

NANOBOYUTLU POLİMERİK MİSELLER SİSTEMLER İLE GEN TEDAVİSİNE YÖNELİK YAKLAŞIMLAR

GENE THERAPY APPROACHES FOR POLYMERIC MICELLES WITH NANOSCALE SYSTEMS

ASLI KARA

PROF. DR. İMRAN VURAL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

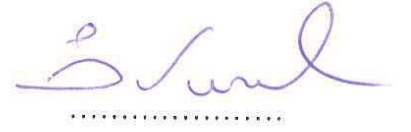
2018

ASLI KARA'nın hazırladığı “Nanoboyutlu Polimerik Miseller Sistemler ile Gen Tedavisine Yönelik Yaklaşımlar” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Başkan



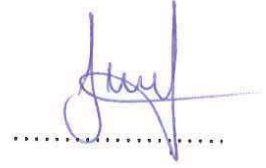
Prof. Dr. İmran VURAL
Danışman



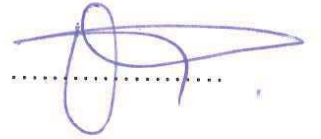
Prof. Dr. Selma ŞAHİN
Üye



Prof. Dr. Sevgi TAKKA
Üye



Prof. Dr. Sibel BOZDAĞ PEHLİVAN
Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimler Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “ **Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren Ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

03 /09 /2018

ASLI KARA



“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. Şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü ve fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7. 2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.



Canım Eşim ve Aileme..

ETİK

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

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

beyan ederim.

03.09.2018

ASLI KARA

ÖZET

NANOBOYUTLU POLİMERİK MİSELLER SİSTEMLER İLE GEN TEDAVİSİNE YÖNELİK YAKLAŞIMLAR

Aslı KARA

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İmran VURAL

Eylül 2018, 210 Sayfa

Gen tedavisi, genetik kaynaklı pek çok hastalığın tedavisinde son zamanlarda oldukça ilgi gören etkili bir tedavi yöntemidir. Gen tedavisinin başarısı, terapötik genin hedef dokuya ya da hücreye en güvenli ve başarılı bir şekilde aktarımı için verimli bir taşıyıcının geliştirilmesine bağlıdır. Son zamanlarda viral olmayan taşıyıcı sistemler arasında özellikle katyonik polimerlere dayanan polimerik sistemler biyomedikal uygulamalarda oldukça dikkat çekmektedir. Bu düşünceden yola çıkarak tez çalışmamızda, meme kanserinin apoptotik gen ile tedavisinde kullanılan terapötik BıkDD geninin meme kanseri hücrelerine başarılı bir şekilde aktarımı için biyouyumlu ve biyoparçalanır PEtOx tabanlı yeni bir blok kopolimer sentezi ile etkin bir nanotaşıyıcı sistemin hazırlanması, hazırlanan bu taşıyıcı sistemin yüksek verimlilik ile MCF-7 ve MDA-MB-468 olmak üzere iki farklı meme kanser hücrelerine aktarılması ve *in vitro* hücresel etkinliğinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmamızda küçük boyut, biyouyumluluk, yüksek yapısal stabilite, kanda uzun kalış süresi ve ayarlanabilir amfifilik özellikleri ile umut verici gen taşınma ajanları arasında yer almakta olan katyonik yapıda polimerik miseller kullanılmıştır. PEtOx tabanlı blok kopolimerler ile uygun misel formülasyonlarının üretimi ve karakterizasyonu yapılmıştır. Tez çalışmamızda, biyouyumlu ve biyoparçalanır özellikteki PEtOx polimeri misel formülasyonlarının hidrofilik bloğunu oluşturmak için kullanılmış olup, görünmez özellikteki Poli(etilen glikol)(PEG) polimerine yeni bir alternatif ajan olarak önerilmiştir. Poli(2-etil-2-oksazolin) (PEtOx)'un iki farklı oranda (%30 ve %60) kısmi hidrolizi ile elde edilen pozitif yük kaynağı lineer Poli(etilenimin)(PEI) içeren PEtOx-ko-PEI-b-PCL katyonik kopolimerler ile hazırlanan misellerin fizikokimyasal özellikleri açısından karşılaştırılması yapılmıştır. Lineer PEI'nin toksisite gibi çeşitli dezavantajlarının, çalışmamızda blok kopolimerin üretim metoduna bağlı olarak azaltılması ve PEI'in pozitif yükünden yararlanarak DNA ile sıkı kompleks oluşumu amaçlanmıştır.

İki farklı hidroliz derecesinde PEI içeren blok kopolimerlerden hazırlanan bu misellerin terapötik BikDD geni ile misel/gen kompleksleri hazırlanmış ve bu komplekslerin karakterizasyonları, stabilite çalışmaları, *in vitro* hücre canlılık analizleri, gen aktarım etkinlikleri, gen ekspresyon analizleri ve BikDD geni kaynaklı apoptotik ölüm etkinlikleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu iki farklı hidroliz derecesindeki miseller arasından %60 hidroliz derecesindeki (PPP60) miseller ile MCF-7 hücrelerinde %40 oranında apoptoz kaynaklı yüksek hücresel ölüm ve düşük sitotoksosite elde edilmiştir. Ayrıca, PPP30 miseller sistemler ile kıyaslandığında MCF-7 hücrelerine yaklaşık 6 kat daha yüksek transfeksiyon etkinliği ile aktarım tespit edilmiştir. Sonuçlar hidroliz derecesinin artmasına bağlı olarak miseller sistemlerin etkinliğinin arttığını göstermiştir.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen tüm sonuçlar, PEtOx tabanlı blok kopolimerler ile hazırlanan yeni miseller sistemlerin, meme kanserinin apoptotik gen tedavisinde ortaya koydukları başarılı sonuçları ile etkin taşıyıcı sistemler olduğunu göstermiştir. Özellikle PPP60 misel/BikDD gen formülasyonu düşük boyutu, dar polidispersite aralığı, yüksek pozitif yükü, etkili DNaz-I ve serum stabilitesi, yüksek gen kondanase etme kapasitesi, sağlıklı hücrelerdeki biyouyumluluğu, yüksek transfeksiyon etkinliği, hücre içi ekspresyonu ve apoptozu indükleyici özellikleri ile en etkili formülasyon olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, PEtOx'un kısmi hidrolizi ile sentezlenen PEI içeren blok kopolimerden yeni bir viral olmayan gen taşıyıcı miseller sistemin hazırlanması ve kanserin apoptotik gen tedavisinde terapötik gen aktarımının araştırılmasına yönelik olarak yapılmış ilk çalışma olup tezin özgün değerini oluşturmuştur. Elde edilen sonuçlar bu konuda literatüre katkıda bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: PEtOx, Polimerik miseller, Gen tedavisi, viral olmayan vektör, meme kanseri

Bu tez çalışması 213M728 proje kodlu TÜBİTAK 1003 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

GENE THERAPY APPROACHES FOR POLYMERIC MICELLAR SYSTEMS

Ash KARA

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. İmran VURAL

September, 2018, 210 Pages

Gene therapy is an effective treatment method that has received considerable attention recently in the treatment of many genetic diseases. The success of gene therapy depends on the development of an efficient carrier for the most safe and successful delivery of the therapeutic gene to the target tissue or cell. Recently, non-viral carrier systems, particularly polymeric systems based on cationic polymers, have received considerable attention in biomedical applications. In this thesis we aimed to prepare an efficient nanocarrier system with a novel biocompatible and biodegradable block copolymer synthesis for the successful transfer of the therapeutic BikDD gene used in the apoptotic gene treatment of breast cancer to the breast cancer cells. Also it is aimed to transfer this prepared carrier system to the MCF-7 and MDA-MB-468 cancer cells with high efficiency and to evaluate the *in vitro* cellular activity. In our study, cationic polymeric micelles which are among the promising gene delivery agents, have been used because of the low size, biocompatibility, high structural stability, long blood circulation time and adjustable amphiphilic properties. The production and characterization of suitable micelle formulations have been made by using PEO based block copolymers. In our thesis study, the biocompatible and biodegradable PEO polymer was used to form the hydrophilic block of micelle formulations and was proposed as a new alternative agent to the poly (ethylene glycol) (PEG) polymer with stealth feature. The physicochemical properties of the micelles which prepared by PEO-*co*-PEI-*b*-PEI cationic copolymer that contain a positive charge source linear Poly (ethyleneimine) (PEI) obtained by two different ratio (30% and 60%) with the partial hydrolysis of poly (2-ethyl-2-oxazoline) (PEO) were compared. In our study we aimed to reduce the various disadvantages of linear PEI, such as toxicity, depending on the production method of the block copolymer and the intense complex formation with DNA by utilizing the positive charge of PEI.

Micelle/gene complexes were prepared by condensing the therapeutic BikDD gene with the micelles that prepared by block copolymers which contain the two different hydrolysis degrees of PEI and these complexes were characterized by comparing their characterizations, stability studies, *in vitro* cell viability assays, gene transfection efficiencies, gene expression analyzes and BikDD gene-induced apoptotic death efficiency. Among the micelles in these two different hydrolysis degrees, % 60 hydrolysed micelles caused highest apoptosis mediated cellular death as 40% in MCF-7 cells and low cytotoxicity. In addition, when compared to PPP30 micellar systems, transfection efficiency was found to be approximately 6-fold higher in MCF-7 cells. The results showed that the efficiency of the micellar systems increased due to the increase in hydrolysis degree.

All the obtained results within this thesis study showed that the new micellar systems prepared with PEOx based block copolymers are effective carrier systems with successful results of apoptotic gene therapy in breast cancer. In particular, the PPP60 micelle / BikDD gene formulation was identified as the most effective formulation with low size, narrow polydispersity range, high positive charge, effective DNase-I and serum stability, high gene condensation capacity, bioavailability in living cells, high transfection efficiency, intracellular expression and apoptosis inducing properties

In conclusion, it was the first study to prepare a novel non-viral gene carrier micellar system from block copolymer containing PEI which synthesized by partial hydrolysis of PEOx and to investigate the therapeutic gene transfer for apoptotic gene therapy of cancer. The obtained results have contributed to the literature in this respect.

