslerden kontrollü salım gerçekleştirme potansiyelleri ve taşıdıkları genetik materyali serum nükleazlarının degrade edici aktivitesine karşı koruma yetenekleri incelenmiştir. Kompleksleşme işlemi, hazırlamış olduğumuz formülasyonlar ile psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA farklı oranlarda 30 dakika yatay çalkalayıcıda inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Negatif yüke sahip pDNA'nın, pozitif

yüklü hibrit sistemlerle elektrostatik etkileşim yoluyla kompleks oluşturması amaçlanmıştır. Kompleks oluşumunun değerlendirilmesinde, pDNA'nın agaroz jel ortamındaki elektroforetik hareketliliğinin azalması esas alınmıştır. Bu doğrultuda, pDNA'nın jel üzerinde tamamen hareketsiz kaldığı oran, %0.8'lik (a/h) agaroz jel elektroforezi kullanılarak belirlenmiştir. Böylece taşıyıcı sistemlerin pDNA ile kompleks oluşturma kapasiteleri niteliksel olarak analiz edilmiştir (Okami ve ark., 2024).

3.3.9. Genetik Materyal (psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA) içeren Gen Taşıyıcı Sistemin Karakterizasyonu

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında gen taşıyıcı sistem olarak hazırlanmış olan LPH-GTS partikül boyutları, zeta potansiyelleri, PDI, serum stabiliteleri, toksisiteleri, transfeksiyon etkinlikleri değerlendirilerek formülasyon olarak kullanılabilme potansiyeli değerlendirilmiştir. Terapötik psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA taşıyan LPH-GTS kanser hücrelerine aktarıldıktan sonra hücre içindeki stabilitesi ve biyolojik aktivitesi değerlendirilmiştir (Higgins ve ark., 2011).

3.3.10. Genetik Materyal (psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA) içeren Gen Taşıyıcı Sistemin DLS Analizleri

Malvern Zetasizer NanoZS aleti kullanılarak DLS analizleri belirlenmiştir. Hazırlanan gen taşıyıcı sistemin, yük (zeta potansiyel), partikül boyutları ve PDI ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler 3 tekrarlı yapılmıştır.

3.3.11. Genetik Materyal (psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA) içeren Gen Taşıyıcı Sistemin Stabilite Çalışmaları

Geliştirilmiş olan gen taşıyıcı sistemin raf ömrünü belirlemek için sıcaklık, serum ve nükleaz stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

a. Sıcaklık stabilite çalışmaları

Gen taşıyıcı sistemin dönem stabilite çalışmaları 5 ºC±3ºC'de ve 25 ºC±2 ºC'de 6 ay süresince yapılmıştır. Organoleptik özelliklerin değerlendirilmesi için pH, renk, faz ayırımı ve fiziksel görünüm değerlendirilmiştir.

b. Serum stabilite çalışmaları

Gen taşıyıcı sistemin etkinlik gösterebilmesi için taşıyıcı sistemin genetik materyali serum nükleazlarından koruması gerekmektedir. Tez çalışması kapsamında geliştirilmiş

olan lipit-polimer temelli hibrit gen taşıyıcı sistemin psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'yı serumdaki nükleazlardan koruyup korumadığının değerlendirilebilmesi için %10 FBS (Fetal Sığır Serumu) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ortamında, gen taşıyıcı sistemler 1, 3 ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, yapısal stabilitenin değerlendirilmesi amacıyla %1'lik (a/h) sodyum dodesil sülfat (SDS) uygulanmıştır. Ardından, serum varlığında taşıyıcı sistemlerin stabilitesi %1'lik agaroz jel elektroforezi yöntemiyle analiz edilmiştir (Dali ve ark., 2022).

c. Nükleaz stabilitesi (DNaz I stabilite) çalışmaları

Lipit-polimer temelli hibrit gen taşıyıcı sistemin psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'yı DNaz I'lerden koruyup korumadığı değerlendirilmiştir. 1 µg DNA içeren gen taşıyıcı sisteme, 1U DNaz I enzimi/2,5 µg DNA oranında hazırlanmış enzim çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan karışım 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubunda ise yalnızca serbest DNA, DNaz I ile muamele edilmiştir. Ardından, SDS eklenerek kısa süreli inkübasyon gerçekleştirilmiş ve numuneler %1'lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir (Limeres ve ark., 2019).

d. SDS salım çalışması

SDS'in anyonik yapısı nedeniyle, katyonik taşıyıcı sistemlerle elektrostatik olarak güçlü bir etkileşim kurduğu bilinmektedir. Bu etkileşim, taşıyıcı sistemin genetik materyalle olan bağından daha kuvvetli olduğundan, SDS ilavesi sonrasında genetik materyalin serbest kalması sağlanmaktadır. Genetik materyalin taşıyıcıdan salınması, kompleks oluşumu kadar, gen taşıyıcı sistemin işlevselliği açısından da kritik öneme sahiptir. Bu amaçla, pDNA'nın serbest kalmasını değerlendirmek üzere, gen taşıyıcı sistemlere %1 (a/h) oranında SDS çözeltisi eklenmiş ve karışım 2 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından örnekler jel kuyucuklarına yüklenmiş ve elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ortamında 80 V gerilimle 100 dakika boyunca yürütülmüştür. Her bir gen taşıyıcı sistem, SDS ile muamele edilmemiş serbest pDNA örneği ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (Lauring ve ark., 2021).

3.3.12. Sitotoksisite Çalışmaları

psiRNA-VEGF pDNA kargosunu taşıyan lipit-polimer hibrit temelli gen taşıyıcı sistemlerin sitoksisitesi 4T1 fare meme kanseri ve L929 fibroblast hücreleri üzerinde

değerlendirilmiştir. Sitotoksik etki MTT testi ile değerlendirilmiştir. Oluşan formazan kristallerinin miktarı, 570–630 nm dalga boyu aralığında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu kolorimetrik yöntem, yalnızca hücre canlılığını ve sitotoksisite düzeyini değerlendirmekle kalmayıp, aynı zamanda hücre proliferasyonuna dair nicel bilgi de sunmaktadır. Elde edilen reaksiyon ürünü, spektrofotometrik olarak okunarak miktar tayini gerçekleştirilmiştir (Hsieh ve ark., 2024).

3.3.13. Transfeksiyon Çalışmaları

pDNA ile etkin şekilde kompleks oluşturabilen, gerektiğinde bu genetik materyali serbest bırakabilen ve DNaz I enziminin degrade edici aktivitesine karşı koruyucu özellik gösterdiği belirlenen gen taşıyıcı sistemlerle memeli hücre hattında transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hedef hastalık modeli olarak üçlü negatif meme kanserine uygun şekilde, fare kaynaklı 4T1 hücre hattı tercih edilmiştir. Transfeksiyon protokolü, 96 kuyucuklu hücre kültürü plağı üzerinde aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır:

1. Hücreler, 7×10^4 hücre/cm² yoğunlukta olacak şekilde plaklara ekilmiş ve 37 °C sıcaklıkta, %5 CO_2 içeren inkübatörde bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
2. Ertesi gün, hücre yoğunluğu kontrol edilmiş ve %70–80 konfluens düzeyine ulaşan hücreler transfeksiyon işlemi için seçilmiştir.
3. pDNA ile LPH-GTS karışımları hazırlanarak, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
4. Hücreler PBS ile yıkanarak hazırlanmıştır.
5. Her kuyucuğa 100 µL taze besiyeri ilave edilmiştir.
6. Ardından, gen taşıyıcı sistemler uygun hacimde ilgili kuyucuklara eklenmiştir.
7. Plaka, %5 CO_2 atmosferine sahip inkübatöre yerleştirilmiş ve 4 saat boyunca inkübe edilmiştir.
8. Süre sonunda, hücrelerin üzerine taze besiyeri eklenerek kültür koşulları sürdürülmüştür.
9. Transfeksiyon sonrası hücreler, ters ışık floresan mikroskobu (inverted floresan mikroskop) ile 24. ve 48. saatlerde görüntülenmiştir (Bono ve ark., 2020).

3.3.14. Hücrelerin Migrasyon Hızının Değerlendirilmesi

Kanser hücrelerinin migrasyon kabiliyetinin baskılanıp baskılanmadığını değerlendirmek amacıyla, hücre hareketliliği yaygın olarak kullanılan yara iyileşme (Wound Healing/Scratch Assay) yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu tez çalışmasında, psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'sının hücre içerisine etkin bir şekilde aktarılması yoluyla VEGF geninin ekspresyonunun inhibe edilmesi ve böylece hücresel göç yeteneğinin sınırlandırılması hedeflenmiştir. Hücre migrasyon hızının değerlendirilmesinde, psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'sını içeren gen taşıyıcı sistemler ile yapılan transfeksiyon ve sitotoksisite analizleri sonucunda belirlenen uygun konsantrasyonlar esas alınmıştır. Çalışmada kullanılan 4T1 hücreleri, 24 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve yaklaşık 24 saatlik inkübasyonun ardından %90 konfluens düzeyine ulaştıklarında, steril 10µL pipet ucu kullanılarak kültür yüzeyinde çizik oluşturulmuştur. Ardından, psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA içeren gen taşıyıcı sistemler çizik alanı üzerine uygulanmıştır. Transfeksiyon, 37 °C sıcaklık ve %5 CO_2 içeren inkübasyon koşullarında 4 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda ortam, %10 FBS içeren taze DMEM besiyeri ile değiştirilmiş ve hücrelerin çizik alanı üzerindeki göçü sırasıyla 0., 24. ve 48. saatlerde görüntülenerek takip edilmiştir (Harada ve ark., 2023).

3.3.15.Kanser hücrelerinde VEGF ekspresyonunun susturulduğunun gösterilmesi VEGF protein düzeyinin analizi

Meme kanseri hücrelerine psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA içeren gen taşıyıcı sistemlerin uygulamasından sonra VEGF proteininin ekspresyon düzeyindeki değişimin incelenmesi ELISA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. ELISA protokolü kullanılacak kite uygun olacak şekilde yapılmıştır (Kim M. ve ark., 2024).

3.3.16. *In vivo* Çalışmalar

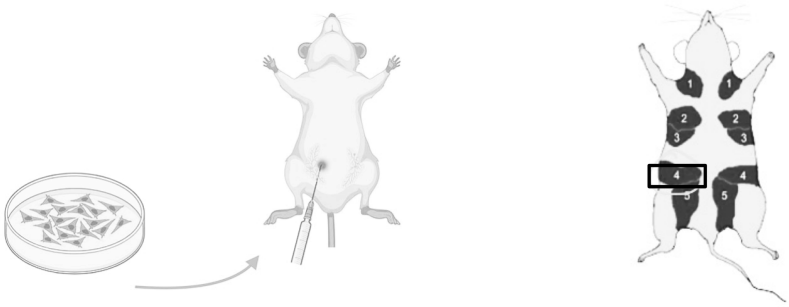
Çalışmamızda 48 tane 6-8 haftalık dişi BALB/c tipi fare kullanılmıştır. *İn vivo* çalışmalarda, her bir grup n=5 olacak şekilde deney grupları oluşturulmuştur. Sağkalım analizlerinde ise her grup için n=3 hayvan kullanılmıştır. Deneysel uygulamalara geçilmeden önce, ön çalışmalar kapsamında tümör modeli oluşturulmuş ve tümör gelişimi izlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda nihai çalışma tasarımı oluşturulmuş ve tüm gruplar için deneyler başlatılmıştır.

Tez çalışmamızda gruplar aşağıdaki şekilde tasarlanmıştır:

1) Tümör grubu (sadece tümör enjekte edilmiş kontrol grubu, TM)

2) PBS enjekte edilen grup (sham grubu, TM+PBS)
3) pDNA uygulanan grup (TM+pDNA)
4) Taşıyıcı sistem uygulanan grup (TM+LPH-GTS-cRGD)
5) Hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistem (TM+LPH-GTS:pDNA)
6) Hedeflenmiş gen taşıyıcı sistem (TM+LPH-GTS-cRGD:pDNA)

Tüm gruplara tümör enjeksiyonu uygulanmıştır. Tümör oluşturulması amacıyla, %80 konfluens düzeyine ulaşan 4T1 hücreleri HBSS (Hank'in Dengeli Tuz Çözeltisi) içinde çözündürülerek, her fareye 0,1 mL içinde 1×10^5 hücre içerecek şekilde hazırlanmıştır (toplamda 1 mL'de 1×10^6 hücre/mL). Hücreler tripsinizasyon yoluyla kültür yüzeyinden ayrılmış, Thoma lamı ile sayımı yapılarak uygun yoğunlukta süspansiyon hazırlanmıştır. Meme tümörü modeli oluşturmak üzere, 4T1 hücre süspansiyonu bir insülin enjektörü kullanılarak BALB/c dişi farelerin sağ meme yağ dokusu tabanına enjekte edilmiştir (Şekil 3.2) (Ilhan-Ayisigi E. ve ark., 2024; Yang L. Ve ark., 2020). *In vitro* çalışmalarla belirlenen etkin konsantrasyonlar doğrultusunda uygun doz hesaplanarak *in vivo* uygulama protokolü planlanmıştır. Tümör hücre enjeksiyonunun ardından tümör hacminin ortalama 40–50 mm^3 düzeyine ulaşması ile hayvanlar rastgele gruplara ayrılmış ve tedavi sürecine başlanmıştır. Tedavi uygulamaları gün aşırı olacak şekilde toplam üç kez gerçekleştirilmiştir. Tümör enjeksiyonundan itibaren 26. günde hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon öncesinde tüm hayvanlara uygun anestezi uygulanmış ve tümör bölgesi %70 etanol ile sterilize edilmiştir. Daha sonra, tümör çevresindeki deri steril makas yardımıyla dikkatlice kesilerek tümör dokusu eksize edilmiştir. Tümörler, sonraki moleküler ve histolojik analizler için uygun koşullarda toplanarak işlemeye alınmıştır. Enjeksiyon yapılan meme dokusu aşağıda şekilde gösterilmiştir (Zhang Y. ve ark., 2018). Deneysel protokol kapsamında uzun dönem yaşam süresini değerlendirmek amacıyla sağkalım analizleri yürütülmüş ve hayvanlar, doğal yaşam sürelerinin sonuna kadar izlenmiştir. Bu süreçte, herhangi bir invaziv girişim uygulanmaksızın yalnızca genel sağlık durumları düzenli olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 3.2. Fare meme bezi bölgelerinin anatomik konumunu gösteren diyagram.

Primer Tümörlerin Proliferasyon Hızının Değerlendirilmesi

Primer tümör enjeksiyonunu takiben, hayvanlarda tümör büyüme hızının izlenebilmesi amacıyla tümör ölçümleri, enjeksiyondan bir hafta sonra başlanarak üç günde bir yapılmıştır. Ölçümler, tümör kitlesi ilk kez elle palpe edilebilir boyuta ulaştığında başlatılmış ve her ölçümde tümörün X (genişlik) ve Y (uzunluk) eksenlerindeki boyutları dijital kumpas yardımıyla milimetre cinsinden kaydedilmiştir. Ölçülen değerler kullanılarak tümör hacimleri hesaplanmış ve her ölçüm noktasında ortalama tümör hacmi elde edilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, her grup için tümör büyüme eğilimini gösteren bir tümör hacmi değişim grafiği oluşturulmuştur. Çalışmanın sonunda, sakrifikasyon işlemi gerçekleştirilerek primer tümörler çıkarılmış ve deneysel çalışmalar kapsamında kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmıştır. Ayrıca, çıkarılan tümörlerin ağırlıkları hassas teraziyle ölçülmüş ve bu veriler grafiksel olarak analiz edilmiştir (Pulaski ve ark., 2001).

Hayvan Ağırlıklarının Takibi

Meme kanseri modeli oluşturulan hayvanların, zaman içerisinde hem tümör yükünün artması hem de sistemik hastalık progresyonuna bağlı olarak normal vücut ağırlıklarında değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu nedenle, tümörlerin eksizyonunun ardından hayvan ağırlıkları yeniden değerlendirilmiş ve gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu analizler, tümör varlığının sistemik düzeyde oluşturduğu etkilerin dolaylı bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Kim E. J. ve ark., 2011).

3.3.17. İmmünohistokimyasal Analizler

Doku takibi ve kesit alma

1. Tümör ve organ dokuları, %10'luk nötral formalin içinde bir gece boyunca fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur.

2. Ertesi gün, fiksatifin dokudan uzaklaştırılması amacıyla dokular yaklaşık 4 saat sürekli akan musluk suyunda yıkanmıştır.
3. Dehidrasyon basamakları için sırasıyla %70, %80 ve %90'lık etanol serilerinde her birinde birer gün süreyle bekletilmiştir.
4. Ardından, %100 etanol içerisinde 3 saat bekletilen dokular, saydamlaştırma amacıyla ksilol serilerinden geçirilmiştir.
5. Bu işlemleri takiben, doku örnekleri sıvı parafin serilerinden geçirilerek parafine gömülmüş ve bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan parafin bloklardan immünohistokimyasal analizler için örnekler Superfrost lamlara alınmıştır. Tümör oluşturulan gruplardan elde edilen doku örnekleri, plastik kasetlere yerleştirilerek doku takip cihazına aktarılmış ve yukarıda belirtilen aşamalara uygun şekilde işlenmiştir. Takip işlemleri tamamlanan dokular, metal kalıplara alınarak parafin blok haline getirilmiştir (Li Q. ve ark., 2021).

Hematoksilen-Eozin Boyama

Parafin bloklardan alınan doku kesitleri, deparafinizasyon amacıyla iki kez ksilolde bekletilmiştir. Daha sonra sırasıyla %100, %95 ve %70'lik alkol serilerinden geçirilerek alkol uzaklaştırılmış ve doku slaytları 5 dakika süreyle suda bekletilmiştir. Hidrate edilen preparatlar, hematoksilen çözeltisine daldırılarak yaklaşık 3 dakika boyanmış; nükleusların mavi-mor renge boyanması sağlanmıştır. Takiben slaytlar %95'lik alkole 10 kez daldırılmış ve ardından eozin ile kısa süreli muamele edilerek sitoplazmanın pembe renge boyanması sağlanmıştır. Devamında %95 ve %100'lük etanol serilerinde bekletilen preparatlar, ksilolden üç kez geçirildikten sonra Entellan (Merck Millipore #1.079.600.500) ile kapatılarak mikroskop analizine hazır hale getirilmiştir (Changizi ve ark., 2021).

Ki-67 İmmünohistokimyasal Boyama

Parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığındaki doku kesitleri, pozitif yüklü lamlar üzerine yerleştirilmiş ve 60°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Takiben kesitler, deparafinizasyon amacıyla iki kez ksilolde bekletilmiş; ardından sırasıyla %100, %95 ve %70'lik etanol serilerinden geçirilerek rehidrasyon sağlanmıştır. Rehidrate edilen lamlar 5 dakika distile suda bekletilmiş ve antijen geri kazanımı için sitrat tamponu (pH 6.0) içinde 95–100°C'de 20 dakika ısıtılmıştır. Oda sıcaklığında soğutma sonrası, endojen peroksidaz

aktivitesini bloke etmek amacıyla %3 hidrojen peroksit çözeltisi ile 10 dakika muamele edilmiştir. Non-spesifik bağlanmaların önlenmesi amacıyla blokaj solüsyonu uygulanmış ve ardından Ki-67 antikoru ile lamlar 4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün, lamlar PBS ile yıkandıktan sonra HRP-konjuge ikincil antikor ile oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir (Abcam #80437 HRB/DAB detection IHC Kit). DAB substratı ile yapılan renk geliştirme sonucunda Ki-67 pozitif hücre çekirdekleri kahverengi olarak gözlenmiştir. Karşı boyama için hematoksilen kullanılmış ve ardından lamlar %95 ve %100 etanol serilerinden geçirilerek dehidre edilmiştir. Üç kez ksilen ile şeffaflaştırılan preparatlar Entellan (Merck Millipore #1.079.600.500) ile kapatılarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmiştir (Shao et al., 2020).

ELISA Analizleri

Çalışmaya dahil edilen tümör dokuları hassas terazide tartılmış ve her 1 g dokuya karşılık 10 mL olacak şekilde PBS ilave edilerek, homojenizatörde yaklaşık 30 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz (süpernatant) temiz tüplere aktarılmış ve -20 °C'de analiz gününe kadar saklanmıştır. ELISA uygulamasından en az 2 saat önce örnekler oda sıcaklığına getirilmiş ve ilgili kit protokolüne uygun şekilde işleme alınmıştır (Mouse VEGF-A ELISA Kit, SunRed, Katalog No: 201-02-1454).

3.3.18. İstatistik Analizler

Bütün denemeler bağımsız 6 kez tekrarlanmıştır. Bulgular ortalama değer ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Tekrarlı ELISA ölçümlerindeki protein miktarı değerleri arasındaki farklar ve sitotoksisite çalışmaları ile son aşamada farklı uygulamalar arasında gen ekspresyonu düzeyindeki değişiklikler istatistiksel analizlerde p değerinin 0.05'in altında olması anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Önformülasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Gen taşıyıcı sistemin etkinliğini ve stabilitesini doğrudan etkileyebilecek temel fizikokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen önformülasyon çalışmaları Tablo 4.1.'de sunulmuştur. Gen taşıyıcı sistemde yer alacak lipit ve polimer seçimi; taşıyıcı sistemin boyutu, yüzey yükü, homojenliği ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak optimize edilmiştir. Ayrıca, genetik materyal ile taşıyıcı bileşenler arasındaki etkileşimler, kompleks oluşumu verimliliği ve stabilite açısından değerlendirilmiştir. Farklı oran ve bileşimlerde hazırlanan gen taşıyıcı sistemin karakterizasyonu; partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli gibi parametreler ile yapılmış, bu veriler doğrultusunda en uygun sistemin seçimi yapılmıştır. Bununla birlikte, sistemin fiziksel kararlılığı ve taşıyıcı-kompleks yapısının zaman içerisindeki değişimleri de göz önünde bulundurulmuştur. Elde edilen veriler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. LPH-GTS gen taşıyıcı sistemine ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve boyut dağılımına ilişkin veriler, Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments) cihazı kullanılarak elde edilmiş ve raporlanmıştır.

Tablo 4.1. Önformülasyon çalışmasına ait bulgular.