Keywords: PEOx, Polymeric micelles, Gene therapy, Non-viral vector, Breast cancer

This thesis has been supported by the support program of TÜBİTAK 1003 Priority Areas R & D Projects with 213M728 project code.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında derin bilgi, birikim ve tecrübelerini bana aktaran, karşılaştığım tüm sorunlarda çözüm odaklı olmam için mükemmel rehberliği ile bana yol gösteren, bilimsel çalışmalarımı özgürce gerçekleştirmem için her türlü imkânı sağlayan, her daim desteğini hissettiğim, güler yüzlü ve sonsuz sabırlı, çok kıymetli danışmanım Sayın Prof. Dr. İmran VURAL'a minnettarlığımı ifade etmek isterim. Tez çalışmalarım süresince deneylerimi gerçekleştirebilmem için her türlü olanağı sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı başkanları Sn. Prof. Dr. Sema Çalış ve Sn. Prof. Dr. Levent Öner'e teşekkürlerimi sunarım. Hücre kültür çalışmalarım sırasında kıymetli bilimsel bilgi, deneyim ve değerlendirmelerini benimle paylaşan, deneylerimin yürütülebilmesi için tüm olanakları sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sn. Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında her zaman destek ve katkılarını hissettiğim değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Asuman BOZKIR ve Sn. Prof. Dr. Sibel BOZDAĞ PEHLİVAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Polimerlerin sentezi ve karakterizasyonunu gerçekleştiren TÜBİTAK MAM ekibinden Sn. Dr. Özgür YILMAZ, Sevgi Gülyüz ve Umut Uğur ÖZKÖSE'ye katkılarından dolayı teşekkür ederim. Genetik materyalin çoğaltımı sırasında Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik laboratuvarının kapısını bana açan, Sn. Prof. Dr. Dilek TELCİ'ye ve gen çoğaltım çalışmalarında bana yardım eden Zeynep Büşra BOLAT'a teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın jel görüntülerini alabilmem için destek veren Sn. Doç. Dr. Ayşe ERCAN'a ve Arş. Gör. Dr. Selin ÖNCÜL'e teşekkür ederim.

Benim için her zaman bir ekip arkadaşından çok daha fazlası olan sevgili arkadaşım Naile ÖZTÜRK'e, sonsuz desteği ve dostluğu için teşekkür ederim. Bana kucak açan Farmasötik Anabilim Dalı kıymetli hocalarıma ve arkadaşlarıma, bilgi paylaşımında bulunduğumuz Umut Can ÖZ'e teşekkürlerimi sunarım. Maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim Çorum'daki ailem ve dostlarım başta Burçin ÖZÇELİK olmak üzere Bediha AKMEŞE, Tuğçe GÖVER ve Gamze ÇAĞATAY'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürütmem için 231M728 proje kodu ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca varlıkları ile her zaman güçlü olmamı sağlayan, koşulsuz yanımda olan ve destekleyen canım aileme ve bu zorlu süreçteki en büyük manevi desteğim, her türlü olumsuzlukların üstesinden gelebileceğime beni inandıran sevgili eşim, hayat ışığım Yalçın KARA'ya derin sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	xi
ŞEKİLLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Meme Kanseri	2
1.3. Gen Tedavisi	3
1.4. Gen Tedavisinin Tarihçesi	4
1.5. Gen Tedavisi Yaklaşımları	7
1.5.1. Eşey Hücre Tedavisi	7
1.5.2. Somatik Hücre Tedavisi	7
1.5.2.1. <i>Ex vivo</i> Gen Tedavisi	7
1.5.2.2. <i>In vivo</i> Gen Tedavisi	8
1.6. Meme Kanserinde Gen Tedavisi Yaklaşımları	8
1.6.1. Onkogen Aktivitesinin Baskılanması	9
1.6.2. Tümör Baskılayıcı Genler	9
1.6.3. İntihar Gen Tedavisi	9
1.6.4. Antisens Teknoloji	10
1.6.5. RNA İnterferans (RNAi) Teknolojisi	10
1.6.6. Tümör Kaynaklı Anjiyogenezin İnhibe Edilmesi	10
1.6.7. İmmünoterapi	11
1.6.8. Proapoptotik Gen Tedavisi	11
1.6.8.1. Bcl-2 Ailesi	11
1.6.8.1.1. BikDD Geni	12
1.7. Gen Tedavisinde Engeller	13
1.7.1. Gen Paketleme	14

1.7.2. Hücre Dışı Engeller	17
1.7.3. Plazma Membranı	18
1.7.4. Endo-Lizozomal Kaçış	19
1.7.5. DNA'nın Sitozolik Taşınması.....	19
1.7.6. Nükleusa Giriş.....	20
1.8. Gen Aktarım Yöntemleri	21
1.8.1. Viral Vektörler	21
1.8.2. Viral Olmayan Vektörler	23
1.8.3. Viral Olmayan Vektörler ile Gen Aktarım Yöntemleri.....	23
1.8.3.1. Fiziksel Gen Aktarım Yöntemleri	23
1.8.3.2. Kimyasal Gen Aktarım Yöntemleri	24
1.8.3.2.1. Lipit Tabanlı Gen Taşıyıcı Sistemler.....	25
1.8.3.2.2. Polimer Tabanlı Gen Taşıyıcı Sistemler	25
1.9. Nanotaşıyıcı Sistemler.....	28
1.10. Polimerik Miseller.....	29
1.10.1. Polimerik Misellerin Oluşumu.....	29
1.10.2. Polimerik Misellerin Yapısı.....	30
1.10.3. Polimerik Misellerin Avantajları.....	33
1.10.4. Polimerik Misellerin Stabilitesi	34
1.10.5. Polimerik misel çeşitleri	35
1.10.6. Polimerik Misellerin Hazırlama Yöntemleri	37
1.10.7. Polimerik Misellerin Karakterizasyonları.....	38
1.10.7.1. Kritik Misel Konsantrasyonu	38
1.10.7.2. Misellerin Boyut, Şekil ve Polidispersite İndekslerinin Tayin Edilmesi.....	40
1.10.8. Polimerik Misellerin Pasif Hedeflendirilmesi	40
1.11. Poli (2-oksazolinler)(POx).....	44
1.12. POx'un Biyouyumluluğu.....	46
1.13. POx Tabanlı Taşıyıcı Sistemler	49
1.13.1. POx Tabanlı Miseller Sistemler	49
1.13.2. Gen Taşınmasında POx Tabanlı Polimerik Miseller.....	51
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	56
2.1. Materyal.....	56
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	56
2.1.2. Kullanılan Biyolojik Malzemeler.....	56

2.1.3. Kullanılan Cihazlar	57
2.2. Yöntem	58
2.2.1. Genetik Materyalin Elde Edilmesine Yönelik Çalışmalar	58
2.2.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Plazmit Vektörler.....	58
2.2.1.2. Plazmit DNA (pDNA)'nın Çoğaltılması	60
2.2.1.2.1. Bakteri Kültürünün Hazırlanışı.....	60
2.2.1.2.2. Kompetan Hücre Hazırlanması.....	61
2.2.1.2.3. Kompetan Hücrelerin pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD Plazmidleri ile Transformasyonu	61
2.2.1.2.4. Plazmit DNA İzolasyonu	62
2.2.1.3. Plazmit DNA Karakterizasyonu.....	63
2.2.2. PEtOx- <i>b</i> -PCL ve PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL Blok kopolimerlerinin Sentez Çalışmaları .	65
2.2.2.1. PEtOx- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimer Sentezi.....	66
2.2.2.2. PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimerlerinin Sentezi.....	67
2.2.3. Misel Formülasyonlarının Hazırlanması	70
2.2.3.1. Hidroliz Edilmemiş PEtOx-PCL Blok Kopolimerleri ile Hazırlanan Boş Misellerin Ön Formülasyon Çalışmaları.....	70
2.2.3.2. Hidroliz Edilmiş PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimerleri İle Boş Misel Formülasyonlarının Hazırlanması.....	72
2.2.3.3. %30 ve %60 Hidrolize Blok Kopolimerler ile PPP30-PPP60 Misel/Gen (pEGFP-C3, pEGFP-BikDD) Komplekslerinin Hazırlanması.....	73
2.2.4. PEtOx- <i>b</i> -PCL ve PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL blok kopolimerlerin karakterizasyonu.....	75
2.2.5. Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonu.....	76
2.2.5.1. PEtOx- <i>b</i> -PCL, PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimerleri İle Hazırlanan Miseller ve Misel/Gen Kompleks Formülasyonlarının Partikül Boyutu, Polidispersite İndeks ve Zeta Potansiyel Analizleri.....	76
2.2.5.2. Kritik Misel Konsantrasyonu ile Misel Oluşumunun Belirlenmesi.....	76
2.2.5.3. Misel Oluşumunun Nükleer Manyetik Rezonans (¹ H-NMR) Analizi ile Doğrulanması	77
2.2.5.4. Misel/Gen Kompleks Oluşumunun Jel Retardasyon Analizi ile Değerlendirilmesi	78
2.2.6. Boş Miseller ve Misel/Gen Komplekslerinin Morfolojik Karakterizasyonları	78
2.2.7. Misel/Gen Komplekslerinin Stabilité çalışmaları.....	79
2.2.7.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Salım Çalışması	79
2.2.7.2. Misel/Gen Komplekslerinin DNaz-I Nükleaz Stabilité Analizi	80