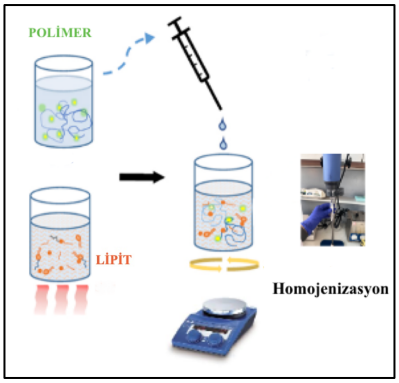
Taşıyıcı No	Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)	PDI
T1	38.7 ± 2.96	+5.5 ± 0.71	0.63 ± 0.05
T2	90.6 ± 1.33	+3.6 ± 0.27	0.47 ± 0.05
T3	70.9 ± 4.86	-4.5 ± 1.3	0.3 ± 0.05
T4	58.9 ± 3.99	-2.8 ± 1.1	0.31 ± 0.02
T5	19.0 ± 4.73	-4.4 ± 0.29	0.53 ± 0.01
T6	19.0 ± 4.53	+7.7 ± 0.7	0.63 ± 0.05
T7	10.2 ± 3.19	+1.3 ± 1.83	0.62 ± 0.03
T8	83.0 ± 4.65	+5.2 ± 0.63	0.56 ± 0.05

T9	59.1 ± 0.9	+13.2 ± 0.46	0.48 ± 0.05
T10	68.7 ± 1.38	-3.0 ± 1.08	0.15 ± 0.04
T11	6.9 ± 0.7	+3.2 ± 1.97	0.2 ± 0.02
T12	92.3 ± 1.96	+10.1 ± 0.64	0.63 ± 0.03
T13	79.9 ± 2.25	-0.4 ± 1.41	0.46 ± 0.04
T14	24.1 ± 1.72	-3.5 ± 1.57	0.11 ± 0.02
T15	21.4 ± 4.23	+0.8 ± 0.63	0.16 ± 0.02
T16	21.5 ± 2.11	-1.8 ± 1.51	0.49 ± 0.03
T17	32.4 ± 1.76	+13.6 ± 0.86	0.1 ± 0.05
T18	52.2 ± 2.94	+11.2 ± 1.34	0.19 ± 0.04
T19	43.9 ± 1.13	+17.7 ± 1.34	0.42 ± 0.03
T20	31.2 ± 4.11	+12.4 ± 1.16	0.51 ± 0.01
T21	60.1 ± 0.84	+11.1 ± 0.36	0.48 ± 0.03
T22	17.6 ± 4.94	-1.3 ± 1.7	0.23 ± 0.05
T23	61.3 ± 3.98	+12.9 ± 0.78	0.52 ± 0.02
T24	38.0 ± 1.39	+5.8 ± 0.54	0.24 ± 0.03
T25	96.0 ± 0.52	+8.1 ± 0.27	0.69 ± 0.05
T26	75.7 ± 4.17	+12.9 ± 1.26	0.54 ± 0.04
T27	23.0 ± 3.68	+1.4 ± 1.42	0.48 ± 0.04
T28	51.3 ± 3.78	-2.8 ± 0.23	0.6 ± 0.04
T29	58.3 ± 3.97	-0.4 ± 1.12	0.49 ± 0.02
T30	9.2 ± 0.83	+3.5 ± 0.61	0.44 ± 0.02
T31	109.7 ± 2.11	+11.4 ± 1.36	0.16 ± 0.04
T32	80.3 ± 1.02	+12.2 ± 0.51	0.32 ± 0.04
T33	10.9 ± 4.38	-4.9 ± 1.44	0.26 ± 0.04
T34	90.4 ± 3.3	+5.2 ± 0.9	0.24 ± 0.05
T35	91.9 ± 1.99	+3.3 ± 1.89	0.67 ± 0.03

T36	77.8 ± 0.79	-0.6 ± 0.45	0.33 ± 0.03
T37	32.4 ± 1.9	-2.6 ± 0.81	0.63 ± 0.04
T38	13.8 ± 1.96	+1.8 ± 0.4	0.47 ± 0.04
T39	66.6 ± 3.78	+13.9 ± 1.86	0.57 ± 0.04
T40	44.6 ± 3.37	+1.5 ± 1.78	0.4 ± 0.04
T41	16.0 ± 4.49	+5.4 ± 0.66	0.44 ± 0.05
T42	49.6 ± 2.62	+9.1 ± 1.39	0.39 ± 0.02
T43	8.1 ± 1.04	+2.3 ± 1.67	0.22 ± 0.03
T44	36.8 ± 3.71	+24.4 ± 1.2	0.33 ± 0.01
T45	98.3 ± 3.92	+14.2 ± 1.15	0.27 ± 0.03
T46	64.6 ± 3.03	+6.0 ± 0.64	0.11 ± 0.01
T47	33.1 ± 3.97	+4.9 ± 0.37	0.48 ± 0.03
T48	51.8 ± 2.72	+1.0 ± 1.81	0.2 ± 0.03

4.2. Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

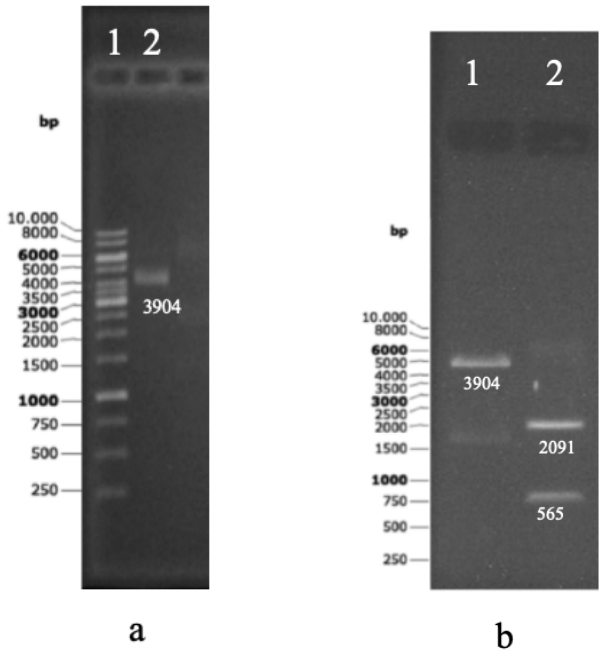
Önformülasyon çalışmaşlarından yola çıkılarak ÜNMK'de gen taşıyıcı sistem olarak kullanılak üzere tasarladığımız LPH-GTS hazırlanmıştır. Bu sistem hazırlanırken polimer olarak BPEI; lipit olarak kolesterol ve oktadesilamin (1:1) olacak kullanılmış ve nanopresipitasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Homozenizasyon için ultra turrax IKA 18 kullanılmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Lipit polimer temelli hibrit sistemin hazırlanışı.

4.3. Genetik Materyalin Saflığına ve Konsantrasyona Ait Bulgular

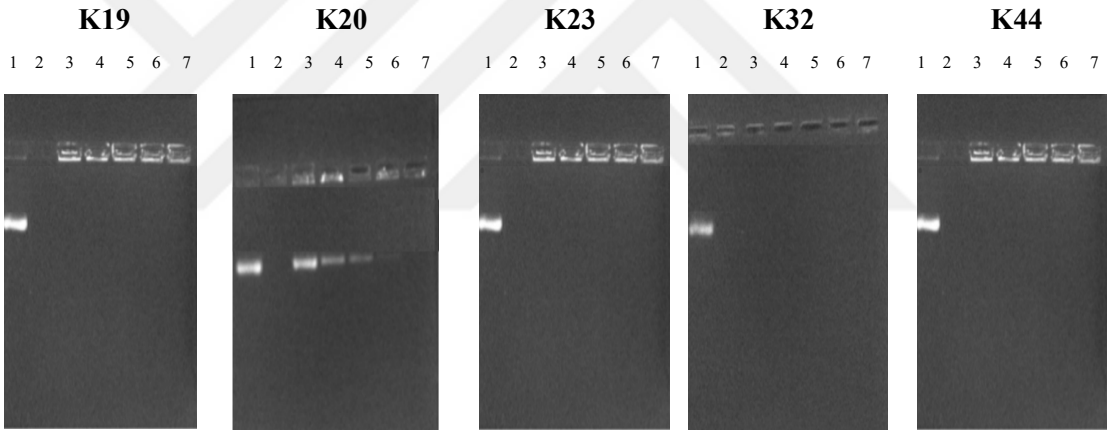
psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'nın saflık düzeyini belirlemek amacıyla, 260–280 nm dalga boyu aralığında UV absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler sonucunda, DNA'ya özgü 260 nm ve proteinlerin baskın olarak absorbsiyon gösterdiği 280 nm dalga boyları dikkate alınarak hesaplanan A260/280 oranının 1.82 ile 1.95 arasında olduğu saptanmıştır. Bu oranlar, pDNA örneklerinin yüksek saflıkta olduğunu ve protein kaynaklı kirlenmenin bulunmadığını göstermektedir. pDNA, BsrGI enzimi ile kesildikten sonra % 0.8 (a/h) agaroz jel ortamında elektroforez analizine tabi tutulmuştur. Uygulama sonucunda, kesilmemiş formlara göre mobilitesi azalmış, lineer yapıdaki DNA bantları belirgin şekilde gözlemlenmiştir. Elde edilen bant desenleri, plazmid haritasıyla uyumlu fragment boyutlarında olup, kesimin özgüllüğünü doğrulamaktadır. Ayrıca, enzimatik işlem sonrasında jel üzerinde farklı konumlarda ortaya çıkan bantlar, plazmidlerin başarılı bir şekilde kesildiğini ve yapısal olarak doğrulandığını göstermiştir (Şekil 4.2.). Elde edilen bu sonuçlara dayanarak, ilerleyen deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere pDNA stok çözeltisi, TE tamponu ile 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır.



Şekil 4.2. psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'sına ait agaroz elektroforez görüntüleri. **a.** psiRNA-VEGFA/VEGFR2 'nin elektroforetik kontrolü 1. 1 kb DNA ladder, 2. psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidi. **b.** psiRNA-VEGFA-VEGFR2'nin restriksiyon enzimiyle doğrulanması. 1. psiRNA-VEGFA-VEGFR2 plazmidi. 2. BsrGI restriksiyon enzimiyle kesim sonrası.

4.4. LPH-GTS:pDNA Komplekslerin Oluşumu

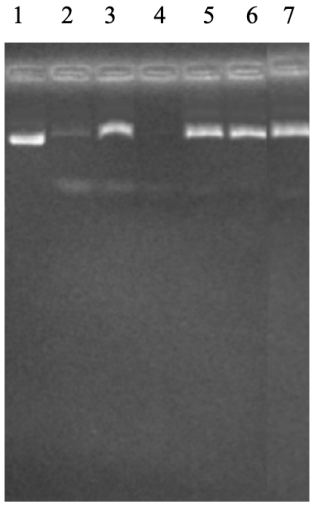
Pozitif yüzey yüküne sahip, partikül boyutu 100 nm'nin altında olan ve PDI değeri 0.5'in üzerinde olmayan taşıyıcı sistemler seçilmiştir (T19, T20, T23, T32 ve T44). Nükleik asitlerle bağlanabilme yeteneğinin araştırılması amacıyla psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid (100 µg/mL) ile kompleks haline getirilmiş ve elektroforetik hareket agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.3.). Hazırlanmış olan taşıyıcı sistem ile psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA kompleks oluşumu elektroforetik hareket ile değerlendirilmiştir. Artan oranlarda (1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1) taşıyıcı sistem ile (LPH-GTS) psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA kompleksleri hazırlanmıştır.



Şekil 4.3. LPH-GTS: pDNA kompleksleşme çalışmalarına ait elektroforez jel görüntüleri. Kuyucuklara yüklenen örnekler sırasıyla; 1: serbest psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid, 2: taşıyıcı sistem, 3,4,5,6,7: sırasıyla LPH:GTS:pDNA 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 h/h oranlarında kompleksler.

4.5. LPH-GTS:pDNA Komplekslerinin DNaz I Enzimi Varlığında Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

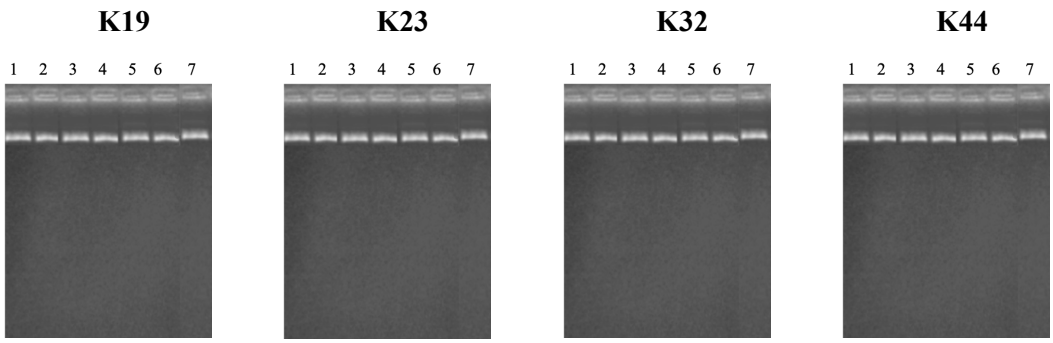
LPH-GTS:pDNA komplekslerinin, pDNA'yı DNaz I enziminin degrade edici etkisine karşı koruma kapasitesini değerlendirmek amacıyla 3.3.6. numaralı bölümde açıklanan yöntemle gerçekleştirilen DNaz I stabilite testine ait sonuçlar Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. LPH-GTS:pDNA komplekslerinin DNaz I enzimi varlığında stabilitelerini gösteren agaroz jel fotoğrafı. Kuyucuklara yüklenen örnekler sırasıyla; 1: serbest pDNA, 2: DNaz I ile 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmış çıplak pDNA, 3: K19 (T19:pDNA 1:1 h/h)+ DNaz I , 4: K20 (T20:pDNA 5:1 h/h) + DNaz I, 5: K23 (T23:pDNA 1:1 h/h)+ DNaz I, 6: K32 (T32:pDNA 1:1 h/h)+ DNaz I, 7: K44 (T44:pDNA 1:1 h/h)+ DNaz I ile inkübasyonu sonrası jel görüntüleri.

4.6. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Salım Çalışmasına Ait Bulgular

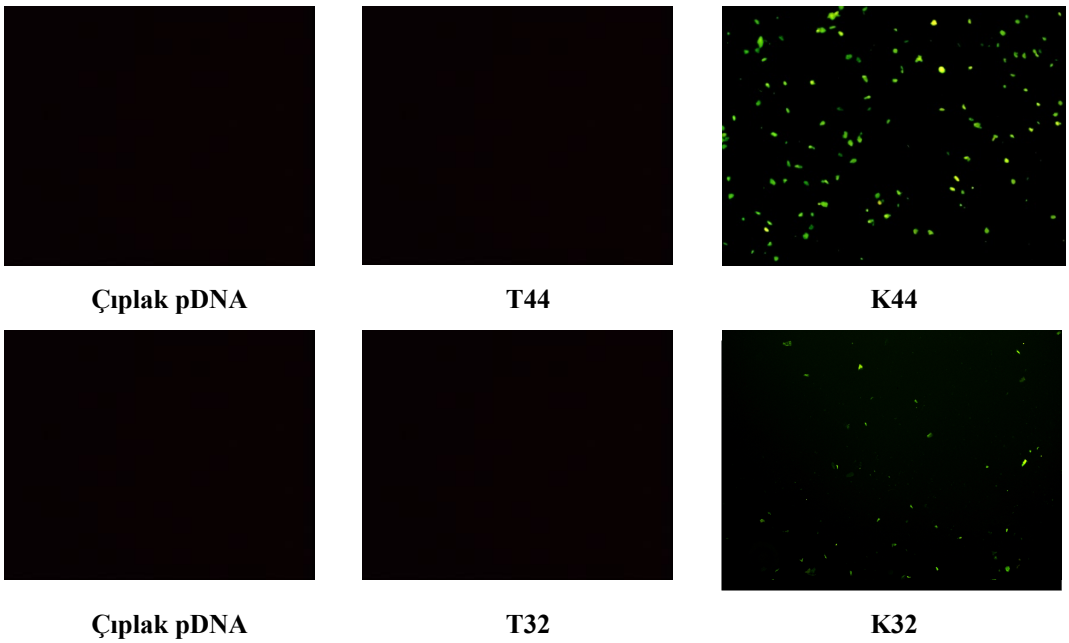
SDS'in anyonik yapısı, katyonik taşıyıcı sistemlerle genetik materyale kıyasla daha güçlü elektrostatik etkileşim kurma eğilimindedir. Ortama SDS eklendiğinde, bu etkileşim sayesinde taşıyıcı sistem ile SDS arasında bir bağ oluşur ve bu bağlanma, genetik materyalin kompleks yapıdan ayrılarak serbest formuna geçmesini mümkün kılar. Taşıyıcı sistemlerin yalnızca genetik materyalle kompleks oluşturabilmesi değil, aynı zamanda uygun koşullarda bu materyali serbest bırakabilmesi de gen taşıyıcı sistemin biyolojik işlevselliği açısından kritik öneme sahiptir. Bu kapsamda, pDNA'nın serbest kalma potansiyelini değerlendirmek amacıyla her bir gen taşıyıcı sistemin SDS, son konsantrasyonu %1 (a/h) olacak şekilde eklenmiş ve karışım 2 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından örnekler jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez, %1 (a/h) agaroz jel ortamında 80 V gerilim altında 100 dakika boyunca yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar, SDS ile işlem görmemiş serbest pDNA örneği ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve her bir grubun doğruluğu bu kontrol referansına göre analiz edilmiştir. Genetik materyalin serbestleşme potansiyelini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen SDS ile muamele, LPH-GTS:pDNA komplekslerinden pDNA'nın ayrılmasına neden olmuş ve elde edilen veriler Şekil 4.5'te verilmiştir.

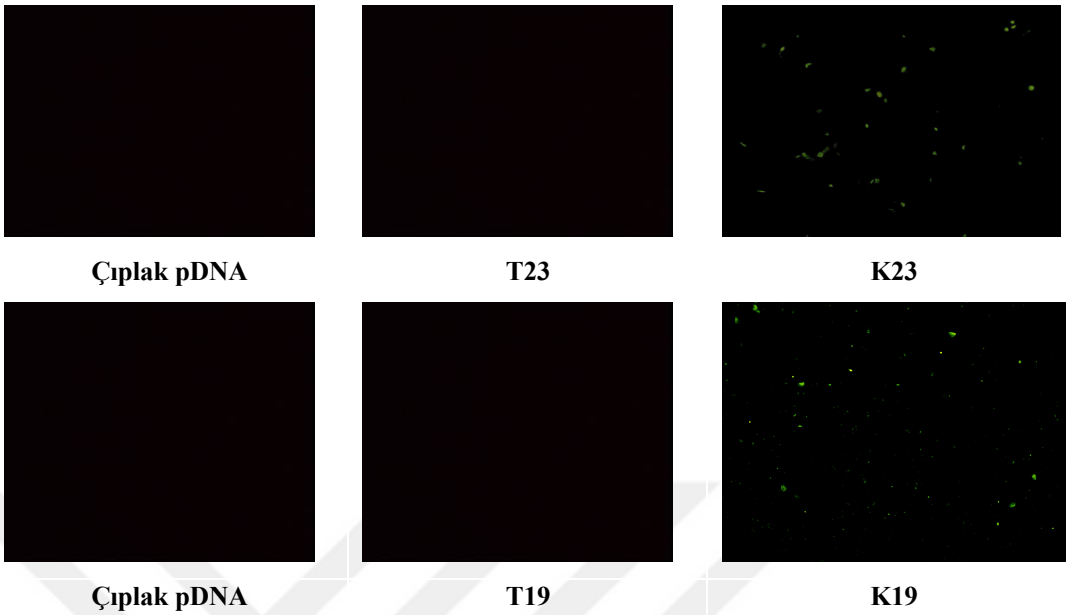


Şekil 4.5. LPH-GTS:pDNA komplekslelerinden SDS teşviki ile pDNA'nın serbest hale geçirilmesine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kuyucuklara yüklenen örnekler sırasıyla; 1: SDS uygulanmamış serbest pDNA kontrolü; kuyucuk 2–7: SDS ile muamele edilen kompleks örnekleri. Sırasıyla LPH-GTS: pDNA (h/h) oranları 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 ve 5:1'tir.

4.7. LPH-GTS:pDNA Komplekslerinin Transfeksiyon Başarısının Değerlendirilmesi

LPH-GTS:pDNA komplekslerinin 4T1 hücre hattında oluşturduğu transfeksiyon etkinliği, yukarıdaki bölümde açıklanan deneysel yöntem doğrultusunda gerçekleştirilmiş ve inverte mikroskop kullanılarak izlenmiştir. Hücrelerdeki GFP ifadesi, floresan sinyaline dayalı olarak değerlendirilmiştir. Gen taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon kabiliyetini ortaya koyan floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.6'da sunulmuştur.





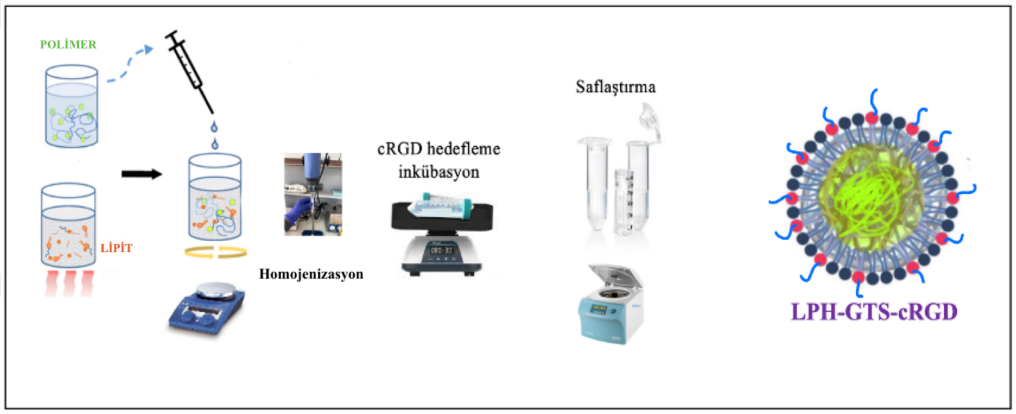
Şekil 4.6. LPH-GTS:pDNA kompleksleriyle gerçekleştirilen transfeksiyon sonrası, 48. saatte elde edilen inverted floresan mikroskop görüntüleri. Görüntüler, genel görünümü temsil edecek şekilde ve 10X büyütmede kaydedilmiştir.

4.8. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

ÜNMK hücrelerinde hedefleme yapılabilmesi amacıyla, αvβ3 integrin reseptörüne yüksek özgüllük ve bağlanma afinitesi gösteren cRGD peptidi tercih edilmiştir. Bu reseptörlerin, söz konusu kanser hücrelerinde aşırı düzeyde eksprese edildiği literatürde pek çok çalışmada tanımlanmıştır. Bu nedenle, cRGD peptidi taşıyıcı sistemin yönlendirilmesi amacıyla hedefleme ajanı olarak seçilmiştir. Sisteme hedefleme özelliği kazandırmak için, cRGD'nin C-terminalindeki serbest tiyol (-SH) grubu ile DSPE-PEG-Maleimid molekülündeki maleimid grubu arasında tiyoeter bağı oluşturan bir konjugasyon gerçekleştirilmiştir.

Lipit faz kolesterol, oktadesilamin (5:3) ve DSPE-PEG-Maleimid (fonksiyonel lipit) içerecek şekilde hazırlanmış ve sonra üzerine 1.6 mM BPEI içeren polimer faz yavaşça damla damla manyetik karıştırıcı altında eklenmiştir. DSPE-PEG-Maleimid oranı, tüm lipit içeriğinin 1:20'sini oluşturmaktadır. Sistem, ultra-turrax yöntemi kullanılarak homojenize edilmiştir. Böylece lipit ve polimer bileşenlerden oluşan LPH-GTS elde edilmiştir. DSPE-PEG-Maleimid ve cRGD peptiti 1:1 molar oranda karıştırılarak, 25 °C'de 150 rpm hızda 2-4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Konjugasyon sonrası sistemde serbest kalan peptitler ve küçük agregaların uzaklaştırılması amacıyla Amicon

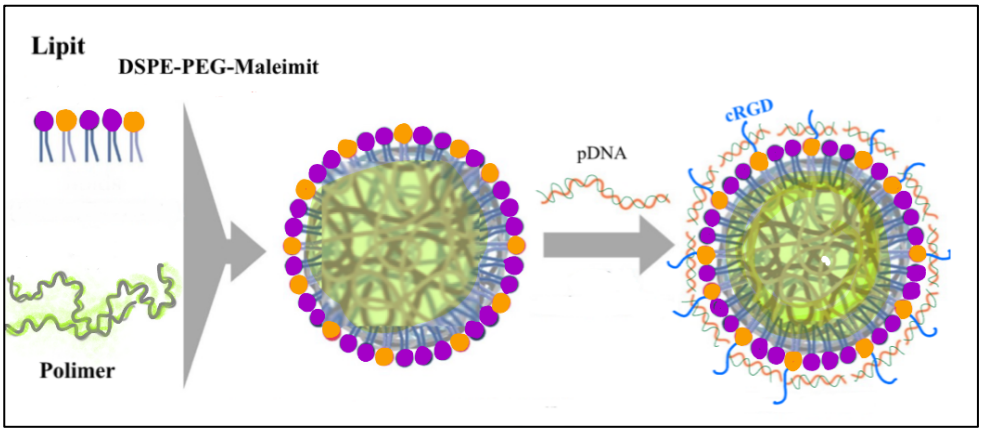
Ultra 100 kDa santrifüj filtreleri kullanılmış ve her örnek en az üç kez filtre edilerek saflaştırılmıştır. Organik fazın uçması için ağzı açık bekletilen sistem, 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen cRGD-modifiye taşıyıcı sistemler, pozitif yüzey yükleri sayesinde genetik materyal ile elektrostatik olarak etkileşerek kompleks oluşturmuştur. Farklı LPH-GTS:pDNA oranlarında yapılan inkübasyonlarla, gen taşıma kapasitesi optimize edilmiş hibrit kompleksler hazırlanmıştır. Bu yapılandırma sayesinde hem hedeflenebilirlik sağlanmış hem de gen yükünün taşıma süresince korunması mümkün olmuştur. Literatürde benzer stratejilerle hazırlanmış sistemlerin, gen stabilitesini artırdığı ve hedefleme etkinliğini güçlendirdiği gösterilmiştir (Zhang L. ve ark., 2015b; Mukherjee ve ark., 2019).



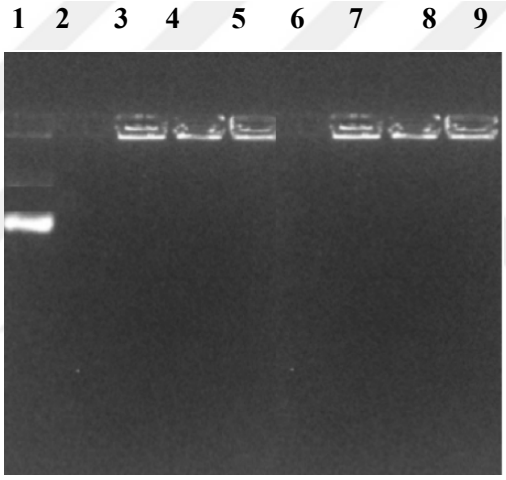
Şekil 4.7. Hedeflenebilir lipit polimer temelli hibrit sistemin hazırlanışı.

4.9. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin pDNA Komplekslerinin Oluşturulmasına Ait Bulgular

LPH-GTS ve LPH-GTS-cRGD gen taşıyıcı sistemler ile psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA ile oluşturulan komplekslerin agaroz jel elektroforezi sonucu elde edilen görüntüsü Şekil 4.9'de sunulmuştur. Yapılan analizlerde, 1:1 (h/h) oranı da dahil olmak üzere tüm oranlarda başarılı kompleks oluşumu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8. LPH-GTS-cRGD:pDNA komplekslerinin şeması.



Şekil 4.9. LPH-GTS ve LPH-GTS-cRGD ile psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid arasında kompleksleşme çalışmalarına ait agaroz jel elektroforez görüntüleri. Kuyucuklara yüklenen örnekler sırasıyla; 1: serbest pDNA, 2: LPH-GTS, 3: LPH-GTS:pDNA 1:1 h/h, ,4: LPH-GTS:pDNA 2:1 h/h ,5: LPH-GTS:pDNA 3:1 h/h hedeflenmemiş sistem için kompleks oluşumları, 6: LPH-GTS-cRGD 7: LPH-GTS-cRGD:pDNA 1:1 h/h,,8: LPH-GTS-cRGD:pDNA 2:1 h/h, 9: LPH-GTS-cRGD:pDNA 3:1 h/h kompleks oluşumları.

4.10. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

Zeta Sizer Nano ZS cihazı kullanılarak analiz edilen LPH-GTS (hedeflenmemiş), LPH-GTS-cRGD (hedeflenmiş), LPH-GTS-cRGD: psiRNA-VEGFA/VEGFR2 1:1 (h/h) oranındaki plazmid komplekslerinin ortalama partikül boyutu, yüzey yükü (zeta potansiyeli) ve boyut dağılımına ilişkin veriler Tablo 4.2.'de yer almaktadır.

Tablo 4.2. Hazırlanan sistemlerin partikül çapı, yüzey potansiyeli ve boyut dağılım verileri.

Gen Taşıyıcı Sistemler	Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)	Polidispersite Indeksi (PDI)
LPH-GTS	58.8±0.56	+23.5± 2.2	0.41
LPH-GTS-cRGD	19.40± 0.43	+22.8±1.60	0.25
LPH-GTS-cRGD: pDNA (1:1, h/h)	22.05±0.11	+14.6±1.06	0.22

4.11.Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

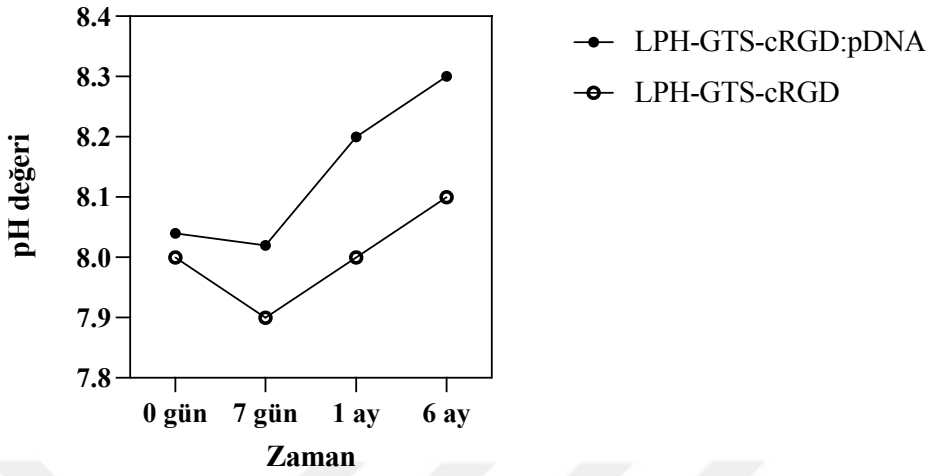
a. Gen taşıyıcı sistemin stabilitesi

Geliştirilen LPH-GTS-cRGD ve LPH-GTS-cRGD:pDNA'nın fiziksel stabilitesi, +4 °C (5°C± 3 °C) ve +25 °C (25°C ± 2 °C) sıcaklık koşullarında 6 aya kadar değerlendirilmiştir. Her iki koşulda da sistemin pH değeri, başlangıçta yaklaşık 8,0 olup; 7. gün, 1. ay ve 6. ay ölçümlerinde 8.0-8.3 aralığında seyretmiştir. Ölçülen bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ve gen taşıyıcı sistemin kimyasal stabilitesini koruduğunu göstermektedir. Makroskobik değerlendirmelerde, +4 °C'de saklanan örneklerde gen taşıyıcı sistemin rengi ve fiziksel görünümü stabil kalmış; herhangi bir çökelme, renk değişimi ya da faz ayrımı gözlenmemiştir. Benzer şekilde, +25 °C'de muhafaza edilen numunelerde de belirgin bir renk kayması veya opaklaşma oluşmamıştır. Süspansiyon her iki koşulda da fiziksel olarak homojen yapısını korumuştur. Bu bulgular, gen taşıyıcı sistemin düşük sıcaklıkta 1ay boyunca saklama koşullarına uygun olduğunu göstermektedir (Tablo 4.3., Şekil 4.10.).

Tablo 4.3. Gen taşıyıcı sistemlere ait +5°C ± 3 °C ve +25°C± 2 °C'de fiziksel stabilite bulguları.

+5 °C± 3 °C	Renk				Faz ayrımı				Fiziksel görünüm			
LPH-GTS-cRGD	0.gün	7.gün	1.ay	6.ay	0.gün	7.gün	1.ay	6.ay	0.gün	7.gün	1.ay	6.ay
	*	*	*	*	-	-	-	+	**	**	**	**
LPH-GTS-cRGD:pDNA	*	*	*	*	-	-	-	+	**	**	**	**
+25°C± 2 °C	Renk				Faz ayrımı				Fiziksel görünüm			
LPH-GTS-cRGD	0.gün	7.gün	1.ay	6.ay	0.gün	7.gün	1.ay	6.ay	0.gün	7.gün	1.ay	6.ay
	*	*	*	*	-	+	+	+	**	^	^	^
LPH-GTS-cRGD:pDNA	*	*	*	*	-	+	+	+	**	^	^	^

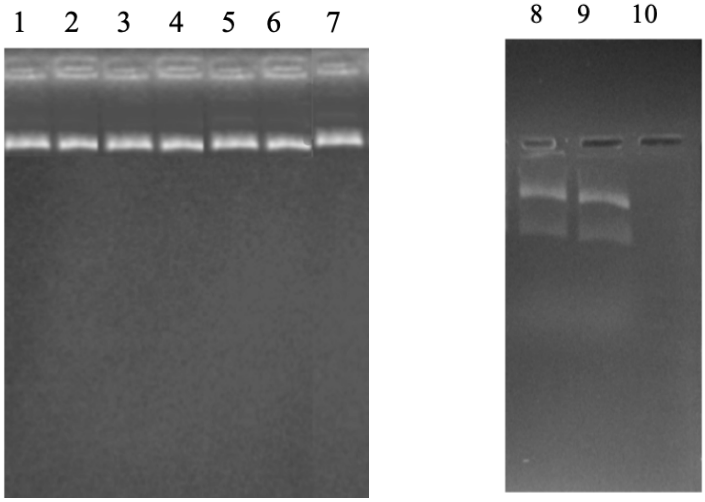
Tablo ifadeleri: şeffaf: *, akışkan**, süspansyon ^, yok -, var +



Şekil 4.10. pH değerleri.

b. Serum stabilite

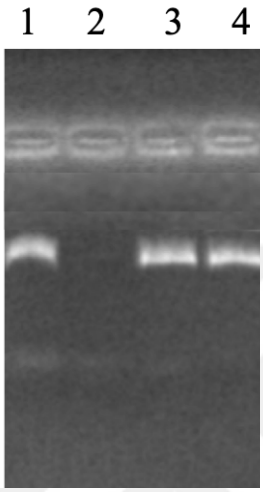
Hedeflenebilir özellikteki LPH-GTS-cRGD:pDNA ve hedeflenmemiş LPH-GTS:pDNA (1:1, h/h) komplekslerinin serum stabiliteleri 1, 3 ve 24 saate kadar inkübasyonda tutulup değerlendirilmiştir. Örnekler SDS ile pDNA'nın serbest hale gelmesiyle agaroz jelde gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Serumda inkübasyon yapılan örneklerin agaroz jel görüntüsü. Örnekler 0, 1, 3 ve 24 saat boyunca serum ile inkübasyona tabi tutulmuştur. Kuyucuklara yüklenen örnekelr sırasıyla; 1: 0.sa, 2: 1.sa, 3: 3.sa, 4: 24.sa LPH-GTS-cRGD: psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid (1:1, h/h) kompleksi, 5: 1.sa, 6: 3.sa, 7: 24.sa, LPH-GTS: psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid (1:1, h/h) kompleksi, 8: 1.sa, 9: 3.sa, 10: 24.sa çıplak pDNA).

c. ***Nükleaz stabilitesi (DNaz I stabilite) çalışmaları***

LPH-GTS:pDNA ve LPH-GTS-cRGD:pDNA komplekslerinin, pDNA'yı DNaz I enziminin degrade edici etkisine karşı koruma kapasitesini değerlendirilmiştir. DNaz I stabilite testine ait sonuçlar Şekil 4.12'de sunulmuştur.



Şekil 4.12. LPH-GTS:pDNA komplekslerinin DNaz I enzimi varlığında stabilitelerini gösteren agaroz jel fotoğrafı. Kuyucuklara yükleme sırası; 1: serbest pDNA, 2: DNaz I ile 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmış çıplak pDNA, 3: LPH-GTS-cRGD:pDNA 1:1 h/h, 4: LPH-GTS-cRGD:pDNA 1:1 h/h oranında oluşturulmuş komplekslerin DNaz I ile inkübasyonu.

d. Sodyum dodesil sülfat (SDS) salım çalışması

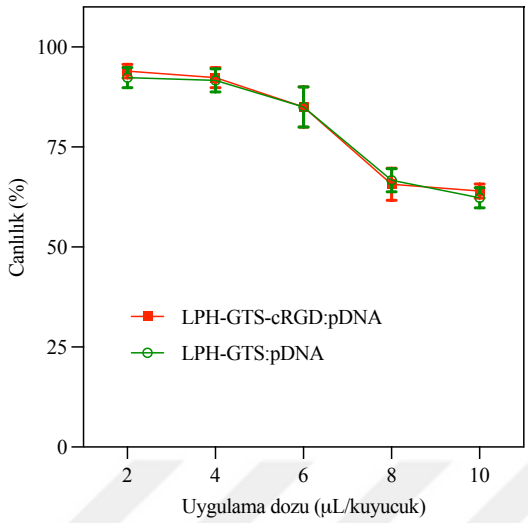
pDNA'nın serbest kalma potansiyelini değerlendirmek amacıyla her bir gen taşıyıcı sisteme SDS, son konsantrasyonu %1 (a/h) olacak şekilde eklenmiş ve karışım 2 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Ardından örnekler jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Elektroforez, %1 agaroz jel ortamında 80 V gerilim altında 100 dakika boyunca yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar, SDS ile işlem görmemiş serbest pDNA örneği ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve her bir grubun doğruluğu bu kontrol referansına göre analiz edilmiştir. Genetik materyalin serbestleşme potansiyelini ortaya koymak amacıyla gerçekleştirilen SDS ile muamele, LPH-GTS:pDNA ve LPH-GTS-cRGD:pDNA komplekslerinden pDNA'nın ayrılmasına neden olmuştur. Agaroz jel elektroforezi sonuçalrı Şekil 4.13.'te gösterilmiştir.



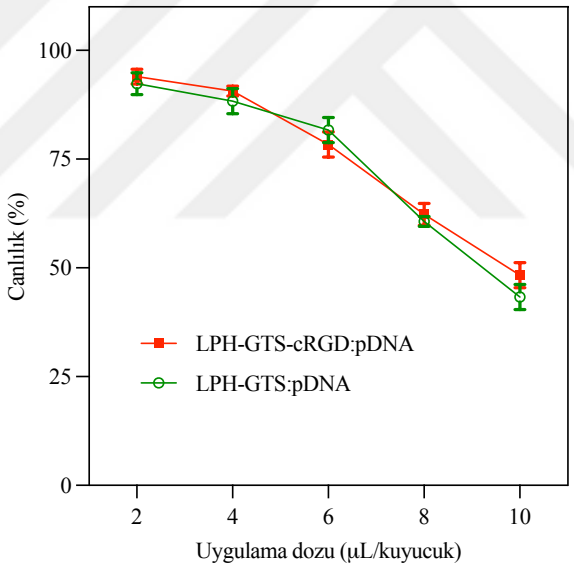
Şekil 4.13. LPH-GTS:pDNA komplekslelerinden SDS teşviki ile pDNA'nın serbest hale geçirilmesine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kuyucuklara yükleme sırası; 1: serbest pDNA, SDS ile muamele edilen kompleks örnekleri; sırasıyla 2: LPH-GTS: pDNA 1:1 h/h, 3: LPH-GTS-cRGD:pDNA 1:1 h/h oranında.

4.12. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin Sitotoksisite Bulguları

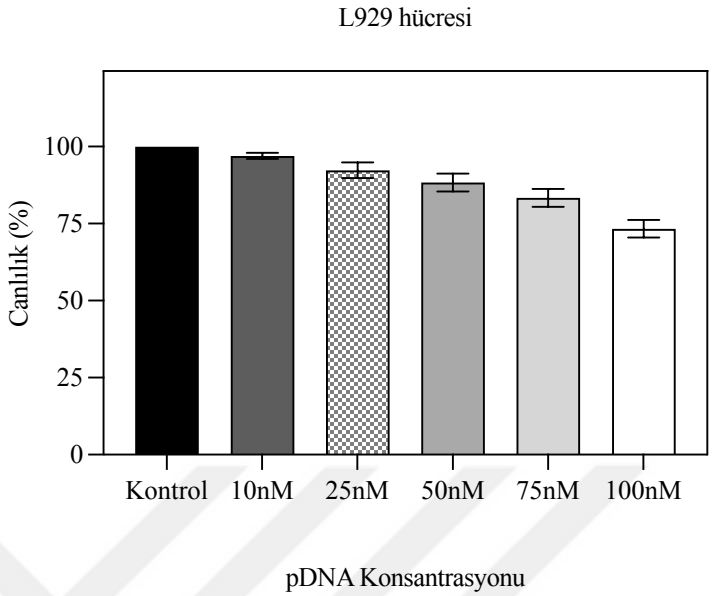
Gen taşıyıcı sistemlerin hücre düzeyinde güvenli kullanım aralığını belirlemek amacıyla, L929 (normal fibroblast) ve 4T1 (meme kanseri) hücre hatları üzerinde MTT hücre proliferasyon testi uygulanarak sitotoksisite değerlendirmeleri yapılmıştır. LPH-GTS ile LPH-GTS-cRGD:psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid taşıyan sistemlere ait deney sonuçları sırasıyla Şekil 4.4. ve Şekil 4.15.'te sunulmuştur. L929 hücreleriyle gerçekleştirilen analizlerde, tüm gen taşıyıcı sistemler için 2, 4 ve 6 µL/kuyucuk dozlarında hücre canlılığı %70'in üzerinde kalmıştır. Ancak 8 µL/kuyucuk uygulamasında bu eşik değerinin altına inildiği gözlemlenmiştir. Öte yandan, 4T1 hücreleri üzerinde yapılan incelemelerde, 2, 4, ve 6 µL/kuyucuk dozlarında hücre canlılığı %70'in üzerinde seyretmiş, 8 ve 10 µL/kuyucuk dozunda bu sınırın altına düşülmüştür.



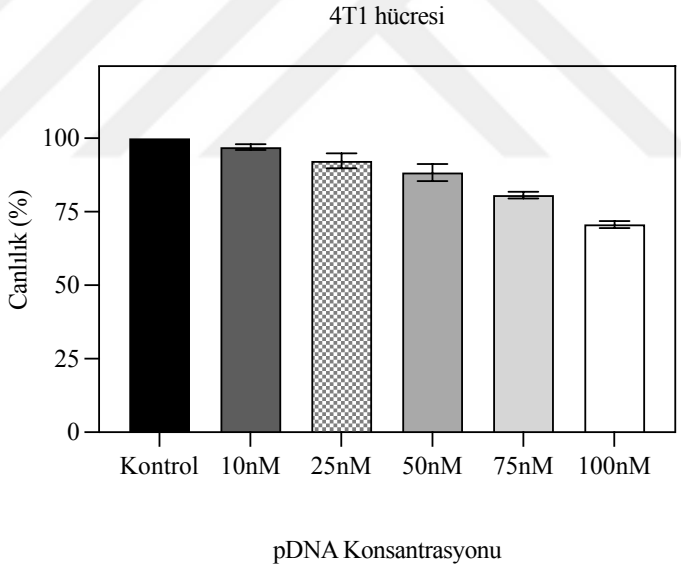
Şekil 4.14. L929 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarına ait bulgular.



Şekil 4.15. 4T1 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmalarına ait bulgular.



Şekil 4.16. L929 hücre hattı üzerinde pDNA konsantrasyon değişiminin sitotoksisite üzerine etkisi.

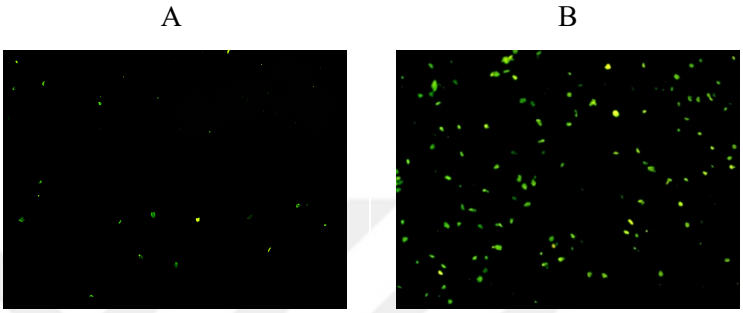


Şekil 4.17. 4T1 hücre hattı üzerinde pDNA konsantrasyon değişiminin sitotoksisite bulguları.

4.13. RGD Aracılı Hedefleme Etkinliğinin Kompetitif İnhibisyon ile Doğrulanması

LPH-GTS-cRGD:psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA kompleksinin RGD-bağımlı hedefleme özelliğini doğrulamak amacıyla kompetitif inhibisyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, kompleks uygulamasından 30 dakika önce 4T1 hücreleri 10 μM konsantrasyonunda serbest cRGD ile inkübe edilerek yüzeydeki integrin reseptörlerinin cRGD'ye doyması sağlanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından besiyeri değiştirilmiş ve LPH-GTS-cRGD:psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA

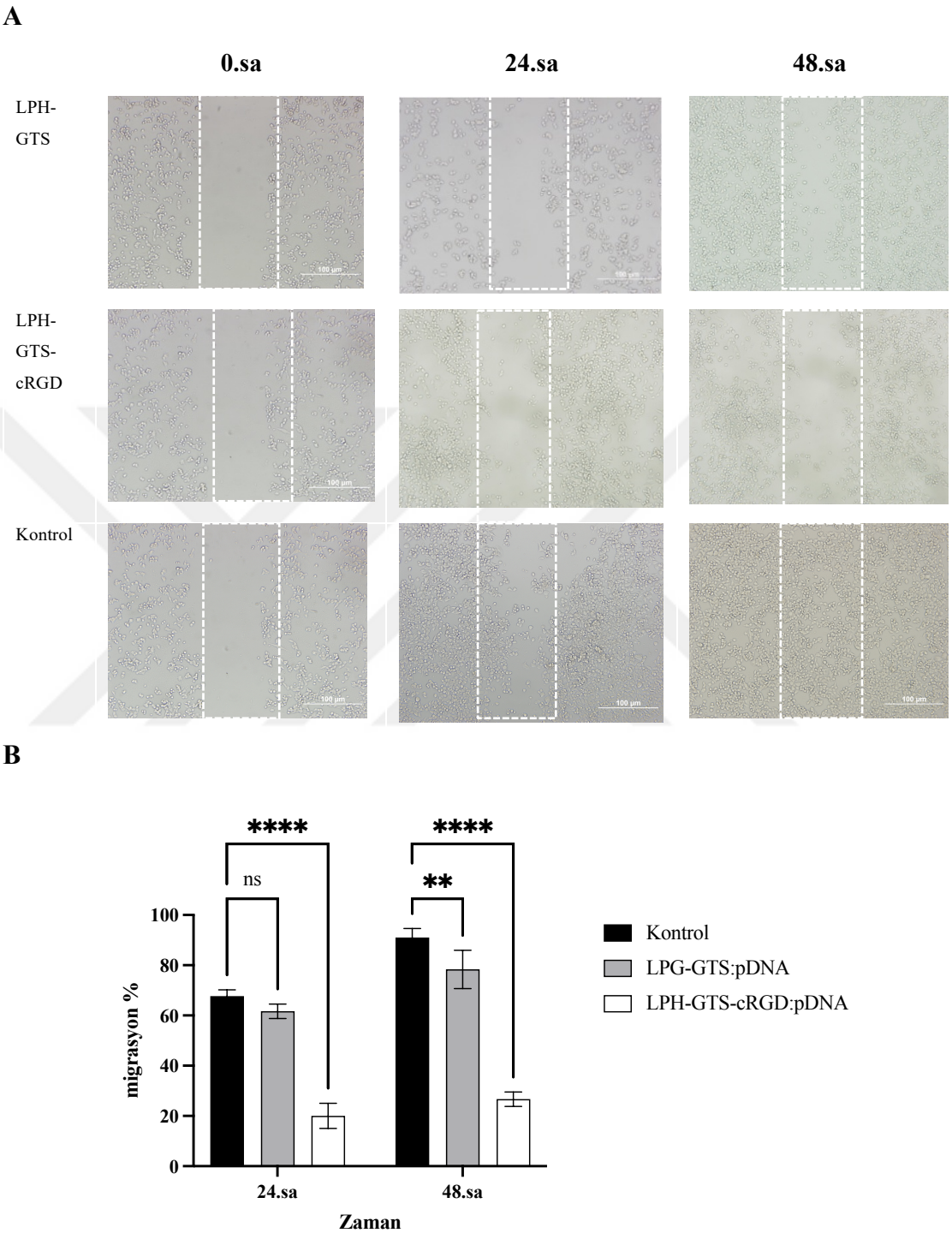
kompleksleri uygulanmıştır. Şekil 4.18.A'da, öncesinde cRGD ile muamele edilmiş hücrelere ait sonuçlar; Şekil 4.18.B'de ise cRGD uygulanmamış kontrol grubu sonuçları gösterilmektedir. Ön işlem olarak cRGD uygulanması, transfeksiyon veriminde azalmaya yol açmış olup, bu durum sistemin RGD-bağımlı hedefleme gerçekleştirdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.18. RGD'ye bağımlı transfeksiyon sonrası 4T1 hücrelerinin inverted floresan görüntüleri (10X). A: LPH-GTS-cRGD:psiRNA-VEGFA/VEGFR2 plazmid komplekslerinin uygulanmasından 30 dakika önce hücreler 10 μM serbest cRGD ile muamele edilmiştir. B: Serbest cRGD uygulanmadan sadece kompleksler ile muamele edilmiştir.

4.14. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin İnvazyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada, geliştirilen taşıyıcı sistemlerin tümör hücre invazyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla *in vitro* invazyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Deney grupları; hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistem, RGD ile hedeflenmiş gen taşıyıcı sistem ve negatif kontrol (herhangi bir gen taşıyıcı sistem uygulanmamış hücreler) olmak üzere üç gruptan oluşmuştur. Her grup için hücrelerin invazyon potansiyeli, belirli bir zaman dilimi sonunda mikroskobik görüntüleme ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda zamanla hücrelerin invazyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistem uygulanan grupta invazyonun belirli ölçüde azaldığı, ancak tamamen baskılanmadığı saptanmıştır. Buna karşılık, RGD ile hedeflenmiş gen taşıyıcı sistem uygulanan hücrelerde invazyonun anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür. Bu durum, RGD peptidi aracılığıyla αvβ3 integrin reseptörlerine spesifik bağlanma sayesinde taşıyıcı sistemin daha etkin şekilde hücre içine alındığını ve bu yolla invazyonu baskıladığını düşündürmektedir. Mikroskop görüntüleri, 4T1 meme kanseri hücrelerinde hedefli sistemin invazyonu inhibe etme potansiyelini ortaya koymuştur.



Şekil 4.19. İnvazyon deneyine ait bulgular. (A) Mikroskop görüntüleri (10X) ve (B) migrasyon % grafiği.

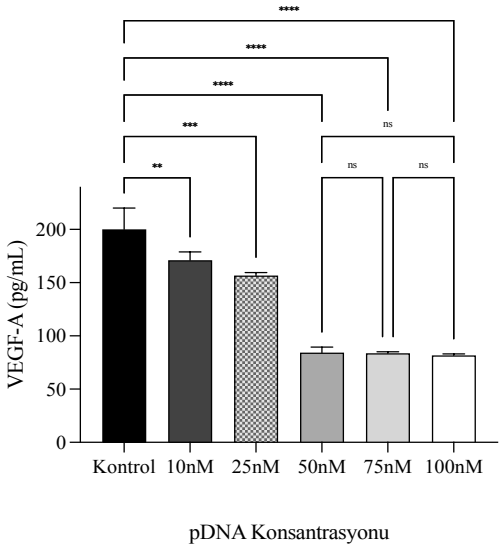
4.15. Hedeflenebilir Lipit Polimer Hibrit Taşıyıcı Sistemlerin *In vitro* Gen Susturma Etkinliğinin Protein Düzeyinde Değerlendirilmesi

Geliştirilen RGD ile hedeflendirilmiş LPH-GTS VEGF-A gen ekspresyonunu baskılama potansiyelini değerlendirmek amacıyla 4T1 meme kanseri hücreleri üzerinde *in vitro*

ELISA analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, taşıyıcı sistemlere farklı konsantrasyonlarda yüklenmiş pDNA (10, 25, 50, 75 ve 100 nM) ile transfekte edilen hücrelerde, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre süpernatanında VEGF-A düzeyleri kantitatif olarak ölçülmüştür.