2.2.7.3. Misel/Gen Komplekslerinin Serum Stabilite Analizleri.....	80
2.2.7.4. Misel/Gen Komplekslerinin Kolloidal Stabilite Analizleri	81
2.2.7.5. PPP30 ve PPP60 Misellere Yüklü BikDD Geninin Stabilite Çalışmaları.....	81
2.2.8. Misel Formülasyonlarının Sterilizasyonu.....	82
2.2.9. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	82
2.2.9.1. Hücre Canlılığı Çalışmaları	83
2.2.9.1.1. MTT Analizi ile Boş Misellerin L929 Hücrelerindeki Hücresel Biyoyumluğunun Değerlendirilmesi.....	83
2.2.9.1.2. Boş Miseller ve pEGFP-BikDD Yüklü Misellerin MCF-7 ve MDA-MB-468 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin DRAQ-7™ Yöntemi ile Analizi	85
2.2.9.2. Misel/pEGFP-BikDD Gen Komplekslerinin MCF-7 ve MDA-MB-468 Hücrelerine <i>in vitro</i> Transfeksiyonu	86
2.2.9.3. Flow Sitometre Analizi ile Geç Apoptozise Bağlı Ölümün Değerlendirilmesi.....	87
2.2.9.4. Floresan Mikroskop Yöntemi ile <i>in vitro</i> GFP Ekspresyonunun Tayin Edilmesi ..	87
2.3. İstatistiksel Analizler ve Jel analizleri.....	88
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	89
3.1. Genetik Materyalin Elde Edilmesine Yönelik Sonuçlar	89
3.1.1. pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD Plazmitlerinin Saflık ve Konsantrasyonu.....	89
3.1.2. pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD Plazmitlerinin Boyutlarına İlişkin Sonuçlar	90
3.2. PEtOx- <i>b</i> -PCL ve PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimerlerinin Sentez Çalışmalarına Ait Sonuçlar.....	92
3.2.1. PEtOx- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	92
3.2.2. PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	97
3.3. Misel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonlarına Ait Sonuçlar	104
3.3.1. PEtOx- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimerleri ile Hazırlanan Boş Misellerin Partikül Boyut, Zeta Potansiyel ve Polidispersite İndeks Analizleri	104
3.3.2. Farklı Hidroliz Derecelerindeki PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimerleri ile Hazırlanan Boş Misellerin Partikül Boyut, Zeta Potansiyel ve Polidispersite İndeks Analizleri	108
3.3.3. %30 ve %60 Hidrolize PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL Blok Kopolimeri ile Hazırlanan Misel/Gen Komplekslerinin Partikül Boyut, Zeta Potansiyel ve Polidispersite İndeks Analizleri	110
3.3.4. Kritik Misel Konsantrasyonu (KMK) ile Misel Oluşumunun Belirlenmesi	121
3.3.5. ¹ H-NMR Analizi ile Misel Oluşumunun Doğrulanması	124

3.3.6. Misel/Gen Kompleks Oluşumunun Jel Retardasyon Analizi ile Değerlendirilmesi	127
3.3.7. Boş Miseller ve Misel/Gen Komplekslerinin Morfolojik Karakterizasyonları	132
3.3.8. Misel/Gen Komplekslerinin Stabilite Çalışmaları	134
3.3.8.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Salın Çalışması	134
3.3.8.2. Misel/Gen Komplekslerinin DNaz-I Nükleaz Stabilite Analizi	137
3.3.8.3. Misel/Gen Komplekslerinin Serum Stabilite Analizleri.....	141
3.3.8.4. Misel/Gen Komplekslerinin Kolloidal Stabilite Analizleri	143
3.3.8.5. PPP30 ve PPP60 Misellere Yüklü BikDD Geninin Stabilite Çalışmaları.....	147
3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	148
3.4.1. Hücre Canlılığı Çalışmaları	148
3.4.1.1. MTT Analizi ile Boş Misellerin L929 Hücrelerindeki Hücresel Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi.....	148
3.4.1.2. Boş Miseller ve pEGFP-BikDD Yüklü Misellerin MCF-7 ve MDA-MB-468 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin DRAQ-7™ Yöntemi ile Analizi.....	152
3.4.2. Misel/pEGFP-BikDD Gen Komplekslerinin MCF-7 ve MDA-MB-468 Hücrelerine <i>in vitro</i> Transfeksiyonuna İlişkin Sonuçlar	156
3.4.3. Flow Sitometre Analizi ile Geç Apoptozise Bağlı Ölümün Değerlendirilmesi.....	166
3.4.4. Floresan Mikroskop Yöntemi ile <i>in vitro</i> GFP Ekspresyonunun Tayin Edilmesi ...	170
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	179
KAYNAKLAR.....	183
ÖZGEÇMİŞ.....	201
EKLER.....	203

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 1.1. Polimerik misellerin hazırlanmasında yaygın kullanılan polimerik bloklar....	32
Çizelge 1.2. Pasif hedeflendirmeye yönelik tasarlanan polimerik misellere ait klinik denemeler	42
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan plazmit vektörlere ait genel bilgiler	58
Çizelge 2.2. LB Agar besi ortamı içeriği	60
Çizelge 2.3. LB besi ortamı içeriği.....	60
Çizelge 2.4. İyileştirilmiş tamponun içeriği	61
Çizelge 2.5. Farklı moleküler ağırlık oranlarında sentezlenen PEOx- <i>b</i> -PCL polimerleri ..	65
Çizelge 2.6. PEOx ₍₁₁₃₀₀₎₁₀₇₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀ blok kopolimerinin kısmı hidrolizi ile hazırlanan farklı PEI derecelerindeki blok kopolimerlerin molekül ağırlıkları ve hidroliz yüzdeleri ..	68
Çizelge 2.7. %30 Hidrolize polimer (PPP30) ile hazırlanan misel/gen komplekslerinin formülasyondaki miktarları	74
Çizelge 2.8. % 60 Hidrolize polimer (PPP60) ile hazırlanan misel/gen komplekslerinin formülasyondaki miktarları	75
Çizelge 2.9. SDS salım analizi için hazırlanan formülasyonlar	79
Çizelge 2.10. DNaz-I nükleaz stabilite analizi için hazırlanan formülasyonlar	80
Çizelge 2.11. Hücre canlılık analizlerinde kullanılan PPP30 blok kopolimer konsantrasyonları ve dilüsyon oranları	83
Çizelge 2.12. Hücre canlılık analizlerinde kullanılan PPP60 blok kopolimer konsantrasyonları ve dilüsyon oranları	84
Çizelge 3.1. pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD plazmitlerine ait saflık ve konsantrasyonlar ...	90
Çizelge 3.2. Blok kopolimerlerin hidroliz koşulları ve karakterizasyonları	98
Çizelge 3.3. Boş misellerin boyutları, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyel değerleri	104
Çizelge 3.4. Farklı blok uzunluklarındaki PEOx- <i>b</i> -PCL blok kopolimerleri ile hazırlanan misellerin diyaliz, çözücü buharlaştırma ve ince film hidrasyon yöntemi ile elde edilen partikül boyutu, zeta potansiyeli (mV) ve polidispersite indeksine ait bulgular	107
Çizelge 3.5. Farklı hidroliz derecelerinde PEOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL blok kopolimerleri ile hazırlanan boş misel formülasyonlarının (ultra saf su içerisinde) boyut (nm), polidispersite indeks (PDI) ve zeta potansiyel(mV) değerleri	109

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1. 1. 2017 verilerine göre gen tedavisi klinik denemelerine ait endikasyonlar	4
Şekil 1. 2. 1989–2017 yılları arasında dünya çapında onaylanmış gen tedavi klinik denemelerinin sayısı.....	6
Şekil 1. 3. Gen tedavi klinik denemelerin fazları	6
Şekil 1. 4. <i>Ex vivo</i> gen tedavi yaklaşımı.....	8
Şekil 1. 5. <i>In vivo</i> gen tedavi yaklaşımı	8
Şekil 1. 6. Gen taşıma engelleri (I) Terapötik genleri paketleme; (II) hücre içine giriş; (III) endo-lizozomal yoldan kaçış; (IV) DNA/vektör salımı; (V) sitoplazma aracılığıyla çekirdek içine yolculuk; (VI) gen ekspresyonunun etkin hale gelmesi	14
Şekil 1. 7. Gen paketleme yöntemleri.....	15
Şekil 1. 8. Hücresel alım yolları	19
Şekil 1. 9. Dallanmış ve düz PEI kimyasal yapısı	27
Şekil 1. 10. Nanoölçekli ilaç/gen taşıyıcı sistemler	28
Şekil 1. 11. Polimerik misellerin düzenlenmesi	29
Şekil 1. 12. Farklı amfifilik ko-polimerler ile misel oluşum mekanizması A) Di-blok ko-polimer B) Tri-blok ko-polimer C) Graft ko-polimer.....	31
Şekil 1. 13. Polimerik misellerin avantajlı özellikleri.....	34
Şekil 1. 14. Zıt yüklü blok kopolimerden poliyon kompleks misellerinin oluşumu.	36
Şekil 1. 15. Artan permeabilite ve retensiyon etkisi (EPR) ve pasif hedefleme	41
Şekil 1. 16. Yalancı polipeptit yapısı ile Poli(2-oksazolin) ve polipeptit zincir yapısı	45
Şekil 1.17. Yan grup eklenmesine bağlı poli (2-oksazolin)lerin farklı suda çözünürlükleri.....	46
Şekil 1. 18. POx tabanlı ilaç/gen taşıyıcı sistemler.....	49
Şekil 2. 1. pEGFP-C3 plazmidine ait gen haritası	59
Şekil 2. 2. pEGFP-Bik plazmidine ait gen haritası	59
Şekil 2. 3. PEtOx- <i>b</i> -PCL blok kopolimerinin sentez şeması	67
Şekil 2. 4. PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL blok kopolimeri sentez şeması	69
Şekil 2. 5. İnce film hidrasyon yöntemine göre misellerin hazırlanışı.....	72
Şekil 2.6. Elektrostatik etkileşime dayalı misel/plazmit DNA-gen kompleksinin oluşumu	73
Şekil 3. 1. pEGFP-BikDD ile transforme edilmiş <i>E.coli</i> DH5α bakteri hücrelerine ait tek koloni görüntüleri	89

Şekil 3. 2. %1 agaroz jelde 100 V'da yürütülen 1 µg plazmit DNA'lara ait agaroz jel görüntüsü.....	91
Şekil 3. 3. PEtOx polimerine ait ¹ H-NMR spektrumu	93
Şekil 3. 4. PEtOx ₁₀₇₀₀ polimerine ait FT-IR spektrumu.....	93
Şekil 3. 5. PCL ₂₁₀₀ -alkin polimerine ait FT-IR spektrumu	94
Şekil 3. 6. PEtOx- <i>b</i> -PCL blok kopolimerine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	95
Şekil 3. 7. PEtOx- <i>b</i> -PCL blok kopolimerine ait FT-IR spektrumu.	96
Şekil 3. 8. Azid uçlu PEtOx ₁₀₇₀₀ polimerinin % 30 oranında hidrolizine ait ¹ H-NMR spektrumu	99
Şekil 3.9. Azid uçlu PEtOx ₁₀₇₀₀ polimerinin % 30 oranında hidrolizine ait FTIR spektrumu	99
Şekil 3. 10. Azid uçlu PEtOx ₁₀₇₀₀ polimerinin % 60 oranında hidrolizine ait ¹ H-NMR spektrumu	100
Şekil 3. 11. Azid uçlu PEtOx ₁₀₇₀₀ polimerinin % 60 oranında hidrolizine ait FTIR spektrumu	100
Şekil 3. 12. %30 hidrolize PEtOx ₇₅₀₀ - <i>ko</i> -PEI _{(%30)1400} - <i>b</i> - PCL ₂₁₀₀ Blok kopolimerine ait ¹ H-NMR spektrumu	101
Şekil 3. 13. %30 hidrolize PEtOx ₇₅₀₀ - <i>ko</i> -PEI _{(%30)1400} - <i>b</i> - PCL ₂₁₀₀ blok kopolimerine ait FTIR spektrumu.....	102
Şekil 3. 14. %60 hidrolize PEtOx ₄₃₀₀ - <i>ko</i> -PEI _{(%60)2800} - <i>b</i> - PCL ₂₁₀₀ blok kopolimerine ait ¹ H-NMR spektrumu	102
Şekil 3. 15. %60 hidrolize PEtOx ₄₃₀₀ - <i>ko</i> -PEI _{(%60)2800} - <i>b</i> - PCL ₂₁₀₀ blok kopolimerine ait FTIR spektrumu.....	103
Şekil 3. 16. PEtOx ₁₀₇₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀ blok kopolimeri ile hazırlanan misellere ait a) partikül boyut ve b) zeta potansiyel grafikleri.....	108
Şekil 3. 17. 2 µg ve 4 µg pDNA yüklü PPP30 misel/pDNA kompleksinin farklı N/P oranlarındaki a) Partikül boyut (nm) b) Zeta potansiyel analiz sonuçları (mV)	111
Şekil 3. 18. pEGFP-C3 yüklü PPP30 misel ve PPP60 misel kompleksinin farklı N/P oranlarındaki a) Partikül boyut(nm) b) Zeta potansiyel analiz sonuçları (mV)	112
Şekil 3. 19. a) PPP30 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5'ten 30'a) partikül boyut(nm) analizi b) PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5'ten 30'a) partikül boyut (nm) analizi	113

Şekil 3. 20. a) PPP30 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5'ten 30'a) zeta potansiyel (mV) analizi b) PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5'ten 30'a) zeta potansiyel(mV) analizi	114
Şekil 3. 21. a) PPP30 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5'ten 30'a) polidispersite indeks (PDI) analizi b) PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5'ten 30'a) polidispersite indeks (PDI) analizi	117
Şekil 3. 22. Farklı N/P oranlarında hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen kompleksleri ile boş misel formülasyonlarına ait fizikokimyasal analiz sonuçları (a ve b) Boş ve BikDD yüklü PPP30 ve PPP60 misellerinin partikül boyutu (nm), (c ve d) Boş ve BikDD yüklü PPP30 ve PPP60 misellerinin zeta potansiyeli (mV), (e ve f) Boş ve BikDD yüklü PPP30 ve PPP60 misellerinin polidispersite indeksi (PDI).....	119
Şekil 3. 23. a) Ultra saf su içerisindeki pirenin 332 nm'deki eksitasyonu b) Organik çözücü içerisindeki pirenin 336 nm'deki eksitasyonu	122
Şekil 3. 24. a) PPP30 blok kopolimerine ait kritik misel konsantrasyon grafiği, b) PPP60 blok kopolimerine ait kritik misel konsantrasyon grafiği	123
Şekil 3. 25. a) PPP30 blok kopolimerine ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃ içerisinde) b) PPP30 blok kopolimeri ile hazırlanan misel formülasyonuna ait ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O içerisinde)	125
Şekil 3. 26. a) PPP60 blok kopolimerine ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃ içerisinde) b) PPP60 blok kopolimeri ile hazırlanan misel formülasyonuna ait ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O içerisinde)	126
Şekil 3. 27. pEGFP-C3 ile hazırlanan misel/DNA komplekslerinin jel elektroforez görüntüsü.....	128
Şekil 3. 28. Steril HEPES tamponu (10 mM, pH 7,4) ve ultra saf su içerisinde çeşitli N/P oranlarında hazırlanan PPP30 misel/gen komplekslerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	129
Şekil 3. 29. Steril HEPES tamponu (10 mM, pH 7,4) ve ultra saf su içerisinde çeşitli N/P oranlarında hazırlanan PPP60 misel/gen komplekslerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.	130

Şekil 3. 30. Farklı N/P oranlarında PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin hücre kültür ortamı içerisindeki 24 saatlik stabilitesine ait jel görüntüleri	131
Şekil 3. 31. TEM görüntüleri a) Hidroliz edilmemiş PEtOx ₁₀₇₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀ blok kopolimeri ile hazırlanan boş miseller b) %30 hidrolize PPP30 blok kopolimeri ile hazırlanan boş miseller c) %60 hidrolize PPP60 blok kopolimeri ile hazırlanan boş miseller d) N/P 30 oranındaki PPP30 misel/BikDD geni kompleks miseller e) N/P 30 oranındaki PPP60 misel/BikDD geni kompleks miseller	133
Şekil 3. 32. N/P 20 ve N/P 30 oranlarında hazırlanan PPP30 misel/gen komplekslerinin SDS salımına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	135
Şekil 3. 33. N/P 20 ve N/P 30 oranlarında hazırlanan PPP60 misel/gen komplekslerinin SDS salımına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	135
Şekil 3. 34. N/P 20 ve 30 oranındaki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin Image J analizi ile değerlendirilen % salım grafikleri a) PPP30 misel/gen kompleksi b) PPP60 misel/gen kompleksi	136
Şekil 3. 35. PPP30 misel/gen kompleksinin DNaz-I stabilite çalışmasına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	138
Şekil 3. 36. PPP60 misel/gen kompleksinin DNaz-I stabilite çalışmasına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü	138
Şekil 3. 37. N/P 20 ve N/P 30 oranında hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin DNaz-I uygulaması sonucu BikDD gen profiline ait bağlı yoğunlukları	140
Şekil 3. 38. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 misel/gen komplekslerinin belirli zaman aralıklarındaki serum stabilitesine ait agaroz jel görüntüleri.	141
Şekil 3. 39. Farklı N/P oranlarındaki PPP60 misel/gen komplekslerinin belirli zaman aralıklarındaki serum stabilitesine ait agaroz jel görüntüleri.	142
Şekil 3. 40. PPP30 ve PPP60 Misel/gen komplekslerinin +4°C'deki partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinin zamana bağlı değişimi.....	144
Şekil 3. 41. PPP30 ve PPP60 Misel/gen komplekslerinin 37°C'deki partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinin zamana bağlı değişimi.....	146
Şekil 3. 42. BikDD geni kondanase edilmiş PPP30 misel/gen ve PPP60 misel/gen komplekslerinin 24 ve 48 saatlik stabilitesine ait agaroz jel görüntüleri a)PPP 30 misel/BikDD gen kompleksi (24 saat) b) PPP 60 misel/BikDD gen kompleksi (24 saat) c)PPP 30 misel/BikDD gen kompleksi (48 saat) d) PPP 60 misel/BikDD gen kompleksi (48 saat)	147

Şekil 3. 43. Farklı N/P oranlarında HEPES tamponu içerisinde hazırlanan boş misel formülasyonlarının L929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT analizi a) PPP30 boş miseller b) PPP60 boş miseller	148
Şekil 3. 44. Farklı N/P oranlarında DMEM kültür ortamı içerisinde hazırlanan boş misel formülasyonlarının L929 hücrelerindeki 24 ve 48 saatlik MTT analizleri a ve b)PPP30 boş misellerin 24 ve 48 saatlik sonuçları, c ve d) PPP60 boş misellerin 24 ve 48 saatlik sonuçları	150
Şekil 3. 45. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 boş misellerin ve misel/gen komplekslerinin (a ve b) MCF-7 ve (c ve d) MDA-MB-468 hücre hatlarındaki hücre canlılık analizleri.....	153
Şekil 3. 46. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD komplekslerinin serumlu ortamdaki MCF-7 hücrelerine transfeksiyon etkinliği (a ve b) %GFP ekspresyon (c ve d) Medyan floresan intensite	157
Şekil 3. 47. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD komplekslerinin serumlu ortamdaki MDA-MB-468 hücrelerine transfeksiyon etkinliği a ve b) %GFP ekspresyon (c ve d) Medyan floresan intensite	158
Şekil 3. 48. Farklı N/P oranlarındaki (a)PPP60 ve (b)PPP30 misel/pEGFP-C3 kompleksleri ile muamele edilen serum içermeyen ortamdaki MCF-7 hücrelerinin GFP ekspresyonlarına ait flow sitometre histogramı (c) Medyan floresan intensite.....	160
Şekil 3. 49. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP-BikDD komplekslerinin serum içermeyen ortamdaki MCF-7 hücrelerine transfeksiyon etkinliği (a) GFP ekspresyon (b) Medyan Floresan intensite.....	161
Şekil 3. 50. (a) pEGFP-BikDD (b) pEGFP-C3 yüklü N/P 30 orandaki PPP30 ve PPP60 misellerin MCF-7 hücrelerindeki gen ekspresyonlarına ait flow sitometre histogramları	162
Şekil 3. 51. (a) PPP30-pEGFP (b) PPP60-pEGFP formülasyonlarının %10 serum içeren ve serum içermeyen ortamdaki floresan ekspresyonlarına ait flow sitometre histogramları .	162
Şekil 3. 52. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD komplekslerinin serum içermeyen ortamdaki MDA-MB-468 hücrelerine transfeksiyon etkinliği (a ve b) Flow sitometre histogram grafikleri (c ve d) GFP ekspresyon(e ve f) Medyan floresan intensitesi.....	164
Şekil 3. 53. pEGFP-BikDD ve pEGFP-C3 yüklü PPP30 ve PPP60 miseller ile muamele edilen MCF-7 hücrelerin DRAQ-7 analizine bağlı apoptoz kaynaklı % ölümü	167
Şekil 3. 54. pEGFP-BikDD ve pEGFP-C3 yüklü PPP30 ve PPP60 miseller ile muamele edilen MDA-MB-468 hücrelerin DRAQ-7 analizine bağlı apoptoz kaynaklı % ölümü ...	168