Elde edilen bulgular, tüm pDNA konsantrasyonlarında VEGF-A ekspresyonunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde bir azalma meydana geldiğini göstermiştir. Bu durum, geliştirilen taşıyıcı sistemin etkin şekilde gen taşıyabildiğini ve hedeflenen genin ifadesini baskılayabildiğini ortaya koymuştur.

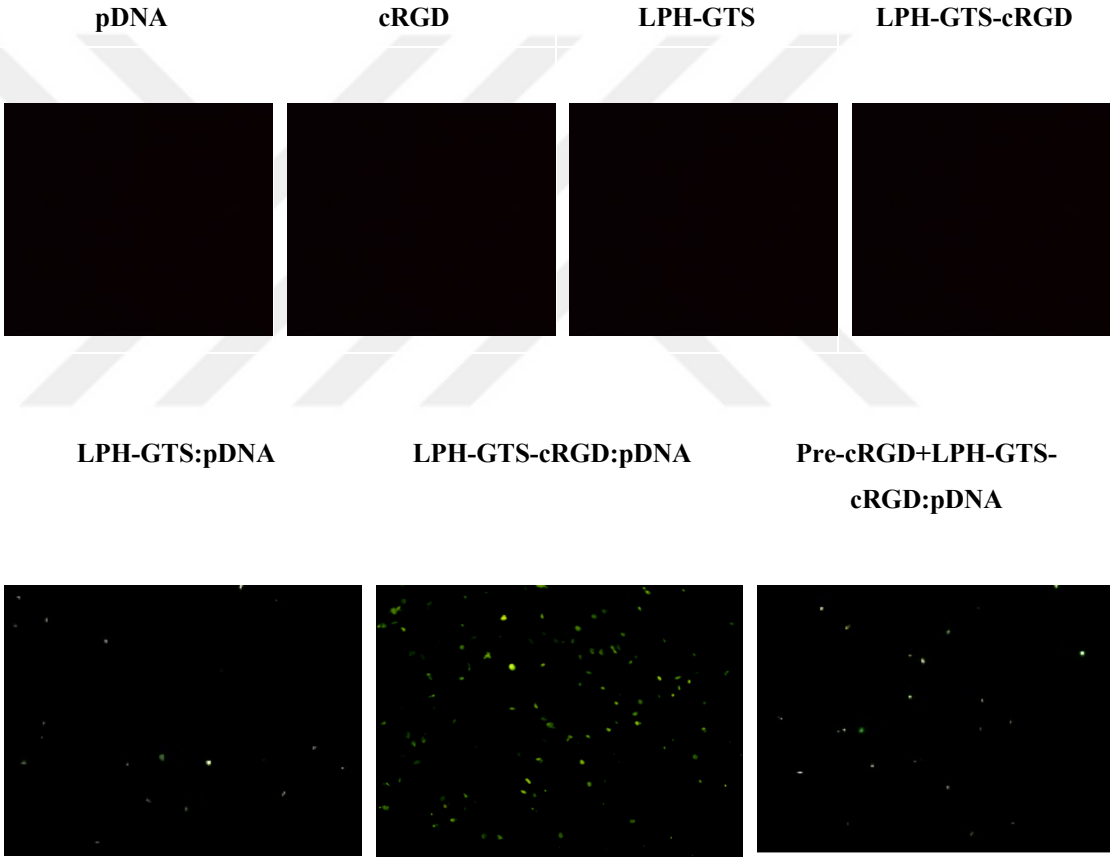
En dikkat çekici sonuç ise, 50 nM pDNA konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Bu konsantrasyonda VEGF-A düzeyinde en belirgin düşüş saptanmış, hem daha düşük hem de daha yüksek konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında maksimum gen susturma etkinliği 50 nM pDNA konsantrasyonu ile gözlemlenmiştir. 10 ve 25 nM gibi düşük konsantrasyonlarda etkinin nispeten azaldığı, 75 ve 100 nM gibi daha yüksek konsantrasyonlarda ise gen susturma etkisinin plato seviyesine ulaştığı veya hafifçe azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, gen ekspresyonunun doza bağımlı olarak azaldığını, ancak optimum etkinin belirli bir aralıkta (50 nM) elde edildiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.20. *In vitro* ELISA deney sonuçları.

4.16.RGD Bağımlı Hedeflemenin Gösterilmesi

cRGD bağımlı hedefleme özelliğinin gösterilmesi amacıyla kompetitif inhibisyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilecek transfeksiyondan önce kuyucuklara 10 µM konsantrasyonunda serbest cRGD uygulanarak yüzeyinde bulunan integrin reseptörlerinin cRGD'ye doyması sağlanmıştır. 30 dakikalık cRGD inkübasyonunun ardından besiyeri değiştirilerek LPH-GTS-cRGD:psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA (1:1, h/h) ile transfeksiyon gerçekleştirilmiş ve 48 saat sonra gen susturma etkinliği değerlendirilmiştir (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Transfeksiyon sonrası floresan görüntüleri (inverted floresan mikroskop, 10X).

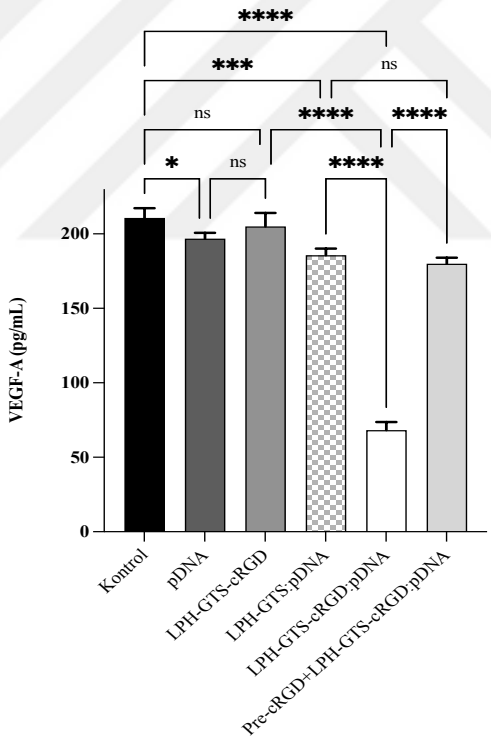
4.17. *In vitro* ELISA Deney Sonuçları

4T1 hücrelerinde gerçekleştirilen *in vitro* ELISA deneyinde, VEGF-A gen ifadesi üzerindeki baskılayıcı etkinin değerlendirilmesi amacıyla farklı uygulama grupları karşılaştırılmıştır. Deneyde yer alan gruplar: negatif kontrol (herhangi bir uygulama yapılmamış hücreler), yalnızca pDNA uygulanan grup, LPH-GTS-cRGD taşıyıcı sistemle oluşturulmuş LPH-GTS-cRGD:pDNA (hedeflenmiş gen taşıyıcı sistem), ve

hedefli sistemin uygulanmasından önce hücrelerin serbest cRGD peptidi ile muamele edildiği grup (rekabet inhibitörü kontrolü) şeklindedir.

Elde edilen sonuçlara göre; sadece pDNA uygulanan grupta VEGF-A ekspresyonunda sınırlı bir azalma gözlenirken, LPH-GTS-cRGD taşıyıcı sistemle uygulanan hedeflenmiş gen taşıyıcı sistem VEGF-A düzeyinde anlamlı bir azalma meydana gelmemiştir.

Buna karşılık, hücrelere önceden serbest cRGD uygulanarak hedefleme reseptörleri bloke edilen grupta, hedefli sistemin ardından uygulanan tedavide VEGF-A düzeyinin yeniden yükseldiği gözlenmiştir. Bu bulgu, taşıyıcı sistemin αvβ3 integrin aracılı hücre hedeflemesine dayalı bir mekanizma ile çalıştığını ve cRGD aracılığıyla gerçekleşen hedeflemenin, gen susturma etkinliği açısından kritik olduğunu desteklemektedir (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. 4T1 hücrelerinde VEGF-A ekspresyon düzeyi.

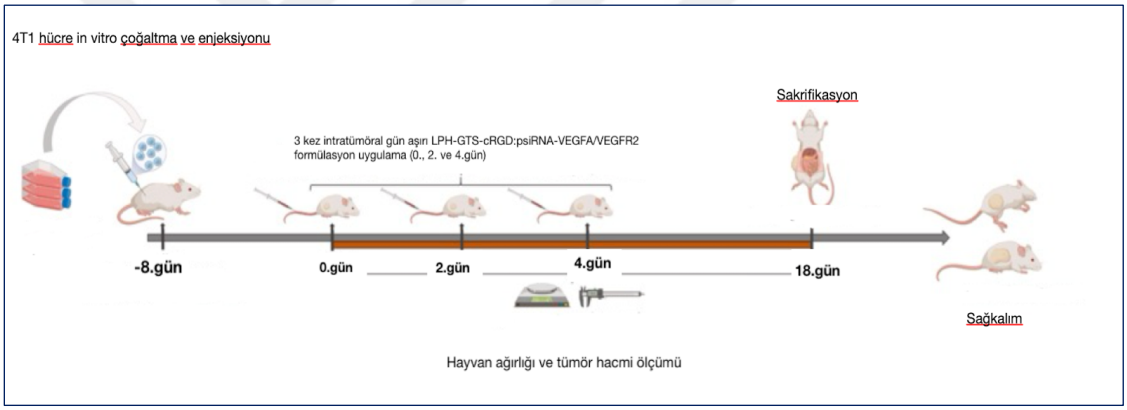
4.18. *In vivo* Çalışmalar

Çalışmada, 4T1 hücreleri ile oluşturulmuş tümör modeli üzerinde geliştirilen hedeflenmiş gen taşıyıcı sistemin anti-VEGF tedavi etkinliği değerlendirilmiştir. Deney hayvanları altı farklı gruba ayrılmış ve her grup farklı bir tedavi protokolüne tabi tutulmuştur. Kontrol grubu (TM), herhangi bir enjeksiyon uygulanmamış tümörlü hayvanlardan oluşurken; sham grubuna (TM+PBS) sadece PBS enjeksiyonu yapılmıştır.

TM+pDNA grubuna yalnızca pDNA uygulanırken, TM+LPH-GTS-cRGD grubuna boş taşıyıcı sistem verilmiştir. Hedeflenmemiş sistemle pDNA taşıyan TM+LPH-GTS:pDNA grubu ile hedeflenmiş sistemle pDNA taşıyan TM+LPH-GTS-cRGD:pDNA grubu karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

In vivo çalışma tasarımı aşağıda gösterilmiştir.

1) Tümör grubu (sadece tümör enjekte edilmiş kontrol grubu, TM)
2) PBS enjekte edilen grup (sham grubu, TM+ PBS)
3) pDNA uygulanan grup (TM+pDNA)
4) Taşıyıcı sistem uygulanan grup (TM+ LPH-GTS-cRGD)
5) Hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistem (TM+ LPH-GTS:pDNA)
6) Hedeflenmiş gen taşıyıcı sistem (TM+ LPH-GTS-cRGD:pDNA)

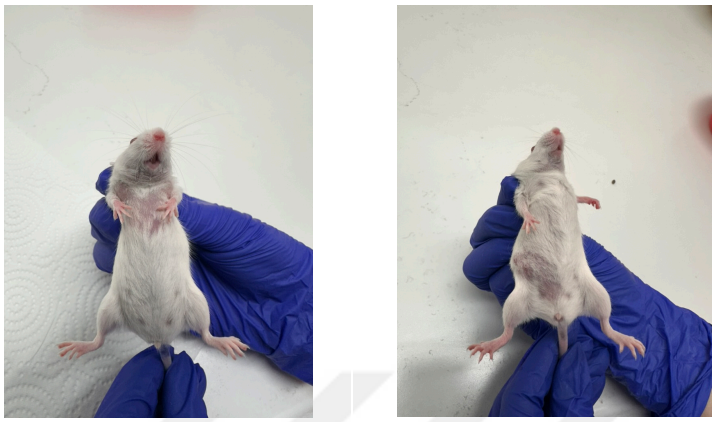


Şekil 4.23. *In vivo* çalışma dizaynı.

4.19. Primer Tümörlerde Hücre Proliferasyonuna Bağlı Büyüme Hızındaki Değişimlerin İncelenmesi

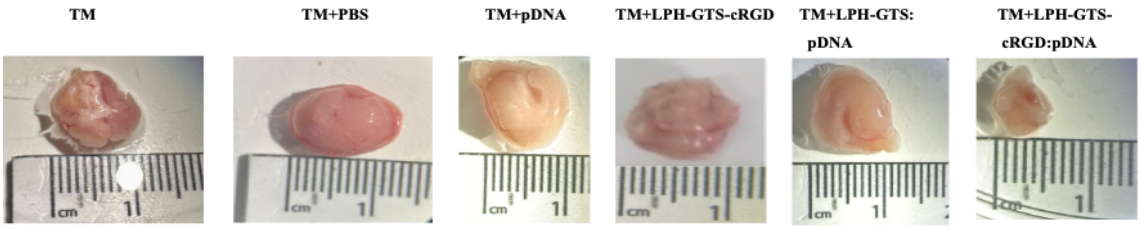
Tümör hacmi ölçümleri sonucunda, kontrol ve PBS gruplarında tümör progresyonunun hızlı bir şekilde devam ettiği gözlemlenmiştir. Sadece pDNA uygulanan grupta tümör büyümesinde sınırlı düzeyde yavaşlama kaydedilmiştir. Boş taşıyıcı sistem uygulanan grupta da anlamlı bir tümör inhibisyonu izlenmemiştir. Buna karşılık, pDNA yüklü gen taşıyıcı sistem uygulanan gruplarda tümör büyümesinde belirgin azalma gözlenmiştir. Özellikle hedeflenmiş gen taşıyıcı sistemle (TM+LPH-GTS-cRGD:pDNA) tedavi edilen grupta hem tümör hacminde hem de ağırlığında anlamlı düzeyde düşüş tespit edilmiştir. Hedefleme yapılmayan gen taşıyıcı sistem etkinliği ise sınırlı kalmış, ancak boş taşıyıcıya ve pDNA'ya göre daha etkili bulunmuştur. Bu sonuçlar, geliştirilen RGD hedefli LPH-GTS sisteminin *in vivo* ortamda etkin bir şekilde tümör bölgesine ulaştığını

ve VEGF-A ekspresyonunu baskılayarak tümör büyümesini anlamlı düzeyde inhibe ettiğini göstermektedir.

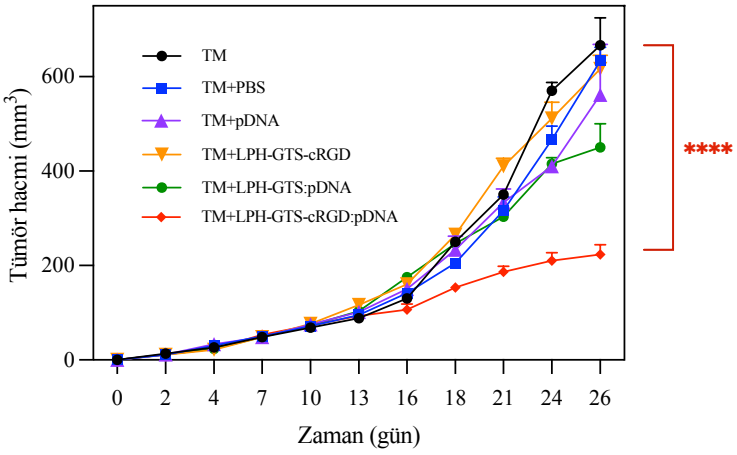


Model oluşturulmadan önce Model oluşturulduktan sonra

Şekil 4.24. Meme kanseri modeli oluşturulan hayvan fotoğrafı şekilde gösterilmiştir.



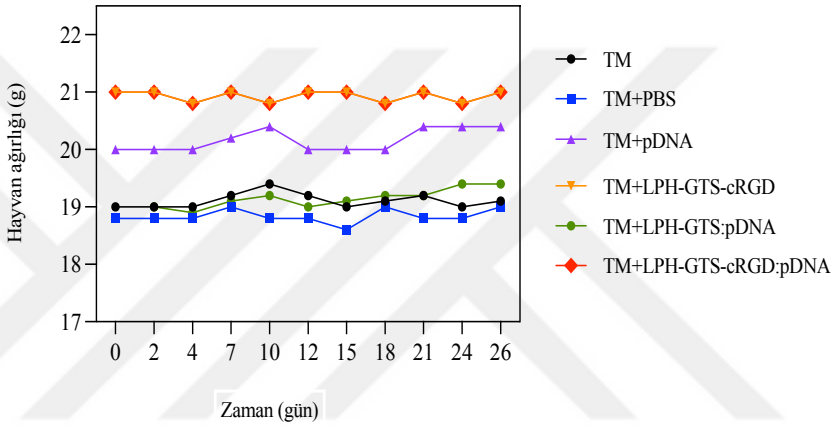
Şekil 4.25. Çıkarılan primer tümörlerin görüntüleri.



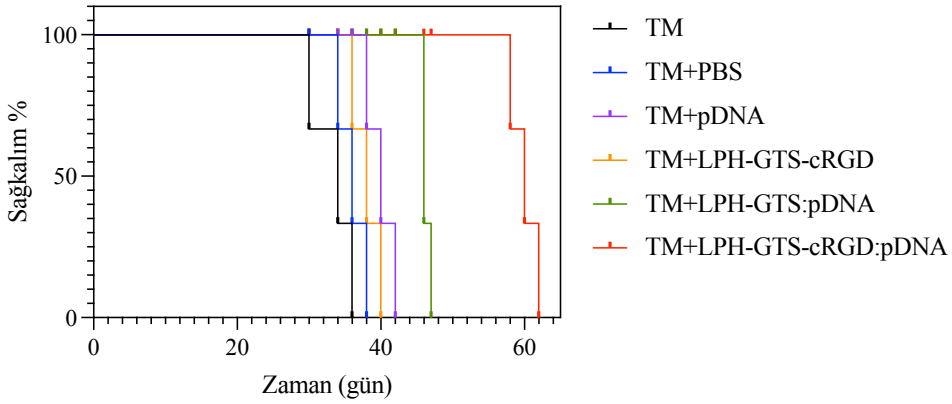
Şekil 4.26. Tümör hacmindeki değişim grafiği.

4.20. Hayvan Ağırlıklarının Takibi

Tedavi öncesi ve süresince hayvanların vücut ağırlıkları düzenli aralıklarla takip edilmiştir. Ağırlık ölçümleri, olası sistemik toksisite ve tedavilerin genel sağlık durumu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma grupları arasında genel olarak hayvan ağırlıkları benzer bir seyir izlemiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu bulgular, uygulanan tedavi protokollerinin hayvanların genel sağlığını olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.27. Tedavi süresince ve sakrifikasyona kadar geçen süre boyunca hayvanların vücut ağırlıklarının (gram cinsinden) ölçüm grafiği.



Şekil 4.28. Sağkalım analiz grafiği.

4.21.Primer Tümör Kitlelerinin Ağırlık Bulgularının Değerlendirilmesi

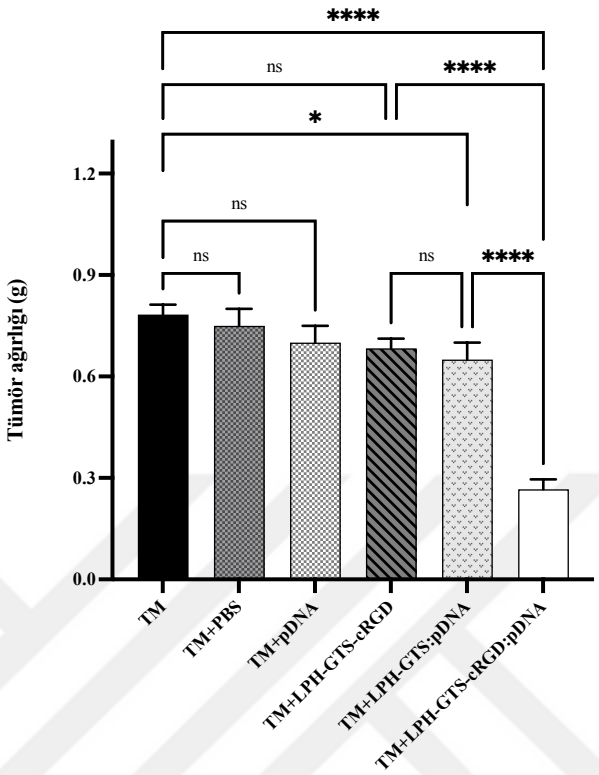
Sakrifikasyon sonrası elde edilen primer tümör kitlelerinin ağırlıkları karşılaştırıldığında, hem hedeflenmemiş (LPH-GTS:pDNA) hem de hedeflenmiş (LPH-GTS-cRGD:pDNA) gen taşıyıcı sistem uygulanan gruplarda tümör ağırlıklarında azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalmanın, hedeflenmiş sistem uygulanan grupta çok daha

belirgin olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gerçekleştiği tespit edilmiştir (*p<0,001).

Tedavi protokolü, tümör çaplarının hedef değerlere ulaştığı 8. günde başlatılmıştır. Bu tarihten itibaren, hayvanlarda düzenli aralıklarla yapılan tümör çapı ölçümleri ile hacimsel değişim takip edilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, tümör hacimlerindeki değişim zamana karşı grafiklendirilmiş ve tedavi etkinliği değerlendirilmiştir (Şekil 4.26.). Kontrol ve PBS gruplarında tümör büyümesinin hızlı bir şekilde ilerlediği görülürken, tedavi uygulanan gruplarda bu artışın belirgin şekilde yavaşladığı saptanmıştır.

Özellikle RGD hedefli gen taşıyıcı sistem uygulanan grupta, 26. gün sonunda hem tümör hacmi hem de tümör ağırlığında anlamlı düzeyde düşüş meydana gelmiştir **(**p<0,01). Tümör ağırlıklarındaki yüzdesel değişim analiz edildiğinde, hedeflenmiş gen taşıyıcı sistem grubunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde tümör büyümesini baskıladığı belirlenmiştir (***p<0,001).

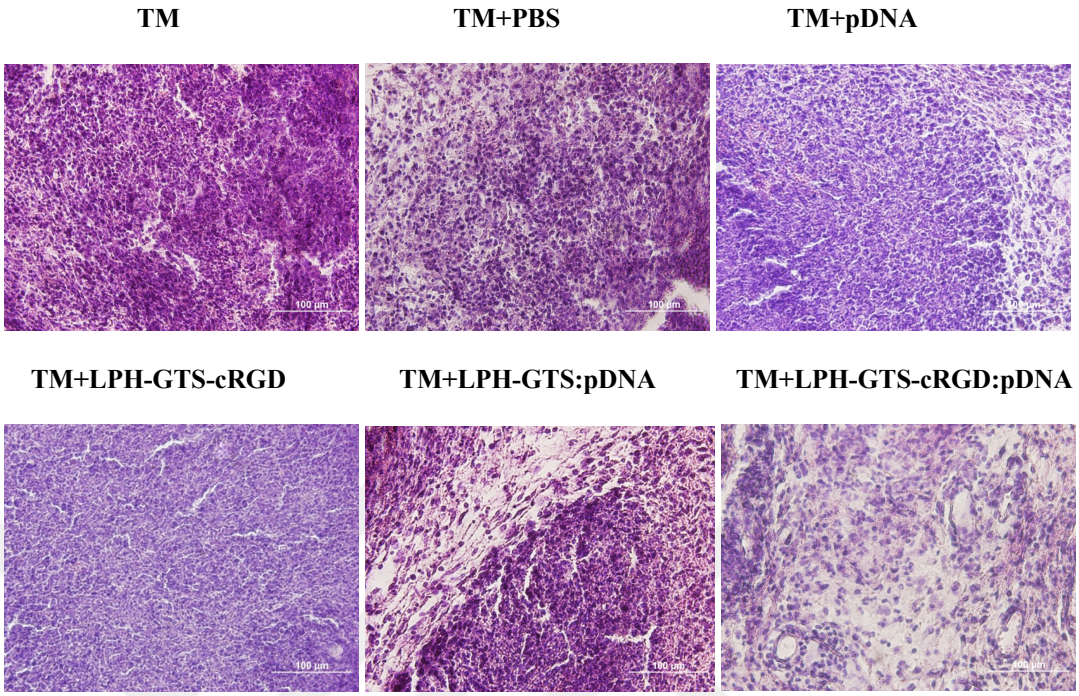
Ayrıca, tedavi grupları (yalnızca pDNA) ve taşıyıcı sistem içerisinde pDNA taşıyan gen taşıyıcı sistemler olarak iki temel grupta karşılaştırılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda, gen taşıyıcı sistemler içinde pDNA taşıyan grupların, diğer gruplara kıyasla daha etkin olduğu görülmüş, özellikle hedefleme ile kombine edilen sistemin terapötik etkinliğinin arttığı ortaya konmuştur.