Şekil 3. 55. Çıplak pEGFP-BikDD geni ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MCF-7 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü.	172
Şekil 3. 56. N/P 20 oranında hazırlanan PPP60 misel/BikDD komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MCF-7 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü.	173
Şekil 3. 57. N/P 30 oranında hazırlanan PPP60 misel/BikDD komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MCF-7 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü.	174
Şekil 3. 58. Çıplak pEGFP-BikDD geni ile muamele edilen MDA-MB-468 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MDA-MB-468 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü. ..	175
Şekil 3. 59. N/P 20 oranında hazırlanan PPP60 misel/BikDD komplekslerinin MDA-MB-468 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MDA-MB-468 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü.	176
Şekil 3. 60. N/P 30 oranında hazırlanan PPP60 misel/BikDD komplekslerinin MDA-MB-468 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MDA-MB-468 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü.	177
Şekil 3. 61. N/P 20 ve 30 oranındaki PPP60 misel/gen komplekslerinin transfeksiyonuna ait GFP ekspresyon floresan yoğunluğunun kantitatif analizi a) MCF-7 hücreleri b) MDA-MB-468 hücreleri.	178

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

¹ H-NMR	Proton nükleer manyetik rezonans
bç	Baz çifti
CuAAC	Bakır katalize azid-alkin klik kimyası
DAPI	DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, dihydrochloride)
DCM	Diklorometan
DEPC	Dietilpirokarbonat
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMF	Dimetilformamit
EDTA	Etilenediamintetraasetik asit
EPR	Artan permeabilite ve retensiyon etkisi
f	Hidrofilik hacim fraksiyonu
FBS	Fötal sıgır serumu
FTIR	Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
GFP	Yeşil floresans protein
GPC	Jel Permeasyon Kromatografisi
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinetanesülfonik asit
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KMK	Kritik misel konsantrasyonu
KMS	Kritik misel sıcaklığı
MFI	Medyan floresans yoğunluğu
MPS	Mononükleer fagositik sistem
MTT	Dimetil tiyazolil difeniltetrazolyum bromid
MWCO	Molekül ağırlığı ayırma sınırı
N/P	Amin/Fosfat
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCL	Poli ε-kaprolakton
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin

PEO	Poli (etilenoksit)
PEtOx	Poli (2-etil-2-oksazolin)
PPP30	% 30 hidrolize Poli (2-etil-2-oksazolin)- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL
PPP60	% 60 hidrolize Poli (2-etil-2-oksazolin)- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL
RES	Retiküloendotelyal sistem
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopisi
THF	Tetrahidrofur
U	Ünite



1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Son yıllarda, sentetik polimerlerin ilaç ve gen aktarım çalışmalarında biyomateryal olarak kullanılması, istenilen fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikte formülasyonların geliştirilmesini sağlaması açısından oldukça önem kazanmıştır. Bu polimerler ile hazırlanan formülasyonların işlevselleştirilmesi ve biyouyumluluk gibi avantajlı özellikleri çeşitli hastalıkların tedavisinde çığır açıcı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Özellikle 21. yüzyılda, kanser gibi genetik hastalıkların zorlu tedavisinde, geleneksel tedavi yöntemlerinin başarı seviyelerinin düşük olması, gen tedavisine önemli ölçüde dikkat çekilmesini sağlamıştır.

Gen tedavisinde aşılması gereken temel zorluk, terapötik genin etkin bir taşıyıcı sistem ile hedef bölgeye aktarılması ve o bölgede yüksek verim ile ekspresyonunun sağlanmasıdır. Bu amaç için geliştirilen pek çok viral ve viral olmayan gen aktarım vektörleri bulunmakla birlikte, yüksek transfeksiyon etkinliklerine rağmen viral vektörlerin gen aktarım çalışmalarında kullanımı, toksisite ve güvenilirlik problemleri nedeniyle kısıtlıdır. Bu nedenle, polimer tabanlı taşıyıcı sistemlere dayalı viral olmayan gen taşıyıcı vektörlerin klinik uygulamalardaki başarısı ve avantajları, bu sistemleri oldukça popüler hale getirmiştir. Polimerik taşıyıcı sistemler arasında yer alan polimerik miseller, özellikle düşük boyutları, pasif hedeflendirme yetenekleri ve optimum formülasyonların hazırlanmasına bağlı yüksek yapısal stabilitelerinden dolayı gen taşıyıcı vektörler olarak oldukça güvenli ve umut verici bir yaklaşım sunmaktadırlar.

Tez çalışmamızda, biyomedikal uygulamaları açısından Polietilen glikol (PEG) polimerine alternatif olarak sunulan PEO polimeri ile klinik çalışmalarda kullanılabilecek ideal yeni bir miseller taşıyıcı sistemin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, meme kanserinin apoptotik tedavisinde kullanılan terapötik bir gen olan BikDD genini taşıyan etkin, işlevsel, biyouyumlu ve biyoparçalanır ABD Gıda ve İlaç Dairesi onaylı Poli (2-etil-2-oksazolin) (PEO) tabanlı viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, miseller terapötik gen ile yüksek stabilitede kompleks edilmiş ve BikDD geninin aktarım etkinliğinin artırılması amacıyla yapıya katyonik Polietilenimin (PEI) polimeri katılmıştır. Ancak katyonik PEI'nin bilinen yüksek sitotoksitesi nedeniyle, tez çalışmamızda, PEO'un kısmi hidrolizi ile iki farklı hidroliz yüzdesinde PEI içeren (Poli 2-etil-2-oksazolin-ko-Polietilenimin-blok-Poli ε-kaprolakton)

(PEtOx-ko-PEI-b-PCL) blok kopolimerleri ile misel formülasyonlarının hazırlanması, polimerin hücresel toksisitesinin azaltılması ve terapötik genin etkinliğinin artırılması hedeflerimiz arasındadır. Geliştirilen bu yeni misel/BikDD gen kompleks formülasyonlarının MCF-7 ve MDA-MB-468 olmak üzere iki farklı meme kanseri hücre hattında *in vitro* hücresel biyouyumlulukları, transfeksiyon etkinlikleri, gen ekspresyonları ve apoptoz kaynaklı ölüm etkinlikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar geliştirdiğimiz yeni miseller sistemlerin, terapötik geni yüksek yapısal stabilite ile meme kanseri hücrelerine başarılı bir şekilde aktarabilen ideal vektörler olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, tez çalışmamızda ideal boyutlarıyla geliştirilen miseller sistemlerin pasif hedeflendirme ile dahi meme kanserinin gen tedavisinde etkin bir şekilde rol alabileceğini göz önüne sermiş olup, klinik çalışmalarda PEtOx polimerinin altın standart PEG'in görünmezlik gibi üstün özelliklerine rakip olarak kullanılabileceği bilgisini literatüre kazandırmış olmaktadır.

1.2. Meme Kanseri

Kanser, konak ve çevresel faktörlerin çeşitli etkileşimleri ile meydana gelen ve genomda değişikliklere neden olan karmaşık, çok faktörlü bir hastalıktır. Kanserın önemli özellikleri, büyüme sinyallerinde kontrolsüzlük, anti-büyüme sinyallerine duyarsızlık, doku istilası, metastaz yeteneği, sınırsız çoğalma potansiyeli, kesintisiz anjiyogenez ve apoptozdan kaçmadır [1,2]. Kanser, dünya çapında ölümün önde gelen önemli nedenlerinden biri olup 2015 yılında 8,8 milyon kanser vakası nedeniyle ölüm gerçekleşmiştir. 2012–2022 yılları arasında bu oranın 14 milyonu bulması beklenmektedir. Dünya çapında, 2030 yılına kadar her yıl 23,6 milyon yeni kanser vakası öngörülmektedir [3]. Meme kanseri ise dünya çapında yaygın görülen ancak kanser ölümünün beşinci nedeni olup, yüksek mortalite ile gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, kadınlarda ilk sırada ve en sık görülen kanser türüdür. Meme kanserine yakalanan kadınların çoğuna ileri bir evrede hastalık teşhisi konulmakta olup, 1970'lerin başında teşhisi konanların beş yıllık sağ kalım oranları yalnızca %53 civarındadır. Meme kanserinin klinik yönetimi son 30 yılda önemli ölçüde iyileşmiş olup, kadınların neredeyse % 87'si tanı konduğunda en az 5 yıl hayatta kalabilmektedir [4]. Meme kanseri, tümörün reseptör durumuna ve östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptör-2 (HER2) gibi çeşitli hedeflenebilir reseptörlere bağlı olarak tedavi edilmektedir. Meme tümörlerinin büyük bir kısmında standart tedavilere dirençli metastaz ve ilaç direnci gelişmekte olup, hastalığın daha agresif alt tiplerinden biri olan üçlü negatif meme kanseri

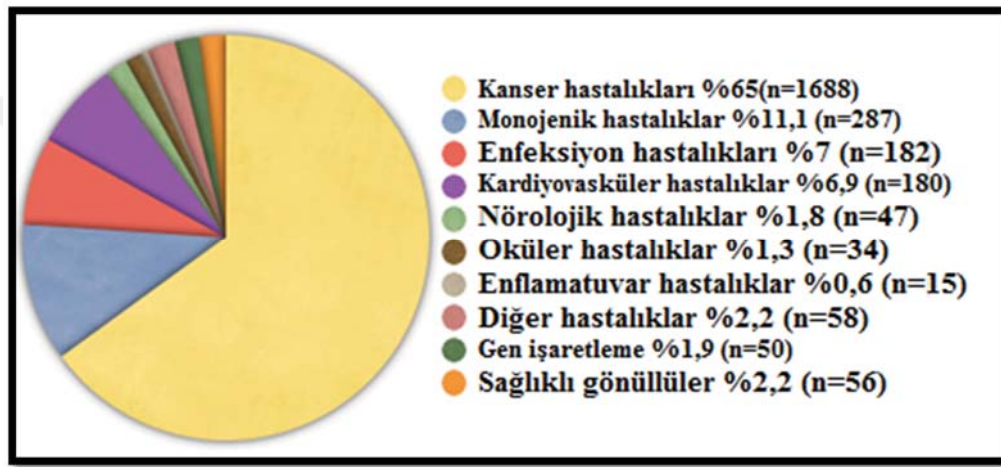
için halen iyi hedeflenmiş bir tedavi mevcut değildir [5, 6]. Ayrıca, primer meme kanseri oldukça tedavi edilebilir iken (Evre I / II meme kanseri tanısı konulan kadınların % 80-99'u 5 yıla kadar hayatta kalmaktadır) [7] metastatik meme kanseri için şu anda etkin bir tedavi mevcut değildir.