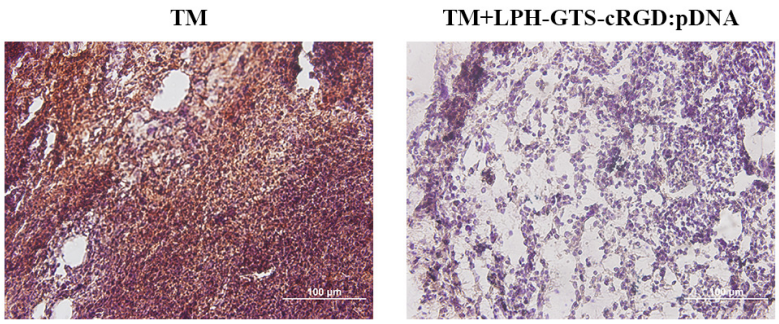
Şekil 4.29. Tümör ağırlığı değişim grafiği.

4.22. Primer Tümör Dokularının İmmünohistokimyasal Görüntülemesi

Primer tümör dokularında yapılan immünohistokimyasal incelemeler kapsamında, doku gömme ve kesit alma işlemlerinin ardından H&E boyama yöntemi uygulanmış ve tümör morfolojisini gösteren görüntüler elde edilmiştir. Bu incelemeler, tümör modeli oluşturulan ve farklı tedavi gruplarına ait dokularda gerçekleştirilmiştir. Beklenen olarak, RGD peptidiyle hedeflenmiş gen taşıyıcı sistemin uygulandığı grupta tümör hücre yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. Buna karşın, kontrol ve hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistem gruplarında ise tümör hücre yoğunluğunun daha yüksek olduğu ve doku bütünlüğünün daha korunmuş olduğu belirlenmiştir. 4T1 tümör modeli oluşturulan ve farklı tedavi gruplarına ait primer tümör dokularının H&E boyama ile elde edilen kesit görüntüleri verilmiştir. Görseller, tümör morfolojisini ve tedaviye yanıtı göstermektedir.



Şekil 4.30. Tümör modeli oluşturulan ve farklı gruplara ait primer tümör dokularının hematoksilen eosin (H&E) boyama ile elde edilen kesit görüntüleri.

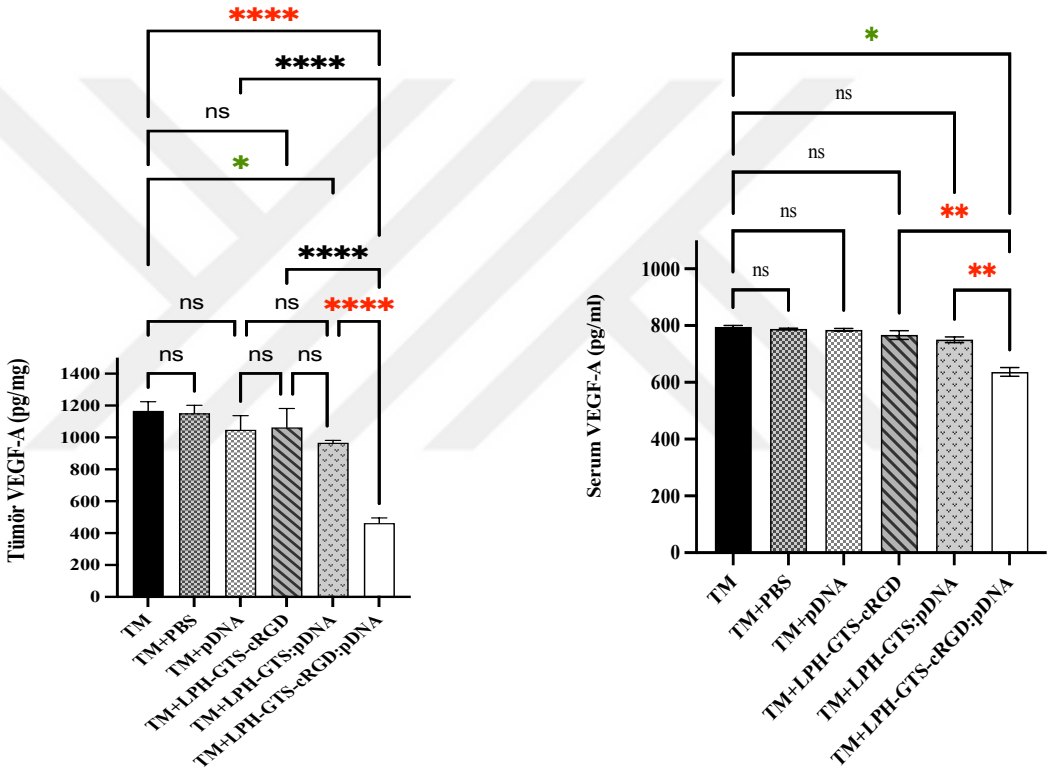


Şekil 4.31. TM ve TM+LPH-GTS-cRGD:pDNA gruplarına ait tümör dokularının Ki-67 immünohistokimyasal boyama görüntüleri.

4.23. Gen Susturma Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

In vivo gen susturma etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla, 4T1 tümör modeli oluşturulan BALB/c farelerde hem tümör meme dokusu hem de kan serumunda VEGF-A düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak kantitatif olarak analiz edilmiştir. 26. gün sonunda elde edilen veriler, gruplar arası karşılaştırmalar yapılarak grafik üzerinde ortalama ± standart sapma (SD) değerleri ve istatistiksel anlamlılık düzeyleriyle birlikte sunulmuştur. 4T1 tümör modeli kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, RGD peptidiyle hedeflenmiş gen taşıyıcı sistemin (LPH-GTS-cRGD:pDNA) VEGF-A ekspresyon

düzeylerini anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistem (LPH-GTS:pDNA) da VEGF-A ekspresyonunu düşürmüş, ancak hedeflenmiş gen taşıyıcı sistem kadar etkili olmamıştır. pDNA, taşıyıcı sistem ve PBS enjeksiyonları uygulanan gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu azalma özellikle tümör dokusunda dramatik bir şekilde izlenirken, serumdaki düşüş daha sınırlı kalmıştır. Bu durum, yapılan intratümöral uygulama nedeniyle lokal etkinin belirgin olduğunu, ancak sistemik etkinin sınırlı düzeyde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.32. Tümör meme doku örneklerinde ve kan serumlarında ELISA deneyine göre VEGF-A düzeyleri (pg/mg protein, pg/mL) verilmiştir. Çubuklar, ortalama ± standart sapma (SD) değerlerini temsil eden hata çubukları ile gösterilmiştir (n=5). İstatistiksel anlamlılık: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler ve polimer/lipit kombinasyonu ile tek basamakta hazırlanan lipit-polimer temelli hibrit taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Literatürde, bu tür hibrit sistemlerin lipitlerin biyouyumluluğunu, polimerlerin kontrollü salım ve gen koruma yetenekleri ile birleştirdiği belirtilmektedir (Patel S. ve ark., 2020). Bu bağlamda LPH-GTS geliştirilmesi süreci, önformülasyon deneyleriyle sistematik şekilde başlatılmıştır. İlk aşamada farklı lipit oranları (%3, %4 ve %5) ve lipit tipleri (Precirol, Compritol 888, Compritol HD ve oktadesilamin+kolesterol-PEG) denenmiştir. Bu çeşitlilik hem partikül boyutunu optimize etmek hem de gen taşıma potansiyelini artırmak açısından önemlidir. Literatürde, lipitlerin (Precirol, Compritol) partikül stabilitesini sağlama konusunda etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak bazı durumlarda istenilen büyüklükte partiküller oluşturmakta yetersiz kaldığı belirtilmiştir (Mardhiah Adib ve ark., 2016). Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde, Precirol ve Compritol varyantlarının partikül boyutlarının hedef aralığın üzerinde kaldığı, buna karşın oktadesilamin ve kolesterol-PEG içeren kombinasyonların, partikül boyutunu 100 nm altına düşürmede daha etkili olduğu bulunmuştur. Oktadesilamin ve kolesterol-PEG lipit içeriği önformülasyonlarla %4 oranında optimize edilmiştir.

Bu yapı üzerine fonksiyonel lipit olarak DSPE-PEG-Maleimid eklenerek nihai sistemin hazırlanmasına geçilmiştir. DSPE-PEG-Maleimidin yapısında bulunan maleimid grubunun tiyol grubu ile spesifik bağ kurabilme yeteneği, sistemin hedeflenebilirliğini artırmak amacıyla cRGD peptidi ile konjugasyonuna olanak sağlamıştır. RGD peptidinin bu şekilde sistemin yüzeyine yönlendirilmesi, ÜNMK hücrelerinde aşırı eksprese edilen αvβ3 integrin reseptörüne yüksek afinitesiyle bağlanarak hedefli gen aktarımı yapılmasına olanak tanımaktadır (Rangger ve ark., 2012).

Polimer faz olarak, genetik materyalle kompleks oluşturma kapasitesi literatürde yaygın olarak vurgulanan avantajları nedeniyle BPEI seçilmiştir. Ancak BPEI yüksek

konsantrasyonlarda toksisiteye neden olabilir. Bu toksisite yüzey modifikasyonuyla ya da lipit fazı ile kullanımla azaltılabilir (Zhao C. ve ark., 2022). Bu çalışmada BPEI'nin lipit faz ile birleştirilerek hibrit bir sistem oluşturulması hem gen bağlama kapasitesinden hem de lipitlerin sağladığı biyouyumluluktan faydalanmayı mümkün kılmıştır.

Geliştirilen hibrit taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal karakterizasyonu, sistemin biyolojik performansını belirlemede kritik bir basamaktır. Bu çalışmada yapılan DLS analizleri sonucunda, hedeflenmemiş taşıyıcı sistemin ortalama partikül boyutu 58.8 ±0.56 nm, zeta potansiyeli +23.5±2.2 mV ve PDI değeri 0.41 olarak saptanmıştır. Literatürde, gen taşıyıcı sistemlerin PDI değerinin 0.5'in ne kadar altında olursa o kadar homojen kabul edildiği bildirilmiştir (Simpson ve ark., 2024). Hedefleme amacıyla RGD peptidi eklenen taşıyıcı sistemde ise partikül boyutunun 19.40±0.43 nm'ye, zeta potansiyelinin +22.8±1.60 mV'ye düşmesi, sistemin daha kompakt ve stabil bir forma dönüştüğünü göstermektedir. PDI değerinin 0.25 olması da bu yapının homojen dağılım gösterdiğini desteklemektedir. Literatürde, hedefli sistemlerin genellikle daha küçük boyutlara sahip olduğu ve bu durumun hücre membranı ile etkileşimini artırarak endositozu kolaylaştırdığı vurgulanmıştır (Mathew ve ark., 2020; Algarra ve ark., 2024). Ayrıca, pozitif zeta potansiyelin +20 mV üzeri olduğu sistemlerde hücre içine alımın belirgin şekilde arttığı ve gen taşıma kapasitesinin de yükseldiği gösterilmiştir (Nemeth ve ark., 2022). psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA ile kompleks haline getirilen nihai gen taşıyıcı sistemin partikül boyutu 22.05±0.11 nm, zeta potansiyeli +14.6± 1.06 mV ve PDI değeri 0.22 olarak ölçülmüştür. Gen yüklendikten sonra boyutun küçülmesi, genetik materyalin taşıyıcı sistem tarafından kompakt bir şekilde sarıldığını göstermektedir. Bu bulgu, genetik materyalin etkili şekilde enkapsüle edilmesinin partikül boyutunu düşürebileceğini bildiren çalışmalarla uyumludur (Nayerossadat ve ark., 2012; Silva ve ark., 2012; Bono ve ark., 2020). Ayrıca, PDI değerinin hedeflenmiş sistemle benzer düzeyde olması, kompleksin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve taşıyıcı sistemin genetik yük altında da kararlı kaldığını göstermektedir. Bu değerler, hem kompakt bir yapı oluştuğunu hem de sistemin genetik materyali başarıyla kompleksleştirerek stabil şekilde taşıyabildiğini göstermektedir. Ayrıca, düşük PDI değeri gen taşıyıcı sistemin dağılım homojenliğini desteklemektedir. Küçük boyutlu ve yüzeyi pozitif yüklü

partiküller, hem hücreye girişte hem de genetik materyalin sitoplazmaya aktarımında etkin rol oynamaktadır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, geliştirilen sistemin hem hedefleme öncesinde hem de sonrasında uygun boyut, yük ve dağılım özelliklerine sahip olduğu, ayrıca genetik materyal eklendiğinde de bu özelliklerini koruduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, sistemin gen taşıma etkinliği ve biyolojik uygulamalar için uygun bir aday olduğunu desteklemektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, karakterizasyon bulguları sistemin *in vitro* ve *in vivo* uygulamalar için uygun boyut, yüzey yükü ve homojenite değerlerine sahip olduğunu göstermekte; literatürde tanımlanan ideal nanopartikül özelliklerini büyük ölçüde sağladığını ortaya koymaktadır (Al-Dosari ve ark., 2009; Templeton ve ark., 2011).

Gen taşıyıcı sistemlerin raf ve biyolojik ortam stabilitesi, ilaç taşıyıcı sistemlerin klinik başarıları açısından belirleyici faktörlerden biridir. Bu çalışmada geliştirilen lipit polimer temelli hibrit gen taşıyıcı sistem, farklı koşullarda yapılan stabilite testleri ile değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı stabilite çalışmaları 5±3 °C'de ve hızlandırılmış stabilite testleri 25±2 °C'de gerçekleştirilmiştir. 5±3 °C'de sistemin fiziksel parametrelerde anlamlı bir değişiklik gözlenmemesi, bu sıcaklığın sistemin raf ömrü açısından uygun olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, düşük sıcaklıklarda saklanan nanopartikül sistemlerinin fiziksel bütünlüklerini daha uzun süre koruyabileceğini ifade eden literatürle uyumludur (Shtykalova ve ark., 2023). Serum stabilite çalışmaları sonucunda ise, %10 FBS içeren ortamda 1, 3 ve 24 saatlik inkübasyon süreleri boyunca gen taşıyıcı sistemin psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'yı başarılı şekilde koruduğu gösterilmiştir. Nükleik asidin enzimatik yıkıma uğramadan sistemde tutulması, taşıyıcının genetik materyali etkili şekilde koruyabildiği ve biyolojik sıvılarda çözünmeden stabil kalabildiğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, benzer gen taşıyıcı sistemlerin serumda birkaç saat boyunca stabil kaldığını bildiren çalışmalarla paralellik göstermektedir (Li L. ve ark., 2018). Bunun yanısıra DNaz I içeren ortamda yapılan enzimatik bozunma testlerinde, geliştirilen sistemin psiRNA-VEGFA/VEGFR2 pDNA'yı koruduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, sistemin sadece serum proteinlerine karşı değil, aynı zamanda spesifik nükleazlara karşı da direnç gösterebildiğini ortaya koymuştur. Nükleaz stabilitesi, özellikle sistemin hücre dışı ortamlarda taşıma

kapasitesini koruyabilmesi açısından önemlidir. Literatürde, DNA taşıyıcılarının DNaz I gibi yaygın enzimler karşısında korunabilirliği, etkin gen aktarımı için temel gerekliliklerden biri olarak ifade edilmektedir (Kanvinde ve ark., 2022). Tüm stabilite testlerinin sonuçları, gen taşıyıcı sistemin hem raf koşullarında hem de biyolojik ortamda kararlılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, sistemin +5±3°C'de saklanması önerilmektedir. Soğuk koşullar, partikül boyutunun ve yüzey özelliklerinin korunmasını destekleyerek sistemin işlevsel özelliğini sürdürmesini mümkün kılmaktadır. Stabilite yönünden elde edilen bu olumlu sonuçlar, geliştirilen taşıyıcının ileri uygulamalara uygun, güvenilir ve dayanıklı bir yapı sunduğunu göstermektedir.

Gen taşıyıcı sistemin biyouyumluluğunun belirlenmesi amacıyla yapılan sitotoksisite testlerinde, hem kanserli (4T1 üçlü negatif meme kanseri hücreleri) hem de sağlıklı (L929 fibroblast) hücre hatları kullanılarak MTT testi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, hedeflenmiş gen taşıyıcı sistemin her iki hücre hattında da %70 üzerinde hücre canlılığı sağladığını ve toksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. Özellikle hedefleme yapılmamış gen taşıyıcı sistemle karşılaştırıldığında, cRGD ile modifiye edilmiş gen taşıyıcı sistemin sitotoksik etkisinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum, sistemin yüzey modifikasyonu sayesinde hücre membranına daha seçici bağlandığını ve hücre içi alımda daha kontrollü bir dağılım sergilediğini düşündürmektedir. Pozitif yüklü taşıyıcı sistemlerin genellikle membran bütünlüğünü bozarak toksisiteye yol açtığı bilinmektedir (Lopez-Garcia ve ark., 2014). Ancak bu çalışmada LPH-GTS, hem BPEI'nin toksik etkilerini azaltacak şekilde lipitlerle stabilize edildiği hem de DSPE-PEG-Maleimid aracılığıyla gerçekleştirilen yüzey modifikasyonu ile biyouyumluluğun artırıldığı görülmüştür. Literatürde de benzer şekilde, yüzeyi modifiye edilmiş pozitif yüklü taşıyıcıların toksisiteyi azaltma potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (Zintchenko ve ark., 2008; Ke ve ark., 2017). Elde edilen sitotoksisite verileri geliştirilen taşıyıcı sistemin güvenli bir yapıya sahip olduğunu ve ilerleyen *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda tercih edilebilir bir aday olduğunu desteklemektedir.

Transfeksiyon etkinliğinin değerlendirilmesinde, geliştirilen LPH-GTS-cRGD:pDNA bu gen taşıyıcı sistem hem hedefleme özgüllüğü hem de gen aktarım kapasitesi açısından incelenmiştir. Bu değerlendirme, GFP kodlayan pDNA'nın taşıyıcı sistemle hücreye aktarılması sonrası hücre içi yeşil floresan ışıma gözlemlenerek yapılmıştır. Böylece gen ekspresyonu doğrudan görsel olarak izlenmiştir (Taori ve ark., 2009). Çalışmada, hücrelerin önceden cRGD peptidi ile muamele edilmesinin ardından LPH-GTS-cRGD:pDNA uygulanması, transfeksiyon etkinliğinde belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Bu bulgu, hücre yüzeyindeki integrin reseptörlerinin cRGD ile doyurulması sonucu taşıyıcının hücreye alınmasının engellendiğini ve sistemin RGD-bağımlı hedefli bir mekanizma ile çalıştığını açıkça göstermektedir (Sofias ve ark., 2020). Bu tür rekabetçi bağlanma çalışmaları, hedefli taşıyıcı sistemlerin özgüllüğünü ortaya koymak için yaygın olarak kullanılmakta olup, literatürde de benzer şekilde RGD peptidi ile yapılan pre-inhibisyon uygulamalarının transfeksiyon etkinliğini düşürdüğü ve hedefli taşınımın varlığını doğruladığı bildirilmektedir (Liu X. ve ark., 2014). Ayrıca, cRGD hedefli gen taşıyıcı sistemin, RGD içermeyen (hedeflenmemiş) gen taşıyıcı sistemle karşılaştırıldığında daha yüksek transfeksiyon etkinliği sergilediği gözlenmiştir. Bu durum, sistemin hedef hücrelerdeki integrin ekspresyonunu başarıyla tanıyıp hücre içine alınmasını sağladığını ve genetik materyalin etkin şekilde taşındığını desteklemektedir. RGD peptidleri, αvβ3 ve αvβ5 integrinlerine yüksek afinite gösterir. Bu reseptörler özellikle hızlı proliferasyon gösteren tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilir. Bu nedenle RGD ile hedeflenmiş sistemler tümör hücrelerine daha yüksek gen transferi sağlamaktadır (De Lorenzi ve ark., 2023). Yapılan transfeksiyon çalışmaları sistemin hem hedefleme özgüllüğünü hem de gen taşıma kapasitesini ortaya koymuştur. cRGD ile gerçekleştirilmiş yüzey modifikasyonu sayesinde hücreye seçici bağlanma sağlanmış ve taşıyıcının hedef hücrelerde etkili gen ekspresyonu oluşturması mümkün hale gelmiştir. Bu bulgular, sistemin integrin aracılı spesifik alım yoluyla etki gösterdiğini ve gelecekteki kanser gen tedavisi uygulamaları için değerli bir taşıyıcı aday olduğunu göstermektedir.

VEGF-A, tümör anjiyogenezinin başlıca düzenleyici faktörlerinden biri olup, metastatik progresyon ve kötü prognozla yakından ilişkilidir (Ferrara, 2002). Bu nedenle VEGF-

A'nın ekspresyon düzeyinin düşürülmesi, kanser tedavisinde önemli bir terapötik hedef oluşturmaktadır. Bu çalışmada, geliştirilen LPH-GTS-cRGD:pDNA'nın VEGF-A gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi, ÜNMK modeli olarak yaygın şekilde kullanılan 4T1 hücrelerinde, kantitatif ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. ELISA sonuçlarına göre, sadece pDNA uygulanan grupta, serbest formda uygulanan nükleik asidin hücrelere girişinin sınırlı olması nedeniyle VEGF-A düzeyinde minimal bir azalma saptanmıştır. Bu durum, pDNA'nın hücre membranını aşmakta zorlandığını ve taşıyıcı sistemlerin gen ekspresyonunu etkin şekilde düzenleyebilmesi açısından kritik rol oynadığını göstermektedir. Literatürde de, çıplak nükleik asitlerin serumda hızla degradasyona uğradığı ve hücre içi taşınım verimlerinin düşük olduğu belirtilmiştir (Niidome ve ark., 2002; Thomas ve ark., 2003). Öte yandan, cRGD ile hedeflendirilmiş LPH-GTS-cRGD:pDNA sisteminin uygulandığı grupta VEGF-A düzeylerinde belirgin bir azalma elde edilmiştir. Bu sonuç, sistemin hedefli gen taşıma kapasitesini destekler niteliktedir. RGD peptidlerinin αvβ3 ve αvβ5 integrinlerine yüksek afinitesi sayesinde, özellikle bu reseptörleri aşırı eksprese eden tümör hücrelerine yönelik hedefleme mümkün hale gelmektedir (Danhier ve ark., 2012c). Bu reseptör-ligand etkileşimi, taşıyıcı sistemin hücre içine alınmasını kolaylaştırarak gen susturma etkinliğini artırmaktadır. Rekabet inhibitörü kontrol grubunda, yani hücrelerin önceden serbest cRGD peptidi ile muamele edildiği durumda, hedefli sistemin uygulamasının ardından VEGF-A düzeyinin tekrar yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu durum, taşıyıcı sistemin hücrelere girişinde αvβ3 integrinlerinin önemli rol oynadığını ve bu reseptörlerin blokajının sistemin etkinliğini azalttığını açıkça ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, yapılan önceki çalışmalarda da RGD peptidiyle hedeflenmiş taşıyıcı sistemlerin hücre içi alımının, integrin blokajı ile anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (Desgrosellier ve ark., 2010; Wang B. ve ark., 2024a).

Bu bulgular ışığında, geliştirilen LPH-GTS-cRGD sisteminin αvβ3 integrin aracılı bir hedefleme mekanizmasıyla çalıştığı ve bu hedeflemenin gen susturma etkinliği açısından kritik olduğu söylenebilir. Sistemin, integrin ekspresyon düzeyi yüksek olan ÜNMK hücrelerine karşı seçici bir şekilde etkinlik göstermesi, tedaviye özel bir yönelme sağlamakta ve olası sistemik toksisitelerin azaltılmasına katkıda bulunmaktadır. cRGD aracılı hedefleme stratejisinin, pDNA'nın etkili hücre içi iletimi ve terapötik etkinliğinin

artırılması açısından önemli bir yaklaşım sunduğu görülmektedir. Bu veriler, hedefli gen taşıyıcı sistemlerin yalnızca gen transferini değil, aynı zamanda tümör mikroçevresine özel yönelimi de mümkün kılarak daha başarılı tedavi sonuçlarına ulaşılabileceğini göstermektedir. Özellikle ÜNMK gibi hedeflenmesi güç tümör alt tiplerinde, bu tür akıllı sistemlerin klinik geçiş potansiyeli yüksek olarak değerlendirilmektedir.

Tasarlanan sistemin *in vivo* terapötik etkinliğinin araştırılması amacıyla, ÜNMK alt tipi için yaygın olarak kullanılan 4T1 hücre hattı ile BALB/c farelerinde ortotopik tümör modeli oluşturulmuştur. 4T1 hücreleri, yüksek metastatik kapasiteye sahip olup hem primer tümör oluşumu hem de spontan metastaz açısından klinik ÜNMK fenotipini başarıyla taklit eden bir model sunmaktadır. Özellikle bağışıklık sistemi intakt BALB/c farelerinde tümörün doğal progresyonu, tedavi etkinliğinin hem lokal hem de sistemik düzeyde değerlendirilmesini olanaklı kılmaktadır (Busch ve ark., 2016). Tümör implantasyonunu takiben yaklaşık sekinci gün civarında 50 mm^3 hacme ulaşan tümörler, tedaviye başlama kriteri olarak kabul edilmiştir. Bu eşik değeri, literatürde yaygın olarak kullanılan ve tümörlerin hem yeterli şekilde damarlandığı hem de terapötik müdahalelere duyarlı hale geldiği bir dönem olarak tanımlanmıştır (Lin ve ark., 2023). Bu zamanlama, tedavi başlangıcının çok erken yapılması durumunda tümör mikroçevresinin yeterince oluşmaması ya da çok geç yapılması halinde tedaviye direnç gelişmesi gibi olumsuzlukların önüne geçilmesini sağlamaktadır.