Meme kanserinin ilerlemesini kontrol altına almak ve tedavi etmek için, cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, endokrin terapi ve hedeflenmiş terapi olmak üzere birden fazla yöntem kullanılmaktadır. Cerrahi, lokorejyonel meme kanserinin operasyonu için uygundur. Radyoterapi ya da sistemik terapilerin (örneğin, kemoterapi, endokrin terapi ve hedeflenmiş terapi) seçimi, bireylerdeki hastalığın seyrine bağlıdır. Cerrahiden sonra kalan kanser hücreleri, lokal tekrarlama riskini azaltmak için radyoterapi ile öldürülebilir [8,9]. Modern tanı araçlarının ve daha gelişmiş adjuvan sistemik tedavilerin uygulanması ile erken evre meme kanseri tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir [10, 11]. Fakat ne yazık ki, metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde iyileşme oranı oldukça düşüktür. Bu nedenle, ileri derecedeki meme kanserinin tedavisi için alternatif ya da tamamlayıcı tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar arasında, gen tedavisinin meme kanserinde etkili bir tedavi yöntemi olduğu belirtilmektedir. Kanser hücrelerine, genetik hataları düzelterek malignant fenotipi tersine çevrilebilecek, anormal sinyali bloke edebilecek ya da spesifik olarak kanser hücrelerinin ölümünü indükleyecek terapötik bir gen aktarılabilir [11]. Meme kanserinin gen tedavisindeki klinik etkinliğini değerlendirmek için pek çok klinik çalışma yapılmıştır [12,13]. Meme kanseri dönüşümü ve ilerlemesinin altında yatan moleküler mekanizmaların artan anlayışıyla ve terapötik genler ve gen taşıyıcılardaki muazzam gelişmeler ile meme kanseri için bir dizi yeni formülasyon geliştirilmiştir. Ancak, farklı hastalıklar ve kanser modelleri için çok yeni onaylanmış gen tedavi ürünleri bulunmakla birlikte, meme kanserinin tedavisi için klinik olarak ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından henüz onaylanmış herhangi bir gen tedavi ilacı yoktur.

1.3.Gen Tedavisi

Gen tedavisi kısaca, terapötik bir etki oluşturmak için hasarlı hücrelere genetik materyalin aktarımını ifade etmektedir [14]. Modern tıptaki devrim olarak tanımlanan gen tedavisi, mutasyona uğramış bir geni sağlam kopyası ile değiştirmek, mutasyonlu bir genin işlevini inaktif etmek, istenmeyen bir gen ifadesini susturmak, kayıp bir geni yerine koymak ya da hastalıkla savaşmaya yardım edecek yeni bir terapötik geni hedef hücrelerin nükleuslarına ya da dokularına aktarmak için kullanılan bir tekniktir. Gen tedavisi, kanser başta olmak üzere, hemofili, hiperkolesterolemi, diyabet, koroner kalp hastalıkları ve enfeksiyon

hastalıkları (AIDS) gibi genetik hasarlara bağılı kalıtsal ya da sonradan kazanılan hastalıkların tedavisinde umut vaat eden bir tedavi şeklidir. 2017 yılı verilerine göre gen tedavisi uygulamaları arasında %65 oranla kanser tedavisine yönelik klinik araştırmalar büyük bir yer teşkil etmektedir (Şekil 1.1). Bu açılardan incelendiğinde gen tedavisi, özellikle genetik ve tedaviye dirençli hastalıkların tedavisi için umut verici bir yaklaşımdır. Yan etki riski oluşturmada yüksek bir terapötik doz ile lokal olarak uygulanabilmesi nedeniyle geleneksel tedavi şekillerine göre üstünlük taşımaktadır. Ayrıca, gen tedavilerinin çoğu tek sefer uygulanabilir olup, uzun vadede maliyet açısından etkili olabilirler [14–16].



Şekil 1. 1. 2017 verilerine göre gen tedavisi klinik denemelerine ait endikasyonlar [13]

1.4. Gen Tedavisinin Tarihçesi

Gen tedavi sistemi, terapötik bir gen ve bu gen ile kompleks hale getirilen ve geni kanser hücrelerine taşıyan, hücre içine aktaran biyolojik veya sentetik bir vektörden oluşur. Gen aktarımının, protein sentezinden sorumlu önemli genlerin değiştirilmesi ya da üretiminin artırılmasına neden olarak sayısız tedavi edilemez ya da tedavi edilmesi zor olan genetik ve kazanılmış hastalıkların tedavisi için muazzam bir potansiyele sahip olduğuna inanılmaktadır [17].

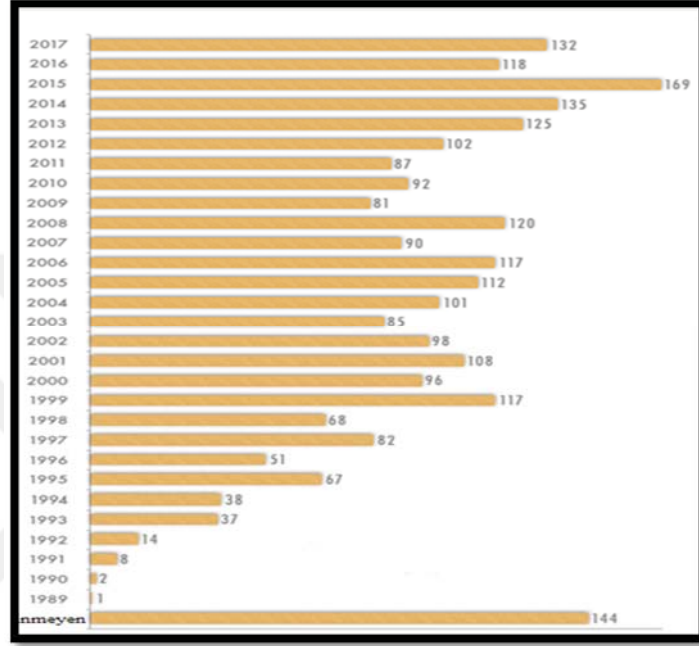
1970’li yılların başlarında rekombinant DNA teknolojisini gelişimi ile gen tedavisi çalışmaları önem kazanmış ve gen tedavisi ile ilgili çalışmaların klinik sonuçları ilk olarak 1990 yılında alınmıştır. French Anderson ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bu çalışma insan üzerinde yapılan resmi onaylı, ilk gen tedavisi niteliğini taşımakta olup, Adenozin deaminaz (ADA) eksikliği bulunan iki hastanın retrovirüs ilişkili gen tedavisine dayanmaktadır [18]. 1992 yılında ise DC-Chol/DOPE katyonik lipozomların kullanımı ile ilk gen tedavi denemesi yapılmıştır [19]. Tedavide bağışıklık sisteminin normal çalışması

için önemli bir enzim üretiminden sorumlu genin aktarımı ile umut verici sonuçlar elde edilmiş ve ardından 500'den fazla protokol uygulanmıştır. 2002 yılında SCID (Ciddi kombine immün yetmezlik bozukluğu) hastalığının tedavisi ilk başarılı gen tedavisi olarak tarihe geçmiştir. Moleküler biyolojideki gelişmeler ile 2003 yılındaki İnsan Genom Projesi'nin tamamlanması, hastalığa neden olan çok sayıda genin kimliği hakkında önemli bilgiler sağlamıştır.

2003 yılında Çin'de hâlihazırda baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom için Gendicine ve baş-boyun ve özofagusun skuamöz hücreli karsinom için Oncorine kanser gen tedavi ilaçları piyasaya sunulmuştur [2]. Bu gen ürünü, adenoviral bir vektör ile p53 geninden oluşmakta olup, tümör hücrelerine aktarımı ile hastalığın geç fazındaki gönüllülerin üçte ikisinde tam gerileme sağlamıştır. Gendicine™'i ilginç yapan şey, klinik kullanım için onaylanan ilk gen tedavi ürünü olmasıdır. İkinci gen tedavi ürünü ise yine Çin Shanghai Sunway Biotech tarafından geliştirilen Çin İlaç ve Gıda Dairesi tarafından piyasaya çıkması onaylanan Oncorine™'dir. 2012 yılında Avrupa'da ailesel lipoprotein lipaz yetersizliği (LPLD) tanısı konan yetişkin hastaların tedavisi için ilk gen tedavi ürünü Glybera® (alipogene tiparovec) onaylanmıştır. Ancak şu an talep eksikliği nedeniyle UniQure firması, Avrupa'daki pazarlama ruhsatının yenilenmesini sürdürmeyeceğini açıklamıştır. 2016 yılında ADA-SCID tedavisi için Avrupa Birliği Ajansı tarafından ilk *ex-vivo* kök hücre gen tedavi ürünü Strimvelis™ (GlaxoSmithKline) onaylanmıştır. Novartis tarafından geliştirilen Tisagenlecleucel (Kymriah™) ilk kimerik antijen reseptörü T hücresi (CAR-T hücresi) tedavi ürünü Ağustos 2017 yılında ABD İlaç ve Gıda Dairesi tarafından akut lenfoblastik lösemi tedavisi için onaylanmıştır. Sonrasında Ekim 2017'de CAR-T uygulaması ile B-hücre lenfoma tedavisi için Yescarte™ (axicabtagene ciloleucel) ABD İlaç ve Gıda Dairesi tarafından onaylanmıştır. Yine CAR-T uygulaması ile Aralık 2017'de ABD İlaç ve Gıda Dairesi tarafından Luxturna™ (voretigene neparvovec-rzyl) Retinal distrofi (bialelik RPE65 mutasyonu) tedavisi için onaylanmıştır [20]. Bunlar dışında, tedavide kullanım için ABD İlaç ve Gıda Dairesi tarafından onay alan diğer gen ilaçları arasında ilk sitomegolavirüs retinitli AIDS hastalarında intravitreal enjeksiyonla uygulanan ilk antisens oligonükleotid tedavisi Vitravene (ABD, 1998), ve Türkiye ilaç piyasasında da bulunan aptamer tabanlı PEGlenmiş Anti-VEGF tek zincirli nükleik asit ile anti-anjiojenik tedavide kullanılan Macugen (ABD, 2004)'dir [21].