Model oluşturulmasının ardından, cRGD ile hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistem intratümöral yolla ve gün aşırı olmak üzere üç doz şeklinde uygulanmıştır. İntratümöral uygulama, özellikle hedeflenmiş gen taşıyıcı sistemlerin lokal biyoyararlanımını artırmak, sistemik yan etkileri en aza indirmek ve taşıyıcı sistemin doğrudan tümör mikroçevresine ulaşmasını sağlamak açısından önemli avantajlar sunmaktadır (Chen Z. Y. ve ark., 2010; Kullberg ve ark., 2013; Xia ve ark., 2021). Dolayısıyla karaciğer, böbrek gibi hedef dışı organlarda toksisitenin azalmasına katkı sağladığı vurgulanmaktadır (Pridgen ve ark., 2013; Mantooth ve ark., 2024). Gün aşırı uygulama sıklığı ise, hücre döngüsü dinamiklerine uyumlu bir aralık sunarak gen susturma ya da gen ekspresyonunun sürekliliğini sağlamaya yönelik rasyonel bir tercihtir. Ayrıca, çoğu

gen taşıyıcı sistemin biyolojik etkilerinin maksimuma ulaşması için tekrar dozlamaya ihtiyaç duyduğu da bilinmektedir (Shi ve ark., 2024a). Tümör hacmi ölçümleri, tedavi süresince iki günde bir kumpas ile gerçekleştirilmiş ve veriler, tedavinin tümör büyümesi üzerindeki etkisini zamana bağlı olarak izlemek amacıyla değerlendirilmiştir. Literatürde de benzer şekilde, tümör büyüme kinetiğini takip etmek için bu sıklıkta yapılan ölçümler önerilmektedir. Ayrıca ölçümlerde en uzun ve en kısa eksenin kullanıldığı formüllerle tümör hacminin yaklaşık olarak hesaplandığı görülmektedir (Malekian ve ark., 2020). Bu yaklaşım, tümör yanıtının objektif şekilde değerlendirilmesine katkı sağlamaktadır. Çalışmanın sonunda, 26. günde hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Bu süre, hem tümör kontrolünün hem de sistemik toksisite ve biyolojik yanıtların değerlendirilmesi açısından yeterli bir gözlem periyodunu temsil etmektedir. Yapılan çalışmalarda da 21–30 günlük toplam gözlem süreleri, *in vivo* tedavi protokolleri için optimal gözlem aralığı olarak tercih edilmektedir (Filatenkov ve ark., 2014; Rashid ve ark., 2014). Ayrıca, 4T1 modeli gibi hızlı büyüyen tümörlerde bu zaman aralığı, ileri evre tümör progresyonu ve potansiyel metastazların da izlenmesine imkan tanımaktadır. Çalışmada uygulanan *in vivo* deneysel tasarım; güncel literatürle uyumlu, etik sınırlar içinde kalan ve tedavi sistemlerinin etkinliğini değerlendirmek açısından bilimsel olarak yeterli bir düzende yapılandırılmıştır. İntratümöral uygulama, hedefli sistemin lokal etkisinin belirlenmesine olanak tanırken; düzenli hacim ölçümleriyle tümör büyüme hızı üzerindeki değişimler net bir şekilde ortaya konmuştur. Bu deneysel düzenek, hedefli gen taşıyıcı sistemlerin antitümör etkinliğini *in vivo* ortamda değerlendirmeye yönelik önemli ve geçerli bir çerçeve sunmaktadır (Kalnina ve ark., 2025). Çalışma sonunda 26. günde gerçekleştirilen sakrifikasyon sonrası tümörlerin eksize edilerek ağırlıklarının değerlendirilmesi, geliştirilen gen taşıyıcı sistemin antitümör etkinliğini doğrudan ölçmeye yönelik önemli bir parametre olarak ele alınmıştır. Tümör ağırlığı, hacimsel ölçümlerin ötesinde gerçek biyokütleyi yansıttığı için tedaviye karşı ortaya çıkan hücresel düzeydeki yanıtları daha doğru biçimde ortaya koymaktadır (Guo ve ark., 2016).

Sakrifikasyon sonrası çıkarılan tümör dokuları büyüklük açısından analiz edilmiştir. Negatif kontrol grubu olan TM ve TM+PBS grupları arasında anlamlı bir fark

gözlenmemiştir. Bu uygulanan taşıyıcı veya plazmidin yokluğunda tümör progresyonunun doğal seyrini koruduğunu göstermektedir. Ayrıca TM+pDNA uygulanan grupta da benzer şekilde anlamlı bir tümör gerilemesi saptanmamıştır. Bu bulgu, serbest haldeki pDNA'nın stabilitesinin ve hücre içine geçiş kabiliyetinin sınırlı olduğunu ve taşıyıcı sistem olmadan terapötik etkinlik gösteremeyeceğini belirtmektedir (Uchida, 2022). Hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistem (TM+LPH-GTS:pDNA) uygulanan grup ise, serbest pDNA'ya göre daha belirgin bir tümör küçülmesi sağlamıştır.

LPH-GTS-cRGD'nin pDNA'yı stabilize ettiği, hücre içine alımını artırdığı ve tümör mikroçevresinde belirli bir düzeyde biyoyararlanım sağladığını göstermektedir. Literatürde, özellikle viral olmayan taşıyıcı sistemlerin elektrostatik kompleks oluşturarak DNA'yı nükleazlara karşı koruduğu ve hücresel internalizasyonu artırdığı belirtilmiştir (Fewell ve ark., 2005). Ancak en dikkat çekici sonuç, cRGD ile modifiye edilmiş hedefli taşıyıcı sistemle uygulanan TM+LPH-GTS-cRGD:pDNA grubunda gözlenmiştir. Bu grupta tümör ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır (**** $p<0.0001$). Bu bulgu, sistemin αvβ3 integrin reseptörlerine özgü hedeflenme stratejisi sayesinde tümör dokusuna seçici olarak yönlendiğini ve gen taşıma verimliliğini önemli ölçüde artırdığını ortaya koymaktadır. RGD peptidlerinin özellikle ÜNMK hücrelerinde aşırı eksprese edilen integrin alt tiplerine yüksek afinitesi sayesinde, hem taşıyıcının hem de yükün doğrudan tümör bölgesine ulaştığı gösterilmiştir (Okarvi ve ark., 2025). Bulgularımızla uyumlu olarak, RGD modifikasyonlu nanopartiküllerle yapılan çalışmalarda hedefli sistemlerin serbest DNA'ya göre 3-5 kat daha fazla tümör inhibisyonu sağladığı ve özellikle intratümöral uygulamalarda lokal etkinliğin dramatik biçimde arttığı rapor edilmiştir (Wang B. ve ark., 2024a). Ayrıca, cRGD'nin hedefleme başarısı, sadece tümör içine girişte değil, aynı zamanda endositoz sonrası lizozomal kaçış ve nükleer ulaşım gibi adımlarda da sistemin terapötik etkisini maksimize etmektedir (Wu Y. ve ark., 2024). Hedefli sistemin istatistiksel olarak anlamlı tümör ağırlığı azaltıcı etkisi, sistemin yalnızca iletim görevi görmediğini, aynı zamanda hücre içi hedeflemeyi başarıyla gerçekleştirdiğini göstermektedir. Bu sonuç, geliştirilen LPH-GTS-cRGD nanosisteminin antitümör etkinliğinin, sadece taşıyıcının yapısına değil, aynı zamanda doğru hedefleme ligandı seçimine de bağlı olduğunu vurgulamaktadır. Bu bağlamda, ÜNMK gibi tedaviye

dirençli tümör alt tiplerinde, RGD-tabanlı hedefleme stratejileri, gen tedavisine dayalı yaklaşımın klinik başarıya ulaşması açısından umut verici bir perspektif sunmaktadır.
Tedavi süresince sistemik toksisite, genel sağlık durumu ve tedaviye bağlı olası advers etkilerin değerlendirilmesi açısından hayvan ağırlıklarının izlenmesi önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, farklı tedavi grupları arasında hayvan ağırlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmemiştir. Bu bulgu, uygulanan taşıyıcı sistemlerin ve intratümöral gen tedavilerinin sistemik düzeyde ciddi bir yan etkiye neden olmadığını ve genel tolerabilitenin yüksek olduğunu düşündürmektedir. Hayvan ağırlığında anlamlı değişikliklerin gözlenmemesi, özellikle hedefli taşıyıcı sistemin biyouyumlu yapısını ve lokal uygulama stratejisinin avantajını desteklemektedir.
Bununla birlikte, tedaviye yanıt veren gruplarda gözlemlenen tümör gerilemesi, hayvanın toplam vücut ağırlığında tümör kütlesinin azalmasına bağlı bir kayıp yaratabilmektedir. Bu durum, tedavi etkinliği nedeniyle tümör dokusunun kaybı ile hayvan ağırlığının azalması arasında bir denge oluşmasına neden olur. Nitekim bazı çalışmalarda, tümör büyümesinin hayvan ağırlığını artırıcı yönde etkide bulunduğu, bu nedenle etkili tedavi uygulamalarının ardından hayvanların sabit ya da hafif azalan ağırlık profili gösterdiği bildirilmiştir (Beaudry ve ark., 2023). Bu çerçevede değerlendirildiğinde, çalışmamızda hayvan ağırlıkları arasında anlamlı bir fark olmaması; bir yandan uygulanan sistemin güvenliğine, diğer yandan ise tümör dokusundaki azalmanın hayvan ağırlığında oluşturabileceği farkın, fizyolojik kompansasyonla dengelenmesine işaret etmektedir. Özellikle antitümör tedavilerde hem tümör kitlesinin azalması hem de sistemik yan etkilerin sınırlı kalması, ideal bir terapötik profilin göstergesidir. Dolayısıyla, elde edilen bulgular, uygulanan gen taşıyıcı sistemlerin biyolojik güvenliği açısından olumlu bir tablo çizmektedir ve hedefli tedavinin tümör ağırlığını anlamlı biçimde azaltırken, sistemik fizyolojik parametreleri etkilemediğini ortaya koymaktadır.

VEGF-A, solid tümörlerde anjiyogenezin başlıca düzenleyicisi olarak görev yapar ve tümörün büyümesi ile metastaz kapasitesinde kritik rol oynar (Wang F. ve ark., 2013; Liang ve ark., 2017). Bu nedenle VEGF-A ekspresyon düzeyindeki değişiklikler, tedavi

etkinliğinin önemli biyokimyasal göstergelerindendir. Çalışmamızda, VEGF-A ekspresyonunun *in vivo* analizi için ÜNMK modelini temsil eden 4T1 hücreleri ile oluşturulan ortotopik modelden elde edilen serum ve tümör dokularında ELISA analizi gerçekleştirilmiştir. Tümör dokularından elde edilen sonuçlara göre, hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistemle (TM+LPH-GTS:pDNA) uygulanan grupta negatif kontrol (TM) grubuna kıyasla VEGF-A düzeyinde sınırlı fakat istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (*$p<0.05$). Bu azalma, taşıyıcının hücre içine giriş kapasitesinin serbest pDNA'ya göre daha yüksek olduğunu ve gen susturma işlevinin taşıyıcı sistem aracılığıyla belirli bir düzeyde gerçekleştirilebildiğini göstermektedir. Literatürde, lipit-polimer hibrit yapılar gibi viral olmayan sistemlerin, pDNA'nın hücre içine taşınmasında ve nükleer lokalizasyonunda serbest formuna kıyasla daha etkili olduğu defalarca gösterilmiştir (Patel M. N. ve ark., 2024). Ancak en belirgin VEGF-A baskılanması, hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistemle (TM+LPH-GTS-cRGD:pDNA) tedavi edilen grupta gözlenmiştir (****$p<0.0001$). Bu gruptaki anlamlı düşüş, taşıyıcı sistemin αvβ3 integrinler aracılığıyla tümör hücrelerine seçici bağlanma özelliğinden kaynaklanmaktadır. cRGD ile yüzey modifikasyonu yapılmış taşıyıcı sistemler, integrinleri aşırı eksprese eden ÜNMK tümörlerine özgü hedefleme sağlayarak, terapötik materyalin tümör mikroçevresine spesifik dağılımını mümkün kılar (Benyettou ve ark., 2024). Bu sayede, gen susturma işlevi daha etkili ve lokalize bir şekilde gerçekleştirilmiş olur. Buna karşılık, TM, TM+PBS ve TM+pDNA gruplarında VEGF-A düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuç, hem taşıyıcı sistemin yokluğunda serbest pDNA'nın biyoyararlanımının yetersiz olduğunu, hem de PBS gibi tedavi içermeyen kontrollerin tümörün doğal progresyonunu değiştirmediğini ortaya koymaktadır. pDNA'nın sistemik ya da lokal uygulanmasında taşıyıcı olmaksızın hücre membranını geçememesi, stabilitesinin düşüklüğü ve endonükleazlara karşı savunmasız olması bu sonuçla örtüşmektedir (Sufian ve ark., 2023). Elde edilen bulgular hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistemin *in vivo* ortamda da yüksek düzeyde etkinlik gösterdiğini desteklemektedir. Özellikle RGD temelli hedefleme stratejileriyle formüle edilen sistemler, gen susturma terapilerinin tümör dokusunda daha etkili sonuçlar doğurmasına olanak sağlamakta ve VEGF-A gibi tümör progresyonunu tetikleyen faktörlerin baskılanmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Bu yönüyle çalışma, ÜNMK

gibi hedeflenmesi güç tümör alt tiplerinde cRGD-tabanlı sistemlerin translasyonel potansiyeline dair güçlü kanıtlar sunmaktadır.

VEGF-A'nın yalnızca lokal tümör mikroçevresinde değil, aynı zamanda dolaşımda da bulunması, sistemik anjiyogenez yanıtının değerlendirilmesi açısından önemlidir (Kerbel, 2008; Jayson ve ark., 2016). Bu bağlamda, serum VEGF-A düzeyleri; tedavinin tüm vücut üzerindeki etkisini ve olası uzak organ yanıtlarını değerlendirmede tamamlayıcı bir biyomarker görevi üstlenmektedir. Hayvanların serum örneklerinde gerçekleştirilen VEGF-A ELISA sonuçlarına göre, yalnızca hedefli taşıyıcı sistemin (TM+LPH-GTS-cRGD:pDNA) uygulandığı grupta, serum VEGF-A düzeyinde sınırlı fakat anlamlı bir azalma gözlenmiştir (*$p<0.05$). Bu bulgu, hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistemin tümöre seçici olarak yönelmesiyle birlikte, lokal gen susturma etkisinin sınırlı da olsa dolaşıma yansıdığını göstermektedir. Ancak bu azalma, aynı sistemle tümör dokusunda elde edilen VEGF-A baskılanmasına kıyasla daha düşük düzeydedir. Bu durum, gen ekspresyonunun sistemik değil lokal olarak regüle edildiğini ve intratümöral uygulamanın esas olarak hedef bölgedeki moleküler süreci etkilediğini desteklemektedir. Hedeflenmemiş gen taşıyıcı sistem (TM+LPH-GTS:pDNA) ve diğer kontrol gruplarında (TM, TM+PBS, TM+pDNA) ise serum VEGF-A düzeylerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu bulgu, sistemin tümöre yönelme kapasitesi ve taşıyıcının hücre içine alınma verimliliği ile doğrudan ilişkilidir. Literatürde de hedefleme ligandı içermeyen taşıyıcı sistemlerin genellikle sınırlı biyoyararlanıma sahip olduğu ve dolaşımdaki biyomarker seviyelerini anlamlı biçimde değiştirmekte yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Danhier ve ark., 2012b; Wang R. ve ark., 2024b). Ayrıca, intratümöral uygulamanın sınırlı difüzyon alanına sahip olması ve dolaşıma karışan taşıyıcı miktarının minimal düzeyde kalması, serumdaki VEGF-A üzerinde gözlenen etkinin düşük olmasını açıklamaktadır (Duda ve ark., 2007; Chibaya ve ark., 2024). Sonuç olarak, yalnızca cRGD ile hedeflenmiş gen taşıyıcı sistemin serumda VEGF-A düzeyinde anlamlı bir düşüş sağlaması, bu sistemin *in vivo* ortamda hem lokal etkinlik hem de kısmen sistemik etki yaratabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, serum VEGF-A düzeyindeki düşüşün sınırlı olması, tedavi stratejisinin esas etkisinin tümör lokalizasyonuna odaklandığını ve sistemik dolaşımda yalnızca ikincil düzeyde

değişiklikler oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Bu bağlamda elde edilen veriler, tümör-spesifik hedeflemenin lokal anjiyojenik yanıtı etkileyerek sistemik VEGF düzeylerinde dolaylı ve sınırlı bir azalma sağladığını desteklemektedir.

H&E boyama, hücre çekirdeklerinin hematoksilen ile koyu mavi-mor renkte, sitoplazmaların ise eozin ile pembe-kırmızı tonlarında boyanmasını sağlayarak hücresel yapılar ve doku organizasyonu hakkında bilgi veren bir yöntemdir (Pettan-Brewer ve ark., 2014). Bu yöntem sayesinde tümör dokularında mitotik aktivite, hücre yoğunluğu ve stromal yapılar net biçimde değerlendirilebilir. Çalışmamızda, tedavi uygulanan 4T1 tümörlü BALB/c farelerden çıkarılan tümör dokularında H&E boyama gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntülerde, tedavi uygulanmayan kontrol grubunda tümör dokusunun daha kompakt, hücre yoğunluğunun yüksek ve mitotik aktivitenin belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, agresif büyüme paterniyle uyumlu olup 4T1 hücrelerinin yüksek proliferatif kapasitesini yansıtmaktadır (Herndon ve ark., 2024). Buna karşın, hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistemle tedavi edilen gruplarda tümör dokusunun daha düzensiz bir yapıda olduğu, hücre yoğunluğunda azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, genellikle tümör hücrelerinin apoptoz veya hipoksi gibi faktörlere yanıt vererek ölüm sürecine girdiğini gösterir ve tedavinin etkinliğini yansıtan önemli histolojik parametrelerden biridir (Yamamoto ve ark., 2023). Özellikle hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistem grubunda gözlenen daha belirgin yapısal bozulmalar, geliştirilen nanosistemin yalnızca moleküler düzeyde değil, doku düzeyinde de etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, daha önce literatürde RGD peptidi ile hedeflendirilmiş gen ve ilaç taşıyıcı sistemlerin tümör mikrovaskülatürü ve hücre içi hedefleme üzerinden oluşturduğu etkinliği destekler niteliktedir. Yapılan bir çalışmada, RGD ile modifiye edilmiş nanopartiküllerle tedavi edilen tümör dokularında H&E ve Ki boyamalarla daha düşük hücresel yoğunluk saptanmış, bu da tedavinin doku düzeyinde başarı sağladığını göstermiştir (Li M. ve ark., 2022a). Bu çalışmada H&E boyama ile yapılan histopatolojik değerlendirme, immünohistokimya öncesi tümör morfolojisinin analizine olanak sağlamış ve tedaviye yanıtla ilişkili yapısal farklılıkların ortaya konmasına yardımcı olmuştur. Gözlenen hücre kaybı ve doku düzensizlikleri, özellikle hedefli sistemle tedavi

edilen gruplarda belirgin olup, geliştirilen gen taşıyıcı sistemin tümör üzerinde anlamlı biyolojik etkinlik gösterdiğini histolojik düzeyde de teyit etmektedir.

Özetle bu tez çalışması kapsamında geliştirilen cRGD ile hedeflendirilmiş LPH-GTS sistemin, ÜNMK modelinde gösterdiği biyolojik etkiler hem *in vitro* hem de *in vivo* düzeyde kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. *In vitro* ELISA ve transfeksiyon analizlerinde, sistemin αvβ3 integrin aracılığıyla seçici hedefleme yapabildiği ve VEGF-A ekspresyonunu anlamlı düzeyde baskılayabildiği gösterilmiştir. *In vivo* çalışmalar ise bu etkinliği doğrular nitelikte olup, intratümöral uygulama sonrası tümör büyümesi, tümör ağırlığı ve doku düzeyindeki VEGF-A ifadesinde hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistemin üstünlüğünü ortaya koymuştur. Histopatolojik incelemelerde, özellikle hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistemle tedavi edilen grupların tümör dokularında belirgin yapısal bozulmalar gözlemlenmiş, bu da tedavinin doku düzeyindeki başarısını desteklemiştir. Serumdan elde edilen VEGF-A düzeyleri, tümör dokusundaki kadar dramatik bir değişim göstermese de sadece hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistemde anlamlı bir azalma gözlenmiş ve bu durum lokal etkinliğin sistemik düzeye kısmen yansıdığını düşündürmüştür.

Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, tez çalışması kapsamında geliştirmiş olduğumuz cRGD ile hedeflendirilmiş LPH-GTS, gen susturmaya dayalı kanser tedavisinde etkinlik, güvenlik ve seçicilik açısından güçlü alternatif bir gen-ilaç modeli olup; özellikle hedeflenmesi zor olan ÜNMK gibi alt tiplerde translasyonel potansiyeli olan bir ileri tedavi tıbbi ürünü (İTTÜ) adayıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasında, ÜNMK modeli olarak kullanılan 4T1 hücrelerine karşı, aktif olarak hedeflenebilir ve biyolojik olarak güvenli gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, viral olmayan, lipit-polimer hibrit yapılı ve RGD peptidi ile yüzeye hedeflenmiş nanopartiküller hazırlanarak, pDNA taşıma enkapsülasyon ve taşıma yetenekleri, fizikokimyasal özellikleri, biyolojik etkinlikleri ve güvenlilik profilleri değerlendirilmiştir.

RGD peptidi ile aktif olarak hedeflendirilmiş viral olmayan LPH-GTS geliştirilmiş ve bu sistemlerin *in vitro* ve *in vivo* etkinliği detaylı şekilde değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında geliştirilen hibrit nanopartiküller, pDNA taşıma kapasiteleri, fizikokimyasal özellikleri, hücre içi alım potansiyelleri, transfeksiyon verimlilikleri ve biyolojik güvenlilikleri açısından sistematik olarak karakterize edilmiştir. Hibrit taşıyıcı sistemlerin tasarımında lipit ve polimer temelli yapıların kullanılması, hem gen ekspresyonunun sürekliliğini artırmış hem de PEI kaynaklı sitotoksisiteyi anlamlı ölçüde azaltmıştır. Hibrit yapıların yüzeyi, cRGD peptidi ile modifiye edilerek, αvβ3 ve αvβ5 integrinlerini aşırı eksprese eden ÜNMK hücrelerine spesifik hedefleme sağlanmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları, elde edilen nanopartiküllerin ortalama boyutlarının 100 nm altında olduğunu, zeta potansiyellerinin ise genellikle +20mV üzerinde bulunduğunu göstermiştir. Bu değerler, hem stabilite hem de hücre zarından etkin geçiş için elverişlidir. Agaroz jel elektroforezi, DNaz I ve serum stabilite çalışmaları ve salım deneyleri, taşıyıcı sistemlerin pDNA'yı yüksek verimle bağlayabildiğini, enzimatik degradasyondan koruyabildiğini ve etkin bir şekilde salım yapabildiğini göstermiştir.

In vitro değerlendirmelerde, RGD hedefli hibrit sistemlerin hücre içi alım oranları ve transfeksiyon verimleri, hedefleme yapılmamış gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.05$). *In vitro* çalışmalarda hücre canlılığının koruduğu ve tümör invazyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise, intratümöral uygulama sonrası tümör bölgesinde artmış birikim, sınırlı sistemik dağılım ve düşük toksisite profili gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, sistemin hem hedefleme hem de

biyogüvenlik açısından klinik denemelere aday olmaya uygun bir gen-ilaç olma potansiyeli sergilediğini göstermektedir.

Elde edilen sistemler, *in vitro* ortamda, kontrol gruplarına kıyasla belirgin düzeyde artmış gen ekspresyonu ve hücre içi alım göstermiştir. *In vivo* çalışmalarda ise, RGD ile aktif olarak hedeflendirilmiş hibrit gen taşıyıcı sistemlerin, tümör bölgesinde daha yüksek birikim gösterdiği, sistemik toksisiteye yol açmadan güvenle kullanılabildiği ve antitümöral etkiyi artırdığı gözlemlenmiştir.

Tüm bu sonuçlar, geliştirilen sistemin viral olmayan gen taşıyıcılar arasında umut vadeden bir aday olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle ÜNMK gibi hedeflenmesi zor tümörlerde, akıllı yüzey modifikasyonları RGD gibi ligandlarla akıllı yüzey modifikasyonları ve hibrit yapıların sinerjisi sayesinde etkili ve güvenli gen tedavisi stratejileri geliştirilebileceği kanıtlanmıştır.

In vitro analizlerde, RGD ile hedeflendirilmiş gen taşıyıcı sistemlerin transfeksiyon verimlilikleri, hedeflenmemiş kontrollere kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). MTT deneyleri, hücre canlılığının %70' in üzerinde olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, sistemin tümör progresyonuna olan etkilerini göstermek amacıyla gerçekleştirilen invazyon analizlerinde, gen taşıyıcı sistem ile transfekte edilen hücrelerin invazyon kapasitelerinde azalma olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, hedeflenen genin tümör hücrelerinin üzerinde proliferasyonu baskılayıcı etkisini doğrulamıştır.

Ayrıca, gen ekspresyonunun fonksiyonel çıktısını değerlendirmek amacıyla yapılan ELISA analizleri, transfekte hücrelerde hedef gen ürün düzeyinin anlamlı düzeyde arttığını ve bu artışın yalnızca gen ekspresyonuyla sınırlı kalmayıp, biyolojik etkiye dönüştüğünü göstermiştir. Bu bulgu, sistemin sadece gen taşıma değil, aynı zamanda biyolojik cevabı indükleyebilme kapasitesine de sahip olduğunu göstermesi açısından son derece önemlidir.

In vivo deneylerde, intratümöral uygulanan RGD peptide ile aktif olarak hedeflendirilmiş hibrit gen taşıyıcı sistemin tümör dokusunda daha yüksek oranda biriktiği, sistemik dağılımının sınırlı olduğu ve organ toksisitesine neden olmadığı gözlemlenmiştir. Histopatolojik analizler ve vücut ağırlığı değişimleri de bu bulguları desteklemiştir.

Bu tez çalışmasında tasarlanmış RGD peptidiyle hedeflenmiş, viral olmayan LPH-GTS yapılar, *in vitro* ve *in vivo* düzeyde yüksek gen taşıma ve fonksiyonel biyolojik etkinlikler açısından umut vadeden sonuçlar ortaya koymuştur. Özellikle invazyon gibi agresif tümör davranışları üzerinde baskılayıcı etkilerinin gösterilmesi, bu sistemin sadece bir taşıyıcı olmaktan öte, terapötik potansiyeli olan bir ajan haline gelmesini sağlamıştır. ÜNMK gibi tedavi seçenekleri sınırlı ve hedeflenmesi zor kanser türlerinde, bu tür akıllı sistemlerin geliştirilmesi gen tedavisinde önemli katkı sağlamaktadır.

Tez kapsamında geliştirilmiş olan RGD ile aktif olarak hedeflendirilmiş LPH-GTS'in; *in vitro* ve *in vivo* ortamda etkin gen transferi sağlaması, düşük toksisite ve yüksek biyouyumluluk profili göstermesi, aktif hedeflendirilmiş yapısıyla tümör dokusuna yönelmesi ve gen susturma başarısı, bu gen taşıyıcı sistemin bir gen tedavisi tıbbi ürünü adayı olma potansiyelin*f*e sahip olduğunu ortaya koymuştur.

EK

EK1. Etik Kurul Onay Belgesi

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
2022
KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	akhadye@akdeniz.edu.tr
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Dr.Öğr.Üyesi Devrim DEMİR DORA
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Meme Kanseri Tedavisi İçin Rgd Hedefli Gen Taşıyıcı Nanosistemlerin Tasarımı, İn Vitro ve İn Vivo Değerlendirilmesi
BAŞVURU FORMU ID/ PROTOKOL NO		*1508/2022.09.004*

Çalışma süresi	Denek türü	Denek Sayısı	Denek Cinsiyeti
24 ay	Fare-Balb/c	50	Dişi

Araştırma Sonunda Deneklere Uygulanacak İşlemler	Deney protokolünün uygulanmasından sonra ötenazi yapılacaktır.	
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 115	Tarih: 14.11.2022
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru görüşülerek, ilgili projenin etik açıdan bir sakınca içermediği tespit edildiğinden, çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası A Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	0 (242) 249 69 54
	FAKS	0 (242) 249 69 03
	E-POSTA	akhadye@akdeniz.edu.tr
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Dr.Öğr.Üyesi Devrim DEMİR DORA
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Meme Kanseri Tedavisi İçin Rgd Hedefli Gen Taşıyıcı Nanosistemlerin Tasarımı, İn Vitro ve İn Vivo Değerlendirilmesi
BAŞVURU FORMU ID/ PROTOKOL NO		

Çalışma süresi	Denek türü	Denek Sayısı	Denek Cinsiyeti

Araştırma Sonunda Deneklere Uygulanacak İşlemler		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 41	Tarih: 16.06.2025
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru görüşülerek, ilgili projenin etik açıdan bir sakınca içermediği tespit edildiğinden, çalışmanın yapılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir. **Daha önce onayı verilen (14.11.2022/ 115:Başvuru formu ID:1508)** araştırmada yeni bir hedeflenmemiş kontrol grubu eklenmesi ve bazı hayvanların sakrifiye edilmeden izlenmesi konulu 02.06.2025 tarihli dilekçesi görüşülerek, kurul üyeleri bilgilendirildi, uygun bulundu..	

KAYNAKLAR

Abubakar M, Figueroa J, Ali HR, Blows F, Lissowska J, Caldas C , ve ark. Combined quantitative measures of er, pr, her2, and ki67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. Mod Pathol. 2019; 32: 1244-1256.

Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent progress. AAPS J. 2009; 11: 671-681.

Algarra M, Gonzalez-Munoz E. Efficient and scalable gene delivery method with easily generated cationic carbon dots. Biol Proced Online. 2024; 26: 6.

Baki AM, Ghavami SM. A modified drastic model for groundwater vulnerability assessment using connecting path and analytic hierarchy process methods. Environ Sci Pollut Res Int. 2023; 30: 111270-111283.

Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F , ve ark. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. Ann Oncol. 2018; 29: 895-902.

Baroukhian J, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. A comprehensive, population level evaluation of previously reported drug triggers of pemphigus highlights immunomodulatory capacity as a common characteristic. Front Immunol. 2024; 15: 1508129.

Beaudry AG, Law ML. Variable body and tissue weight reporting in preclinical cachexia literature may alter study outcomes and interpretation. Dis Model Mech. 2023; 16.

Beer AJ, Haubner R, Goebel M, Luderschmidt S, Spilker ME, Wester HJ , ve ark. Biodistribution and pharmacokinetics of the alphavbeta3-selective tracer 18f-galacto-rgd in cancer patients. J Nucl Med. 2005; 46: 1333-1341.

Benyettou F, Khair M, Prakasam T, Varghese S, Matouk Z, Alkaabi M , ve ark. Crgd-peptide modified covalent organic frameworks for precision chemotherapy in triple-negative breast cancer. ACS Appl Mater Interfaces. 2024; 16: 56676-56695.

Bergonzini C, Kroese K, Zweemer AJM, Danen EHJ. Targeting integrins for cancer therapy - disappointments and opportunities. Front Cell Dev Biol. 2022; 10: 863850.

Bertozzi S, Londero AP, Diaz Nanez JA, Di Vora R, Baita B, La Verghetta L , ve ark. Breast cancer care for the aging population: A focus on age-related disparities in breast cancer treatment. BMC Cancer. 2025; 25: 492.

Bogdanovic B, Fagret D, Ghezzi C, Montemagno C. Integrin targeting and beyond: Enhancing cancer treatment with dual-targeting rgd (arginine-glycine-aspartate) strategies. Pharmaceuticals (Basel). 2024; 17.

Bono N, Ponti F, Mantovani D, Candiani G. Non-viral in vitro gene delivery: It is now time to set the bar! Pharmaceutics. 2020; 12.

Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I , ve ark. Global cancer statistics 2022: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024; 74: 229-263.

Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. Signal Transduct Target Ther. 2021; 6: 53.

Burstein HJ, Lacchetti C, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KA , ve ark. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: Asco clinical practice guideline focused update. J Clin Oncol. 2019; 37: 423-438.

Busch RA, Jonker MA, Pierre JF, Heneghan AF, Kudsk KA. Innate mucosal immune system response of balb/c vs c57bl/6 mice to injury in the setting of enteral and parenteral feeding. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2016; 40: 256-263.

Cameron CS, American Cancer Society. Ca. In (pp. volumes). New York: American Cancer Society.

Cao Y, Tan YF, Wong YS, Liew MWJ, Venkatraman S. Recent advances in chitosan-based carriers for gene delivery. Mar Drugs. 2019; 17.

Cesur-Ergün B, Demir-Dora D. Gene therapy in cancer. J Gene Med. 2023; 25: e3550.

Changizi Z, Moslehi A, Rohani AH, Eidi A. Chlorogenic acid induces 4t1 breast cancer tumor's apoptosis via p53, bax, bcl-2, and caspase-3 signaling pathways in balb/c mice. J Biochem Mol Toxicol. 2021; 35: e22642.

Chen Z, Deng J, Zhao Y, Tao T. Cyclic rgd peptide-modified liposomal drug delivery system: Enhanced cellular uptake in vitro and improved pharmacokinetics in rats. Int J Nanomedicine. 2012; 7: 3803-3811.

Chen ZY, Liang K, Qiu RX. Targeted gene delivery in tumor xenografts by the combination of ultrasound-targeted microbubble destruction and polyethylenimine to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis. J Exp Clin Cancer Res. 2010; 29: 152.

Cheng X, Xie Q, Sun Y. Advances in nanomaterial-based targeted drug delivery systems. Front Bioeng Biotechnol. 2023; 11: 1177151.

Chibaya L, DeMarco KD, Lusi CF, Kane GI, Brassil ML, Parikh CN , ve ark. Nanoparticle delivery of innate immune agonists combined with senescence-inducing agents promotes t cell control of pancreatic cancer. Sci Transl Med. 2024; 16: eadj9366.

Dali P, Shende P. Self-assembled lipid polymer hybrid nanoparticles using combinational drugs for migraine via intranasal route. AAPS PharmSciTech. 2022; 24: 20.

Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. Plga-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. J Control Release. 2012a; 161: 505-522.

Danhier F, Le Breton A, Preat V. Rgd-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. Mol Pharm. 2012b; 9: 2961-2973.

Danhier F, Pourcelle V, Marchand-Brynaert J, Jerome C, Feron O, Preat V. Targeting of tumor endothelium by rgd-grafted plga-nanoparticles. Methods Enzymol. 2012c; 508: 157-175.

De Lorenzi F, Rizzo LY, Daware R, Motta A, Baues M, Bartneck M , ve ark. Profiling target engagement and cellular uptake of crgd-decorated clinical-stage core-crosslinked polymeric micelles. Drug Deliv Transl Res. 2023; 13: 1195-1211.

Delaney S, Murphy R, Walsh F. A comparison of methods for the extraction of plasmids capable of conferring antibiotic resistance in a human pathogen from complex broiler cecal samples. Front Microbiol. 2018; 9: 1731.

Demir-Dora D, Öner F. Development and evaluation of polyethylenimine polyplexes as non-viral vectors for delivery of plasmid DNA encoding shrna against stat3 activity into triple negative breast cancer cells. J Drug Deliv Sci Tec. 2023; 82.

Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. Nat Rev Cancer. 2010; 10: 9-22.

Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG , ve ark. A review on cxcr4/cxcl12 axis in oncology: No place to hide. Eur J Cancer. 2013; 49: 219-230.

Duda DG, Batchelor TT, Willett CG, Jain RK. Vegf-targeted cancer therapy strategies: Current progress, hurdles and future prospects. Trends Mol Med. 2007; 13: 223-230.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: Patient-level meta-analysis of the randomised trials. Lancet. 2015; 386: 1341-1352.

Feng S, Dang S, Han TW, Ye W, Jin P, Cheng T , ve ark. Cryo-em studies of tmem16f calcium-activated ion channel suggest features important for lipid scrambling. Cell Rep. 2019; 28: 1385.

Ferrara N. Vegf and the quest for tumour angiogenesis factors. Nat Rev Cancer. 2002; 2: 795-803.

Fewell JG, Matar M, Slobodkin G, Han SO, Rice J, Hovanes B , ve ark. Synthesis and application of a non-viral gene delivery system for immunogene therapy of cancer. J Control Release. 2005; 109: 288-298.

Filatenkov A, Baker J, Muller AM, Ahn GO, Kohrt H, Dutt S , ve ark. Treatment of 4t1 metastatic breast cancer with combined hypofractionated irradiation and autologous t-cell infusion. Radiat Res. 2014; 182: 163-169.

Fortarezza F, Cazzato G, Ingravallo G, Dei Tos AP. The 2023 who updates on skin tumors: Advances since the 2018 edition. Pathologica. 2024; 116: 193-206.

Gajbhiye KR, Salve R, Narwade M, Sheikh A, Kesharwani P, Gajbhiye V. Lipid polymer hybrid nanoparticles: A custom-tailored next-generation approach for cancer therapeutics. Mol Cancer. 2023; 22: 160.

Gao Y, Zheng W, Sun Y, Yang L, Guo Z, Li Y , ve ark. Voluntary medical male circumcision and incident hiv infection among men who have sex with men in china (the com study): Protocol for a randomized controlled trial. JMIR Res Protoc. 2023; 12: e47160.

Garcia-Alegria AM, Anduro-Corona I, Perez-Martinez CJ, Guadalupe Corella-Madueno MA, Rascon-Duran ML, Astiazaran-Garcia H. Quantification of DNA through the nanodrop spectrophotometer: Methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA. Int J Anal Chem. 2020; 2020: 8896738.

Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. Int J Mol Sci. 2021; 22.

Giannuzzi F, Carla MM, Hu L, Cestrone V, Caputo CG, Sammarco MG , ve ark. Artificial intelligence with chatgpt 4: A large language model in support of ocular oncology cases. Int Ophthalmol. 2025; 45: 59.

Guo H, Liu Y, Gu J, Wang Y, Liu L, Zhang P , ve ark. Endostatin inhibits the growth and migration of 4t1 mouse breast cancer cells by skewing macrophage polarity toward the m1 phenotype. Cancer Immunol Immunother. 2016; 65: 677-688.

Hald Albertsen C, Kulkarni JA, Witzigmann D, Lind M, Petersson K, Simonsen JB. The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2022; 188: 114416.

Hamimed S, Jabberi M, Chatti A. Nanotechnology in drug and gene delivery. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2022; 395: 769-787.

Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. Cancer Discov. 2022; 12: 31-46.

Harada T, Nagai K, Mase K, Tsunoda R, Iseki K, Moriyama T , ve ark. Elevated crude mortality in obese chronic kidney disease patients with loss of exercise habit: A cohort study of the japanese general population. Intern Med. 2023; 62: 2171-2179.

Herndon ME, Ayers M, Gibson-Corley KN, Wendt MK, Wallrath LL, Henry MD , ve ark. The highly metastatic 4t1 breast carcinoma model possesses features of a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. Dis Model Mech. 2024; 17.

Higgins LJ, Hwang GL, Rosenberg J, Katzenberg RH, Kothary N, Sze DY , ve ark. In vitro design and characterization of the nonviral gene delivery vector iopamidol, protamine, ethiodized oil reagent. J Vasc Interv Radiol. 2011; 22: 1457-1463 e1452.

Hong R, Xu B. Breast cancer: An up-to-date review and future perspectives. Cancer Commun (Lond). 2022; 42: 913-936.

Hsieh LC, Le TK, Hu FC, Chen YT, Hsieh S, Wu CC , ve ark. Targeted colorectal cancer treatment: In vitro anti-cancer effects of carnosine nanoparticles supported by agar and magnetic iron oxide. Eur J Pharm Biopharm. 2024; 203: 114477.

Hu Y, Nie W, Lyu L, Zhang X, Wang W, Zhang Y , ve ark. Tumor-microenvironment-activatable nanoparticle mediating immunogene therapy and m2 macrophage-targeted inhibitor for synergistic cancer immunotherapy. ACS Nano. 2024; 18: 3295-3312.

Hung SK, Yang HJ, Lee MS, Liu DW, Chen LC, Chew CH , ve ark. Molecular subtypes of breast cancer predicting clinical benefits of radiotherapy after breast-conserving surgery: A propensity-score-matched cohort study. Breast Cancer Res. 2023; 25: 149.

Islami F, Guerra CE, Minihan A, Yabroff KR, Fedewa SA, Sloan K , ve ark. American cancer society's report on the status of cancer disparities in the united states, 2021. CA Cancer J Clin. 2022; 72: 112-143.

Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: From starving tumors to alleviating hypoxia. Cancer Cell. 2014; 26: 605-622.

Jallah JK, Dweh TJ, Anjankar A, Palma O. A review of the advancements in targeted therapies for breast cancer. Cureus. 2023; 15: e47847.

Javid H, Oryani MA, Rezagholinejad N, Esparham A, Tajaldini M, Karimi-Shahri M. Rgd peptide in cancer targeting: Benefits, challenges, solutions, and possible integrin-rgd interactions. Cancer Med. 2024; 13: e6800.

Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL. Antiangiogenic therapy in oncology: Current status and future directions. Lancet. 2016; 388: 518-529.

Jiang T, Gonzalez KM, Cordova LE, Lu J. Nanotechnology-enabled gene delivery for cancer and other genetic diseases. Expert Opin Drug Deliv. 2023; 20: 523-540.

Josefsson A, Cortez AG, Yu J, Majumdar S, Bhise A, Hobbs RF , ve ark. Evaluation of targeting alpha(v)beta(3) in breast cancers using rgd peptide-based agents. Nucl Med Biol. 2024; 128-129: 108880.

June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S, Milone MC. Car t cell immunotherapy for human cancer. Science. 2018; 359: 1361-1365.

Kalnina Z, Lieknina I, Kotelovica S, Petrovska R, Zvinys G, Petrosiute A , ve ark. Development of 4t1 breast cancer mouse model system for preclinical carbonic anhydrase ix studies. FEBS Open Bio. 2025.

Kanvinde S, Kulkarni T, Deodhar S, Bhattacharya D, Dasgupta A. Non-viral vectors for delivery of nucleic acid therapies for cancer. BioTech (Basel). 2022; 11.

Ke X, Lin W, Li X, Wang H, Xiao X, Guo Z. Synergistic dual-modified liposome improves targeting and therapeutic efficacy of bone metastasis from breast cancer. Drug Deliv. 2017; 24: 1680-1689.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. N Engl J Med. 2008; 358: 2039-2049.

Khabazian E, Vakhshiteh F, Norouzi P, Fatahi Y, Dinarvand R, Atyabi F. Cationic liposome decorated with cyclic rgd peptide for targeted delivery of anti-stat3 sirna to melanoma cancer cells. J Drug Target. 2022; 30: 522-533.

Kim EJ, Choi MR, Park H, Kim M, Hong JE, Lee JY , ve ark. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4t1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant balb/c mice. Breast Cancer Res. 2011; 13: R78.

Kim J, Harper A, McCormack V, Sung H, Houssami N, Morgan E , ve ark. Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. Nat Med. 2025; 31: 1154-1162.

Kim J, Park J, Song SY, Kim E. Advanced therapy medicinal products for autologous chondrocytes and comparison of regulatory systems in target countries. Regen Ther. 2022; 20: 126-137.

Kim M, Hwang Y, Lim S, Jang HK, Kim HO. Advances in nanoparticles as non-viral vectors for efficient delivery of crispr/cas9. Pharmaceutics. 2024; 16.

Krupka M, Piotrowicz-Cieslak AI. Optimization of the method for isolating bacterial DNA from the aboveground part of lettuce. Int J Mol Sci. 2024; 25.

Kullberg M, McCarthy R, Anchordoquy TJ. Systemic tumor-specific gene delivery. J Control Release. 2013; 172: 730-736.

Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. J Control Release. 2012; 161: 175-187.

Lauring AS, Malani PN. Variants of sars-cov-2. JAMA. 2021.

Lee H, Rho WY, Kim YH, Chang H, Jun BH. Crispr-cas9 gene therapy: Non-viral delivery and stimuli-responsive nanoformulations. Molecules. 2025; 30.

Li J, Wang Q, Han Y, Jiang L, Lu S, Wang B , ve ark. Development and application of nanomaterials, nanotechnology and nanomedicine for treating hematological malignancies. J Hematol Oncol. 2023a; 16: 65.

Li J, Zeng H, Li L, Song M, Dong M. Biomembrane-wrapped gene delivery nanoparticles for cancer therapy. Front Bioeng Biotechnol. 2023b; 11: 1211753.

Li J, Zhang H, Mao X, Deng H, Fan L, Yue L , ve ark. Preparation, in vitro anti-tumour activity and in vivo pharmacokinetics of rgd-decorated liposomes loaded with shikonin. Pharm Dev Technol. 2024; 29: 153-163.

Li L, Hu S, Chen X. Non-viral delivery systems for crispr/cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. Biomaterials. 2018; 171: 207-218.

Li L, Yang WW, Xu DG. Stimuli-responsive nanoscale drug delivery systems for cancer therapy. J Drug Target. 2019; 27: 423-433.

Li M, Cui X, Wei F, Li C, Han X. Rgd peptide modified erythrocyte membrane/porous nanoparticles loading mir-137 for nir-stimulated theranostics of glioblastomas. Nanomaterials (Basel). 2022a; 12.

Li Q, Li M, Zheng K, Tang S, Ma S. Expression pattern analysis and drug differential sensitivity of cancer-associated fibroblasts in triple-negative breast cancer. Transl Oncol. 2021; 14: 100891.

Li Z, Zhang XQ, Ho W, Bai X, Jaijyan DK, Li F , ve ark. Lipid-polymer hybrid "particle-in-particle" nanostructure gene delivery platform explored for lyophilizable DNA and mrna covid-19 vaccines. Adv Funct Mater. 2022b; 32: 2204462.

Liang L, Yue Z, Du W, Li Y, Tao H, Wang D , ve ark. Molecular imaging of inducible vegf expression and tumor progression in a breast cancer model. Cell Physiol Biochem. 2017; 42: 407-415.

Liao L, Cen B, Li G, Wei Y, Wang Z, Huang W , ve ark. A bivalent cyclic rgd-sirna conjugate enhances the antitumor effect of apatinib via co-inhibiting vegfr2 in non-small cell lung cancer xenografts. Drug Deliv. 2021; 28: 1432-1442.

Limeres MJ, Sune-Pou M, Prieto-Sanchez S, Moreno-Castro C, Nusblat AD, Hernandez-Munain C , ve ark. Development and characterization of an improved formulation of cholesteryl oleate-loaded cationic solid-lipid nanoparticles as an efficient non-viral gene delivery system. Colloids Surf B Biointerfaces. 2019; 184: 110533.

Lin L, Hu Y, Guo Z, Chen J, Sun P, Tian H , ve ark. Gene-guided ox40l anchoring to tumor cells for synergetic tumor "self-killing" immunotherapy. Bioact Mater. 2023; 25: 689-700.

Liu S, Liu H, Sun H, Deng S, Yue L, Weng Z , ve ark. (crgd)2 peptides modified nanoparticles increase tumor-targeting therapeutic effects by co-delivery of albendazole and iodine-131. Anticancer Drugs. 2022; 33: 19-29.

Liu X, Wang W, Samarsky D, Liu L, Xu Q, Zhang W , ve ark. Tumor-targeted in vivo gene silencing via systemic delivery of crgd-conjugated sirna. Nucleic Acids Res. 2014; 42: 11805-11817.

Lopez-Garcia J, Lehocky M, Humpolicek P, Saha P. Hacat keratinocytes response on antimicrobial atelocollagen substrates: Extent of cytotoxicity, cell viability and proliferation. J Funct Biomater. 2014; 5: 43-57.

Malekian S, Rahmati M, Sari S, Kazemimanesh M, Kheirbakhsh R, Muhammadnejad A , ve ark. Expression of diverse angiogenesis factor in different stages of the 4t1 tumor as a mouse model of triple-negative breast cancer. Adv Pharm Bull. 2020; 10: 323-328.

Mantooth SM, Abdou Y, Saez-Ibanez AR, Upadhaya S, Zaharoff DA. Intratumoral delivery of immunotherapy to treat breast cancer: Current development in clinical and preclinical studies. Front Immunol. 2024; 15: 1385484.

Mardhiah Adib Z, Ghanbarzadeh S, Kouhsoltani M, Yari Khosroshahi A, Hamishehkar H. The effect of particle size on the deposition of solid lipid nanoparticles in different skin layers: A histological study. Adv Pharm Bull. 2016; 6: 31-36.

Mas-Moruno C, Rechenmacher F, Kessler H. Cilengitide: The first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. Anticancer Agents Med Chem. 2010; 10: 753-768.