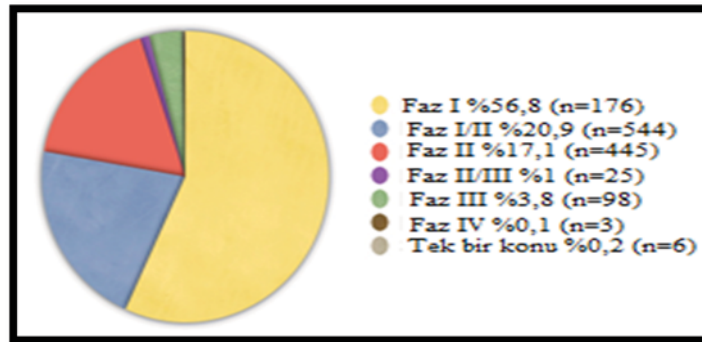
İstatistiklere göre 1989 ve 2017 yılları arasında, dünya çapında gen tedavisi ile ilgili tamamlanmış, devam etmekte ve onaylanmış olan toplam 2,597 klinik çalışma

belirtilmiştir. 1990 yılındaki ilk gen tedavisinden sonra, klinik çalışmaların sayısı zamanla artmış olup 1999'da bir zirve yapmış (117 deneme), 2008'de 120 deneme, 2009 ile 2012 arasında daha az sayıda deneme gerçekleşmiş ve 2012'den bu yana klinik denemelerin sayısı önemli ölçüde artmıştır. 2015 yılında ise klinik çalışmalar 169 deneme ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. 2017 Kasım ayı verilerine göre ise 132 adet klinik deneme yapılmıştır [13] (Şekil 1.2).



Şekil 1. 2. 1989–2017 yılları arasında dünya çapında onaylanmış gen tedavi klinik denemelerinin sayısı [13] (2017 Kasım ayında güncellenmiş sonuçlara göre)

Denemelerin %56,8'i Faz I, % 20,9'u Faz I / II ve % 17,1'i Faz II aşamasındadır, Faz II / III, III ve IV'deki gen tedavi çalışmaları, denemelerin sadece % 5'ini oluşturmaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1. 3. Gen tedavi klinik denemelerin fazları [13]

Tüm bu veriler gen tedavisinin klinik uygulamadaki yükselen başarısını ortaya koymakta olup, başarılı bir gen tedavisi için uygun yaklaşımların geliştirilmesi önemlidir. Gen tedavisindeki en önemli konu, terapötik bir geni hedef hücre ya da dokulara güvenilir ve etkili taşıyabilen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir.

1.5.Gen Tedavisi Yaklaşımları

Gen tedavisindeki yaklaşımlar eşey hücre tedavisi ve somatik hücre tedavisi olmak üzere hedef doku bakımından ve *ex vivo* ve *in vivo* gen tedavisi olmak üzere uygulama şekli bakımından 2'ye ayrılmaktadır.

1.5.1. Eşey Hücre Tedavisi

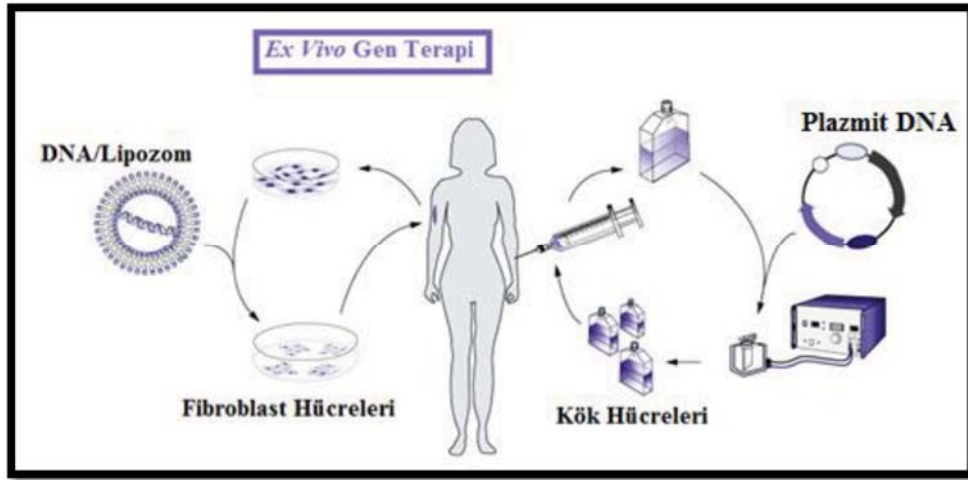
Bu tedavi yöntemi, yumurta ve sperm gibi eşey hücrelerine fonksiyonel bir genin integre edilmesini ifade etmektedir. Genetik bozukluk ve kalıtsal hastalıkların tedavisinde oldukça etkili bir tedavi şekli olduğu düşünülmektedir. Kalıtsal bir değişikliğe yol açtığından nesiller boyunca aktarımı söz konusudur fakat pek çok ülkede etik nedenlerden dolayı insan üzerinde uygulanması yasaklanmıştır.

1.5.2. Somatik Hücre Tedavisi

Bu tedavi yönteminde ise, fonksiyonel genler hastanın somatik hücrelerine aktarılmaktadır bu nedenle, nesillere aktarım söz konusu değildir. Somatik hücre tedavisi uygulama şekli bakımından *ex vivo* ve *in vivo* gen tedavisi olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır.

1.5.2.1.Ex vivo Gen Tedavisi

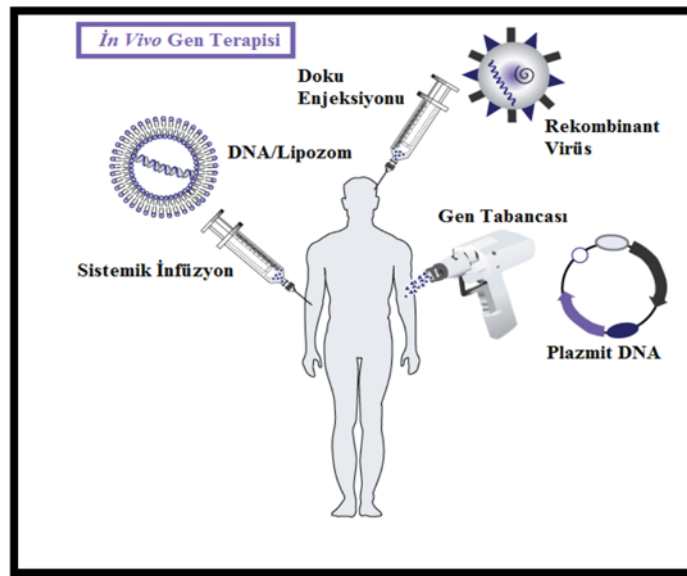
Hasarlı dokudan alınan hücreler laboratuvar ortamında çoğaltılır ve bir vektör aracılığıyla sağlıklı genler bu hücrelere transfer edilir. Tedavi edildiği düşünülen geni almış hücreler seçilerek çoğaltılır ve hastaya tekrar verilir (Şekil 1.4). Hastanın kendi hücrelerinin tekrar hastaya verilmesine dayalı bir yöntem olduğundan immünolojik bir etki görülmemektedir [17].



Şekil 1. 4. *Ex vivo* gen tedavi yaklaşımı [22]

1.5.2.2. *In vivo* Gen Tedavisi

In vivo gen tedavisinde, terapötik gen bir vektör aracılığı ile doğrudan kana verilerek hastanın hücre ya da dokularına aktarım hedeflenmektedir [17] (Şekil 1.5).



Şekil 1. 5. *In vivo* gen tedavi yaklaşımı [22]

1.6. Meme Kanserinde Gen Tedavisi Yaklaşımları

Meme kanserinin gen tedavisi için, gen aktarım vektörlerinin kullanıldığı farklı klinik yaklaşımlar mevcuttur. Bunlar onkogen aktivitesinin baskılanması, apoptozun indüklenmesi, anti-anjiojenik gen tedavisi, immünoterapi, antisens ve RNA interferans (RNAi) tabanlı stratejiler ve ön ilaç aktivasyon / intihar gen tedavisini kapsamaktadır.

1.6.1. Onkogen Aktivitesinin Baskılanması

Onkogenler tümör hücrelerinin büyümesini indükleyen, metastaz yeteneklerini arttıran ve apoptozu engelleyen spesifik gen gruplarıdır. Meme kanserinin temel nedenlerinden biri de onkogenlerin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak tümör oluşumunun gerçekleşmesidir. Anormal onkogen ifadesinin baskılanması, tümör büyümesinin baskılanmasına neden olmaktadır. Meme kanserinde SV40 büyük T antijeni, HER-2/neu promotörü, C-myc protoonkogenleri, Bcl-2, Bcl-xL, EpCAM, PTK7, Nup88 ve hipoksi indüklenebilir faktör 1 α olmak üzere çok sayıda onkogen teşhis edilmiştir. Özellikle meme kanserinde yoğun olarak çalışılan protoonkogen erbB-2'ye ilgi duyulmaktadır. İnsan meme kanseri hücrelerinde HER-2 (neu) onkogeninin ekspresyonu adenovirüs tip 5 E1A geni ile inhibe edilmiştir. Adenovirüs tip 5 E1A geni konak hücrelerde eksprese edilen transkripsiyonel bir faktörü kodlayan ilk viral gen ürünüdür ve meme ile yumurtalık kanserinin dendritik hücre (DC)-Chol katyonik lipozom (DCC-E1A) ile gen tedavisine yönelik bir faz I çalışması bulunmaktadır [8, 11, 23].

1.6.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını engelleyen proteinleri kodlamakla görevlidir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar ve ekspresyonların baskılanması veya genlerin sessizleştirilmesi, tümör oluşumu ve metastaza neden olmaktadır. Meme kanserinde, p16, p27, p21, P53, miR34a, let-7a miRNA, Rb, miR-145, BRCA-1, BRCA-2, Rb, mda7 ve dekorin gibi tümör baskılayıcı genlerin mutasyonları veya kayıpları gözlenmiştir. Bunlar arasında p53 ve BRCA-1 geni meme kanseri tedavisinde sıklıkla çalışılan tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genler farklı mekanizmalar ile tümör baskılanmasına neden olabilmektedir. Örneğin, meme kanseri hücre hatlarında BRCA1 ekspresyonu, apoptozu indükleyerek tümörü baskılamaktadır [8, 11, 23].