Mathew B, Ramanathan R, Delvaux NA, Poliskey J, Rice KG. Heat-shrinking DNA nanoparticles for in vivo gene delivery. Gene Ther. 2020; 27: 196-208.
McGrath E, Machalik P. The regulatory framework for car-t cells in europe: Current status and foreseeable changes and centre qualification by competent authorities and manufacturers. In N Kroger, J Gribben, C Chabannon, I Yakoub-Agha, H Einsele (Eds.), The ebmt/eha car-t cell handbook. Cham (CH); 2022, p. 191-198.
Mendes D, Alves C, Afonso N, Cardoso F, Passos-Coelho JL, Costa L , ve ark. The benefit of her2-targeted therapies on overall survival of patients with metastatic her2-positive breast cancer--a systematic review. Breast Cancer Res. 2015; 17: 140.
Mendes R, Fernandes AR, Baptista PV. Gold nanoparticle approach to the selective delivery of gene silencing in cancer-the case for combined delivery? Genes (Basel). 2017; 8.
Mendonca MCP, Kont A, Kowalski PS, O'Driscoll CM. Design of lipid-based nanoparticles for delivery of therapeutic nucleic acids. Drug Discov Today. 2023; 28: 103505.
Mesa-Eguiagaray I, Wild SH, Williams LJ, Jin K, Bird SM, Brewster DH , ve ark. Breast cancer-specific survival by molecular subtype in different age groups of women in scotland. Breast Cancer Res. 2025; 27: 59.
Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR , ve ark. Hyaluronan-cd44 interactions as potential targets for cancer therapy. FEBS J. 2011; 278: 1429-1443.
Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugonda VM. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. Int J Nanomedicine. 2019; 14: 1937-1952.
Nabors LB, Fink KL, Mikkelsen T, Grujicic D, Tarnawski R, Nam DH , ve ark. Two cilengitide regimens in combination with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and unmethylated mgmt gene promoter: Results of the open-label, controlled, randomized phase ii core study. Neuro Oncol. 2015; 17: 708-717.
Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Adv Biomed Res. 2012; 1: 27.
Nemeth Z, Csoka I, Semnani Jazani R, Sipos B, Haspel H, Kozma G , ve ark. Quality by design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. Pharmaceutics. 2022; 14.
Niidome T, Huang L. Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors. Gene Ther. 2002; 9: 1647-1652.
Oh JM, Venters CC, Di C, Pinto AM, Wan L, Younis I , ve ark. U1 snrnp regulates cancer cell migration and invasion in vitro. Nat Commun. 2020; 11: 1.
Okami K, Fumoto S, Yamashita M, Nakashima M, Miyamoto H, Kawakami S , ve ark. One-step formation method of plasmid DNA-loaded, extracellular vesicles-mimicking lipid nanoparticles based on nucleic acids dilution-induced assembly. Cells. 2024; 13.
Okarvi SM, Maliki Y. Preparation and preclinical evaluation of (18)f-labeled folate-rgd peptide conjugate for pet imaging of triple-negative breast carcinoma. EJNMMI Radiopharm Chem. 2025; 10: 25.

Pally D, Kapoor N, Naba A. The novel ecm protein sned1 mediates cell adhesion via the rgd-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3. bioRxiv. 2024.

Pan HR, Tian M, Xue JB, Li SM, Luo XC, Huang X , ve ark. Mammalian taste bud cells utilize extragemmal 5-hydroxy-l-tryptophan to biosynthesize the neurotransmitter serotonin. Front Cell Neurosci. 2018; 12: 461.

Park J, Singha K, Son S, Kim J, Namgung R, Yun CO , ve ark. A review of rgd-functionalized nonviral gene delivery vectors for cancer therapy. Cancer Gene Ther. 2012; 19: 741-748.

Patel MN, Tiwari S, Wang Y, O'Neill S, Wu J, Omo-Lamai S , ve ark. Enabling non-viral DNA delivery using lipid nanoparticles co-loaded with endogenous anti-inflammatory lipids. bioRxiv. 2024.

Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, Xia Y, Mihai C, Griffith JP, 3rd , ve ark. Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mrna. Nat Commun. 2020; 11: 983.

Pettan-Brewer C, Goh J, Ladiges WC. An immunohistochemical approach for monitoring effects of exercise on tumor stromal cells in old mice. Pathobiol Aging Age Relat Dis. 2014; 4.

Ponde NF, Zardavas D, Piccart M. Progress in adjuvant systemic therapy for breast cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2019; 16: 27-44.

Pridgen EM, Alexis F, Kuo TT, Levy-Nissenbaum E, Karnik R, Blumberg RS , ve ark. Transepithelial transport of fc-targeted nanoparticles by the neonatal fc receptor for oral delivery. Sci Transl Med. 2013; 5: 213ra167.

Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4t1 breast tumor model. Curr Protoc Immunol. 2001; Chapter 20: Unit 20 22.

Qi J, Zhou L, Li D, Yang J, Wang H, Cao H , ve ark. Oncogenic role of alx3 in cervical cancer cells through kdm2b-mediated histone demethylation of cdc25a. BMC Cancer. 2021; 21: 819.

Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. Pharmacol Rev. 2002; 54: 561-587.

Qin J, Xue L, Gong N, Zhang H, Shepherd SJ, Haley RM , ve ark. Rgd peptide-based lipids for targeted mrna delivery and gene editing applications. RSC Adv. 2022; 12: 25397-25404.

Rangger C, Helbok A, von Guggenberg E, Sosabowski J, Radolf T, Prassl R , ve ark. Influence of pegylation and rgd loading on the targeting properties of radiolabeled liposomal nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2012; 7: 5889-5900.

Rashid OM, Nagahashi M, Ramachandran S, Dumur C, Schaum J, Yamada A , ve ark. An improved syngeneic orthotopic murine model of human breast cancer progression. Breast Cancer Res Treat. 2014; 147: 501-512.

Reardon DA, Nabors LB, Stupp R, Mikkelsen T. Cilengitide: An integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. Expert Opin Investig Drugs. 2008; 17: 1225-1235.

Recht A, Comen EA, Fine RE, Fleming GF, Hardenbergh PH, Ho AY , ve ark. Postmastectomy radiotherapy: An american society of clinical oncology, american society for radiation oncology, and society of surgical oncology focused guideline update. Ann Surg Oncol. 2017; 24: 38-51.

Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N , ve ark. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline brca mutation. N Engl J Med. 2017; 377: 523-533.

Rodrigues-Ferreira S, Nahmias C. Predictive biomarkers for personalized medicine in breast cancer. Cancer Lett. 2022; 545: 215828.

Rodriguez-Loya J, Lerma M, Gardea-Torresdey JL. Dynamic light scattering and its application to control nanoparticle aggregation in colloidal systems: A review. Micromachines (Basel). 2023; 15.

Roskoski R, Jr. Cost in the united states of fda-approved small molecule protein kinase inhibitors used in the treatment of neoplastic and non-neoplastic diseases. Pharmacol Res. 2024; 199: 107036.

Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Ohga N , ve ark. Rnai-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of rccs using a cyclic rgd-modified liposomal-sirna system. J Control Release. 2014; 173: 110-118.

Salmikangas P, Schuessler-Lenz M, Ruiz S, Celis P, Reischl I, Menezes-Ferreira M , ve ark. Marketing regulatory oversight of advanced therapy medicinal products (atmps) in europe: The ema/cat perspective. Adv Exp Med Biol. 2015; 871: 103-130.

ŞALVA E. İkİ farkli gene (vegf-a ve vegfr-2) Özgü shrna İçeren vektör tasarimi ve bunun meme kanserinde gen susturma etkinliğİnin araştirilmasi. yüksek lisans, 2019,

Sasaki Y, Shobugawa Y, Nozaki I, Takagi D, Nagamine Y, Funato M , ve ark. Rural-urban differences in the factors affecting depressive symptoms among older adults of two regions in myanmar. Int J Environ Res Public Health. 2021; 18.

Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H , ve ark. Atezolizumab and nab-paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. N Engl J Med. 2018; 379: 2108-2121.

Schwartz SM. Epidemiology of cancer. Clin Chem. 2024; 70: 140-149.

Seo Y, Lim H, Park H, Yu J, An J, Yoo HY , ve ark. Recent progress of lipid nanoparticles-based lipophilic drug delivery: Focus on surface modifications. Pharmaceutics. 2023; 15.

Shamay Y, Elkabets M, Li H, Shah J, Brook S, Wang F , ve ark. P-selectin is a nanotherapeutic delivery target in the tumor microenvironment. Sci Transl Med. 2016; 8: 345ra387.

Shi X, Bortolussi G, Collaud F, Le Brun PR, Bloemendaal LT, Guerchet N , ve ark. Repeated dosing of aav-mediated liver gene therapy in juvenile rat and mouse models of crigler-najjar syndrome type i. Mol Ther Methods Clin Dev. 2024a; 32: 101363.

Shi X, Wang X, Yao W, Shi D, Shao X, Lu Z , ve ark. Mechanism insights and therapeutic intervention of tumor metastasis: Latest developments and perspectives. Signal Transduct Target Ther. 2024b; 9: 192.

Shokoohi M, Sedaghatshoar S, Arian H, Mokarami M, Habibi F, Bamarinejad F. Genetic advancements in breast cancer treatment: A review. Discov Oncol. 2025; 16: 127.

Shtykalova S, Deviatkin D, Freund S, Egorova A, Kiselev A. Non-viral carriers for nucleic acids delivery: Fundamentals and current applications. Life (Basel). 2023; 13.

Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, Sung H, Jemal A. Cancer statistics, 2025. CA Cancer J Clin. 2025; 75: 10-45.

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. CA Cancer J Clin. 2023; 73: 17-48.

Silva AL, Alexandrino F, Verissimo LM, Agnez-Lima LF, Egito LC, de Oliveira AG , ve ark. Physical factors affecting plasmid DNA compaction in stearylamine-containing nanoemulsions intended for gene delivery. Pharmaceuticals (Basel). 2012; 5: 643-654.

Simpson E, Sarwar H, Jack I, Lowry D. Evaluation of the potential of chitosan nanoparticles as a delivery vehicle for gentamicin for the treatment of osteomyelitis. Antibiotics (Basel). 2024; 13.

Sofias AM, Toner YC, Meerwaldt AE, van Leent MMT, Soultanidis G, Elschot M , ve ark. Tumor targeting by alpha(v)beta(3)-integrin-specific lipid nanoparticles occurs via phagocyte hitchhiking. ACS Nano. 2020; 14: 7832-7846.

Soundararajan R, Sayat R, Robertson GS, Marignani PA. Triptolide: An inhibitor of a disintegrin and metalloproteinase 10 (adam10) in cancer cells. Cancer Biol Ther. 2009; 8: 2054-2062.

Srivatsan A, Ethirajan M, Pandey SK, Dubey S, Zheng X, Liu TH , ve ark. Conjugation of crgd peptide to chlorophyll a based photosensitizer (hpph) alters its pharmacokinetics with enhanced tumor-imaging and photosensitizing (pdt) efficacy. Mol Pharm. 2011; 8: 1186-1197.

Stupp R, Hegi ME, Gorlia T, Erridge SC, Perry J, Hong YK , ve ark. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated mgmt promoter (centric eortc 26071-22072 study): A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014; 15: 1100-1108.

Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor. Adv Drug Deliv Rev. 2000; 41: 147-162.

Sufian MA, Ilies MA. Lipid-based nucleic acid therapeutics with in vivo efficacy. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2023; 15: e1856.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A , ve ark. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021; 71: 209-249.

Sydlowski SA, King M, Petter K, Bachmann ML. Functional assessment of hearing aid benefit: Incorporating verification and aided speech recognition testing into routine practice. Semin Hear. 2021; 42: 365-372.

Taghdiri M, Mussolino C. Viral and non-viral systems to deliver gene therapeutics to clinical targets. Int J Mol Sci. 2024; 25.

Taori VP, Liu Y, Reineke TM. DNA delivery in vitro via surface release from multilayer assemblies with poly(glycoamidoamine)s. Acta Biomater. 2009; 5: 925-933.

Templeton NS, Senzer N. Optimization of non-viral gene therapeutics using bilamellar invaginated vesicles. J Genet Syndr Gene Ther. 2011.

Thomas M, Klibanov AM. Non-viral gene therapy: Polycation-mediated DNA delivery. Appl Microbiol Biotechnol. 2003; 62: 27-34.

Thuc Nguyen TM, Dinh Le R, Nguyen CV. Breast cancer molecular subtype and relationship with clinicopathological profiles among vietnamese women: A retrospective study. Pathol Res Pract. 2023; 250: 154819.
Tian X, Srinivasan PR, Tajiknia V, Sanchez Sevilla Uruchurtu AF, Seyhan AA, Carneiro BA , ve ark. Targeting apoptotic pathways for cancer therapy. J Clin Invest. 2024; 134.
Tietze R, Zaloga J, Unterweger H, Lyer S, Friedrich RP, Janko C , ve ark. Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. Biochem Biophys Res Commun. 2015; 468: 463-470.
Uchida S. Delivery systems of plasmid DNA and messenger rna for advanced therapies. Pharmaceutics. 2022; 14.
Ultimescu F, Hudita A, Popa DE, Olinca M, Muresean HA, Ceausu M , ve ark. Impact of molecular profiling on therapy management in breast cancer. J Clin Med. 2024; 13.
Unnikrishnan G, Joy A, Megha M, Kolanthai E, Senthilkumar M. Exploration of inorganic nanoparticles for revolutionary drug delivery applications: A critical review. Discov Nano. 2023; 18: 157.
Untch M, Rezai M, Loibl S, Fasching PA, Huober J, Tesch H , ve ark. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in her2-positive breast cancer: Results from the geparquattro study. J Clin Oncol. 2010; 28: 2024-2031.
Vaseghi G, Rafiee L, Javanmard SH. Non-viral delivery systems for breast cancer gene therapy. Curr Gene Ther. 2017; 17: 147-153.
von Fritschen M, Janosz E, Blume C, Jagle U, Keating K, Schneider CK. What's in a word? Defining "gene therapy medicines". Mol Ther Methods Clin Dev. 2024; 32: 101348.
von Minckwitz G, Huang CS, Mano MS, Loibl S, Mamounas EP, Untch M , ve ark. Trastuzumab emtansine for residual invasive her2-positive breast cancer. N Engl J Med. 2019; 380: 617-628.
Wang B, Tang D, Cui J, Jiang H, Yu J, Guo Z. Rgd-based self-assembling nanodrugs for improved tumor therapy. Front Pharmacol. 2024a; 15: 1477409.
Wang C, Pan C, Yong H, Wang F, Bo T, Zhao Y , ve ark. Emerging non-viral vectors for gene delivery. J Nanobiotechnology. 2023; 21: 272.
Wang DY, Jiang Z, Ben-David Y, Woodgett JR, Zacksenhaus E. Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes. Sci Rep. 2019; 9: 19107.
Wang F, Xu P, Xie KC, Chen XF, Li CY, Huang Q. Effects of tumor microenviromental factors on vegf expression. Biomed Rep. 2013; 1: 539-544.
Wang HL, Wang ZG, Liu SL. Lipid nanoparticles for mrna delivery to enhance cancer immunotherapy. Molecules. 2022a; 27.
Wang K, Huang Q, Qiu F, Sui M. Non-viral delivery systems for the application in p53 cancer gene therapy. Curr Med Chem. 2015; 22: 4118-4136.
Wang R, Huang X, Chen X, Zhang Y. Nanoparticle-mediated immunotherapy in triple-negative breast cancer. ACS Biomater Sci Eng. 2024b; 10: 3568-3598.
Wang Y, Zhang R, Tang L, Yang L. Nonviral delivery systems of mrna vaccines for cancer gene therapy. Pharmaceutics. 2022b; 14.
Wei W, Sun J, Guo XY, Chen X, Wang R, Qiu C , ve ark. Microfluidic-based holonomic constraints of sirna in the kernel of lipid/polymer hybrid nanoassemblies for

improving stable and safe in vivo delivery. ACS Appl Mater Interfaces. 2020; 12: 14839-14854.
Wifvat K, Camacho ET, Kawski M, Leveillard T, Wirkus S. Optimal control with rdcvfl for degenerating photoreceptors. Bull Math Biol. 2024; 86: 29.
Wu S, Wu Z, Lu Z, Qi F, Cheng J, Chu T , ve ark. Selective apoptosis of tumor-associated platelets boosts the anti-metastatic potency of pd-1 blockade therapy. Cell Rep Med. 2025; 6: 101984.
Wu Y, Zeng C, Lv J, Li H, Gao J, Liu Z , ve ark. Tumor-targeted crgd-coated liposomes encapsulating optimized synergistic cepharanthine and ir783 for chemotherapy and photothermal therapy. Int J Nanomedicine. 2024; 19: 6145-6160.
Xia W, Tao Z, Zhu B, Zhang W, Liu C, Chen S , ve ark. Targeted delivery of drugs and genes using polymer nanocarriers for cancer therapy. Int J Mol Sci. 2021; 22.
Xu X, Wu J, Liu Y, Yu M, Zhao L, Zhu X , ve ark. Ultra-ph-responsive and tumor-penetrating nanoplatform for targeted sirna delivery with robust anti-cancer efficacy. Angew Chem Int Ed Engl. 2016; 55: 7091-7094.
Yamamoto A, Huang Y, Krajina BA, McBirney M, Doak AE, Qu S , ve ark. Metastasis from the tumor interior and necrotic core formation are regulated by breast cancer-derived angiopoietin-like 7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023; 120: e2214888120.
Yang C, Ma H, Liang Z, Zhuang Y, Hu L, Zhang K , ve ark. Cyclic rgd modified dextran-quercetin polymer micelles for targeted therapy of breast cancer. Int J Biol Macromol. 2025; 308: 142272.
Yang NJ, Liu DV, Sklaviadis D, Gui DY, Vander Heiden MG, Wittrup KD. Antibody-mediated neutralization of perfringolysin o for intracellular protein delivery. Mol Pharm. 2015; 12: 1992-2000.
Yao P, Wang X, Wang Q, Dai Q, Peng Y, Yuan Q , ve ark. Cyclic rgd-functionalized ph/ros dual-responsive nanoparticle for targeted breast cancer therapy. Pharmaceutics. 2023; 15.
Yousefpour Marzbali M, Yari Khosroushahi A. Polymeric micelles as mighty nanocarriers for cancer gene therapy: A review. Cancer Chemother Pharmacol. 2017; 79: 637-649.
Zhang L, Hsia J, Tu X, Xia Y, Zhang L, Bi Z , ve ark. Exposure to secondhand tobacco smoke and interventions among pregnant women in china: A systematic review. Prev Chronic Dis. 2015a; 12: E35.
Zhang L, Zhu D, Dong X, Sun H, Song C, Wang C , ve ark. Folate-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted paclitaxel delivery. Int J Nanomedicine. 2015b; 10: 2101-2114.
Zhang Y, Zhang GL, Sun X, Cao KX, Ma C, Nan N , ve ark. Establishment of a murine breast tumor model by subcutaneous or orthotopic implantation. Oncol Lett. 2018; 15: 6233-6240.
Zhang Y, Zhang M, Fang Q. Scoping review of eeg studies in construction safety. Int J Environ Res Public Health. 2019; 16.
Zhao C, Zhou B. Polyethyleneimine-based drug delivery systems for cancer theranostics. J Funct Biomater. 2022; 14.
Zhao Y, Lin D, Wu F, Guo L, He G, Ouyang L , ve ark. Discovery and in vivo evaluation of novel rgd-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles for targeted drug delivery. Int J Mol Sci. 2014; 15: 17565-17576.

Zhao Z, Ukidve A, Kim J, Mitragotri S. Targeting strategies for tissue-specific drug delivery. Cell. 2020; 181: 151-167.

Zhu X, Lei J, Jiang C, Fang Z, Zhang W, Yang Z , ve ark. Two-dimensional graphene nanomaterials for combined photothermal and chemotherapy-enhanced targeted therapy of breast cancer. Mater Today Bio. 2025; 32: 101668.

Zintchenko A, Philipp A, Dehshahri A, Wagner E. Simple modifications of branched pei lead to highly efficient sirna carriers with low toxicity. Bioconjug Chem. 2008; 19: 1448-1455.

Zou C, Tang Y, Zeng P, Cui D, Amili MA, Chang Y , ve ark. Crgd-modified nanoparticles of multi-bioactive agent conjugate with ph-sensitive linkers and pd-l1 antagonist for integrative collaborative treatment of breast cancer. Nanoscale Horiz. 2023; 8: 870-886.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	**Büşra**
Soyadı	**CESUR ERGÜN**

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		**Mezuniyet yılı**
Lise	**Antalya Anadolu Lisesi (AAL)**	**2011**
Lisans	**Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/ Eczacılık**	**2016**
Lisans	**Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi/ İşletme**	**2019**
Yüksek Lisans	**Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi/ Tıbbi Farmakoloji (Tezli)**	**2019**
Doktora	**Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi/ Tıbbi Farmakoloji (Tezli)**	**Devam ediyor**

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre**
Stajyer	**Akdeniz Üniversitesi Hastane Eczanesi**	**2012-2013**
Stajyer	**Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi Eczanesi**	**2015-2016**
Araştırma Görevlisi	**Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**	**2018- devam ediyor**
Erasmus Traineeship	**University of Parma, Italy**	**2024 (Mart-Haziran)**

Yabancı Dilleri	Kurum	Puanı/ Seviyesi
İngilizce	**Yökdil**	**87,5**
Rusça	**Meb Onaylı**	**A1**

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Meme Kanseri Gen Tedavisi Tıbbi Ürünleri İçin Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi	**BAP-YL**	**07.03.2019- 27.12.2019**
STAT-3 gen ekspresyonunu susturan shRNA taşıyıcı nano sistemlerin geliştirilmesi ve etkinliklerinin meme kanseri hücrelerinde değerlendirilmesi	**NAP**	**05.12.2022- 05.12.2024**
Meme Kanseri Tedavisi İçin Rgd Hedefli Gen Taşıyıcı Nanosistemlerin Tasarımı *İn Vitro* ve *İn Vivo* Değerlendirilmesi	**BAP-DR**	**18.01.2024-devam ediyor**

Burslar-Ödüller:

1) BIDEB Supports, Büşra Cesur-Ergün, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-C Domestic Master's Scholarship Program for Priority Areas, Scholarship finished (Graduated), 2018 - 2, 10/1/18 - 9/30/19.

2) BIDEB Supports, Büşra Cesur-Ergün, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-C Domestic PhD Scholarship Program for Priority Areas, Scholarship (2022- Continues), Awarded with scholarship, 2022- 2, 10/1/22 - 9/30/25. International.
3) 1st Place Winner, Young Investigator Award, Awarded Institution: Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Turkey, 25 April 2019.

Yayınlar ve Bildiriler:

1) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Gene therapy in cancer, Journal of Gene Medicine, 2023 ISSN: 1521-2254, Page: e3550.
2) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Gut Microbiota: Formation, Lifelong Development and Relation to Cytochrome P450 System, Diseases, Drug Bioavailability and Drug Interactions, European Journal of Therapeutics, 2020, 2564-7040.
3) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Non-Biological Complex Drugs, Turkish Journal of Hygiene and Experimental Biology, 2019, 0377-9777.

Bildiriler

1) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Development and evaluation of nanoniosomes for gene delivery to breast cancer cells, Poster Presentation, 17th Annual Meeting of the Korean Society of Medical Oncology and 2024 International Conference, 26-27 September 2024, Kore.
2) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Preparation and Evaluation of Novel Cationic Niosomes for Efficient Gene Delivery to Breast Cancer Cells, ESGCT/SFTCG/ NVGCT Collaborative Congress -Brussels, Belgium-24-27 October2023.
3)B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Formulation and Cytotoxicity Evaluation of Ternary Complexes as Non-Viral Gene Delivery System, Oral Presentation, International Biotechnology Congress Bio Turkey 2021, 09 September- 11 September 2021.
4) D. Demir-Dora, B. Cesur-Ergün & F. Öner, Chitosan-Based Vector/ DNA Complexes For Gene Delivery to HEK 293-T Cells, Oral Presentation, BIO Turkey International Biotechnology Congress, 05 March- 07 March 2020.
5) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Preparation and Safety Evaluation of Nanoniosomes for Biotechnology-derived Medicinal Products and Cosmetics, Oral

Presentation, 8. International Drug Chemistry Conference, 27 February 2020, 01 March 2020.

6) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Development of Nano-sized Non-viral DNA Delivery System for Gene Therapy Purposes, Poster Presentation, ESGCT 27th Annual Congress in collaboration with SETGYC, 22 October 2019- 25 October 2019.

7) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Nanocarriers As Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems: Development And Evaluation, Oral Presentation, Eurasian Congress of Molecular Biotechnology (ECOMB 2019), 19 September 2019- 21 September 2019.

8) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Preparation and Characterisation of NanoNiosomes for Delivery of DNA-Based Therapeutics, Oral Presentation, Eurasian Congress of Molecular Biotechnology (ECOMB 2019), 19 September 2019, 21 September 2019.

9) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Polymersomes: Nanocarriers For Gene Delivery To Human Embryonic Kidney Cells, Oral Presentation, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research & Development (DRD 2019), 01 July 2019- 03 July 2019.

10) B. Cesur-Ergün & D. Demir-Dora, Preparation and Cytotoxicity Evaluation of Nanovesicular gene Delivery Systems, Oral Presentation, 2nd International Health Science And Life Congress (IHSLC 2019), 24 April 2019- 27 April 2019.

11) D. Demir-Dora, B. Cesur-Ergün & F. Öner, Effect of Niosome Preparation Techniques on Physicochemical Properties of Niosome/ pDNA Complexes (Nioplexes), Poster Presentation, İVEK BİO- International İVEK BİO Congress, 26 November 2018- 28 November 2018.

11) D. Demir-Dora, B. Cesur-Ergün & F. Öner, Formulation and Evaluation of Nano-Niosomes as Gene Delivery Systems, Oral Presentation, İVEK BİO- International İVEK BİO Congress, 26 November 2018- 28 November 2018.

Kitap Bölümü

B. Cesur-Ergün, Deneysel Nöropatik Ağrının Hayvan Modelleri, G. AKÇAY & A. AĞAR [Editörler], Nörolojik Hastalıkların Deneysel Hayvan Modelleri (85-104), ISBN: 9786258155754, Türkiye: Akademisyen Yayınevi, 28 Haziran 2022, Kitap içinde Bölüm.