1.6.3. İntihar Gen Tedavisi

İntihar gen tedavisi, toksin gen tedavisi ve enzim aktive edici ön ilaç tedavisi olmak üzere 2 strateji ile etki göstermektedir. Toksin gen tedavisi, hücre için toksik olan moleküllerin eksprese edilmesine yol açan genlerin transfeksiyonudur. Enzim aktive edici ön ilaç tedavisi ise spesifik ön ilaçları seçici olarak aktive edebilen enzimleri eksprese eden genlerin transfeksiyonunu ifade eder. Memeli hücrelerine sistemik olarak uygulanan toksik olmayan ön ilaçlar, toksin genlerin eksprese ettiği spesifik enzimler ile hücre içinde toksik metabolitlere dönüşerek tümör hücrelerini öldürmektedir. Bu tedaviye en iyi iki örnek,

timidinkinaz (TK) ve sitozindeaminazdır (CD), bu enzimler sırasıyla gansiklovir ve 5-florositozini toksik ilaç formlarına dönüştürür. Bugüne kadar, meme kanserinin tedavisi için 2 klinik çalışma belirtilmiştir. Bunlardan ilki, ErbB-2'ye yönelik intihar geni ekspresyonuna ait ilk faz I klinik çalışmasıdır. İkinci klinik çalışma ise, MetXia-P450'nin doğrudan ileri meme kanseri ya da melanoma kanserine yönelik tümör içi enjeksiyonudur [2, 24].

1.6.4. Antisens Teknoloji

Antisens teknoloji tümörojeniteye neden olan genlerin ekspresyonunu spesifik olarak inhibe edebilen antisens oligonükleotit adı verilen kısa tek zincirli DNA (ssDNA) moleküllerin kullanımı ifade eden bir stratejidir [25]. Bu strateji, transkripsiyon inhibisyonu, RNAz aracılı mRNA parçalanması ya da translasyonun engellenmesi gibi mekanizmaları kullanmaktadır. Meme kanserinde c-myc, c-erbB-2, metilentetrahirofolat redüktaz (MTHFR), p21, protein Kinaz c-alfa (PKC- α), Bcl-2 gibi onkogenlerin antisens moleküller ile inhibisyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Günümüzde, LY900003 adı verilen bir antisens oligonükleotit ile PKC- α geninin spesifik olarak bloke edilmesine dair (Affinitak, ISIS-3521, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN) halen klinik çalışmalar devam etmektedir [11].

1.6.5. RNA İnterferans (RNAi) Teknolojisi

RNA interferans, transkripsiyon sonrası sentezlenen mRNA dizisine homolog 21–23 nükleotitlik kısa bir RNA (siRNA) dizisi kullanılarak hatalı genin sessizleştirilmesine dayanan bir yöntemdir. Meme kanserinin tedavisinde c-myc geninin RNAi ile sessizleştirilmesi sonucu MCF-7 meme tümör hücrelerinin yok edildiği ortaya konulmuştur. Başka bir çalışmada anti-HER2/neu siRNA ile enfekte edilen hücrelerin çoğalması baskılanmış, artan apoptozis ile azalan tümör büyümesi elde edilmiştir [11].

1.6.6. Tümör Kaynaklı Anjiyogenezin İnhibe Edilmesi

Anjiyogenez tümör büyümesi ve metastazı ile ilişki olduğundan, anjiyogenez inhibitörlerinin tedavi amaçlı kullanımı ile tümör büyümesi baskılanmaktadır. Endostatin ve anjiostatin önemli anjiyogenez inhibitörlerinden olup, bu anti-anjiyogenik genleri kodlayan plazmidler ile kompleks edilmiş lipozomların meme tümör hücrelerini baskıladığı ortaya konulmuştur [26]. Bunlar dışında anjiyogenez faktör genlerinin antisense diziler ile ekspresyonun susturulması ve onkogen aktivitesinin E1A geni ile engellenmesi ile anjiyogenez baskılanması ve tümör büyümesinin inhibe edilmesine dair çalışmalar bulunmaktadır [11].

1.6.7. İmmünoterapi

İmmünoterapi farklı yaklaşımlar ile tümör hücrelerinin yok edilmesine dayanmaktadır. Bu stratejiler arasında, interlökin IL-4, IL-12, IL-18, IL-23, IL-2 ve INF- α gibi sitokinler ile tümör hücrelerinin savunma hücrelerine duyarlı hale getirilmesi, tümöre spesifik antijen genlerinin aşı olarak tümör hücrelerine aktarılması, monoklonal ya da poliklonal antikorlar ile tedavi ve immünostimülatör molekülleri kodlayan genlerin tümör hücrelerine aktarılması bulunmaktadır [27].

1.6.8. Proapoptotik Gen Tedavisi

Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü, embriyonik gelişim ve patolojik bir olguda doku homeostazisini korumak için hücrelerin kendi kendilerini yıkımlarını aktive ettiği fizyolojik bir süreçtir. Kanseri hücreleri bu süreçten kaçınmak suretiyle hayatta kalmayı başarmaktadır. Meme kanseri tedavisinde apoptoza dayalı tedavi yöntemleri öncelikli sırada yer almakta olup, apoptoz sinyallerinde meydana gelen bozukluklar pek çok kanser hücrelerinde olduğu gibi meme kanserinde de tümör başlaması ve ilerlemesinden sorumludur [27,28]. Dolayısı ile meme kanserinin gen tedavisinde klasik tümör baskılayıcı genlerin yanı sıra apoptozu teşvik eden proapoptotik genlerin (proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve ölüm sinyali reseptörleri ve ligand sistem yolları) ekspresyonunun arttırılması, kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyebilir veya onları terapötik ajanlara duyarlı hale getirebilir [23].

1.6.8.1. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspaz aktivasyonunu indükleyici olarak önemli bir role sahip, apoptozun başlıca düzenleyici anahtarlarıdır. Bcl-2 ailesi başlıca apoptozu teşvik eden proapoptotik ve apoptozu engelleyen antiapoptotik üyeler olmak üzere birbirini ile zıt işlev gören iki gruptan oluşmaktadır. Bad, Bax, Bik, Bid, Bcl-XS, Bim, Puma ve Noxa, proapoptotik üyeler olup, antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl1'i içermektedir. Bunlar arasında Bcl-2, apoptozu inhibe ederek işlev gören ilk onkogendir. Antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerinin over-ekspresyonunun meme kanserinde önemli bir rol oynadığı ifade edilmektedir [28-30].

Apoptoz mekanizması bazı hücre içi ve hücre dışı sinyaller ile tetiklenen, intrinsik (içsel, mitokondriyal) ve ekstrinsik (dışsal) olmak üzere iki yolla meydana gelmektedir. Hücre içi sinyaller DNA hasarı, onkogen aktivasyonu, hücre döngüsünün kontrol edilememesi ve hipoksi olup intrinsik apoptoz yolağını aktive ederken, büyüme ve üreme faktörlerinin yetersizliği, ölüm reseptörleri-ligand sistemleri (FAS-FAS ligand, tümör nekroz faktörleri,

TRAIL) aktivasyonu, toksin, UV, kemoterapötik ilaçlar ve radyasyon gibi hücre dışı sinyaller ise ekstrinsik apoptoz yolağını aktive etmektedir. Her iki sinyal yolağında da kaspazlar aktif rol almaktadır. İnstrinsik yolda, DNA hasarı gibi çeşitli hücre içi sinyalleri ile apoptotik uyarı alındıktan sonra proapoptotik bir protein olan Bid, antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'yi inaktif eder ve Bax-Bak proapoptotik proteinlerini aktifleştirir. Aktifleşen Bak ve Bax proteinleri mitokondri membranına taşınarak membranda por oluşumunu indükler. Mitokondri membranında oluşan porlardan sitozole salınan sitokrom-c, APAF-I (Apoptotik proteaz aktifleştiren faktör), API (apoptoz indükleyici faktör) ve ATP bir araya gelerek apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozom, sitozolde Kaspaz-9'u keserek aktifleştirir ve Kaspaz-3 aktifleşmesi ile devam eden bir kaspaz zincirini tetiklemiş olur. CAD (Kaspaz aktifleştirici DNaz) aktifleşmesini takiben DNA parçalanması ile apoptoz gerçekleştirilir. Ekstrinsik yol ise, FAS, tümör nekroz faktör- α ve TRAIL gibi ölüm sinyallerinin hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanması ile kaspaz yolağını aktive eden ve apoptoza yol açan prokaspaz-8 ile birlikte DISC (ölüm indükleyici kompleks)'i oluşturmaya dayanır. Kompleks oluşumu sonrası aktifleşen kaspaz-8, kaspaz-3 ve CAD süreci ile apoptoz meydana gelir [30, 31].

Çalışmamızda Bcl-2 ailesi genlerinden BikDD'nin meme kanseri üzerindeki apoptotik etkisi incelendiğinden aşağıda bu gene ait detaylı bilgiler verilmiştir.

1.6.8.1.1. BikDD Geni

Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan proapoptotik Bik geni, son zamanlarda apoptozun önemli bir başlatıcısı ve tümör baskılayıcı bir gen olarak kabul edilmektedir. Bik geninin bulunduğu 22q kromozomu üzerindeki alel kaybının insan meme ve kolorektal kanserlerinin gelişiminde rol oynadığını ortaya konulmuştur. Bik geni 18-kDa'luk Bik proteinini kodlamakta olup, hücre içi sinyaller ile apoptotik uyarı alındıktan sonra, mitokondriye taşınarak, Bcl-2 ve Bcl-XL antiapoptotik proteinlerine bağlanır [33]. Bu bağlanma proapoptotik aktiviteler için kritik bir rolü bulunan BH-3 bölgesi ile gerçekleştirilmektedir. Proapoptotik üyelerin BH-3 bölgeleri, antiapoptotik proteinlerin BH-3 bölgeleri ile dimerize olarak apoptozu indüklemektedir. Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri sağlıklı hücrelerde Bax ve Bak proteinlerine bağlanarak bu proteinlerin mitokondriyal membranda por açmasını ve apoptozu engellemektedir. Hücre içi apoptoz sinyali geldiğinde Bik proteini, Bcl-2 ve Bcl-XL proteinlerine bağlanarak Bax ve Bak proteinlerinin serbest kalmasını sağlamak ve bu proteinler mitokondriyal membranda porları oluşturmak suretiyle apoptotik komplekslerin salınmasını sağlamaktadır. Bik, aynı zamanda, bazı kemoterapötik

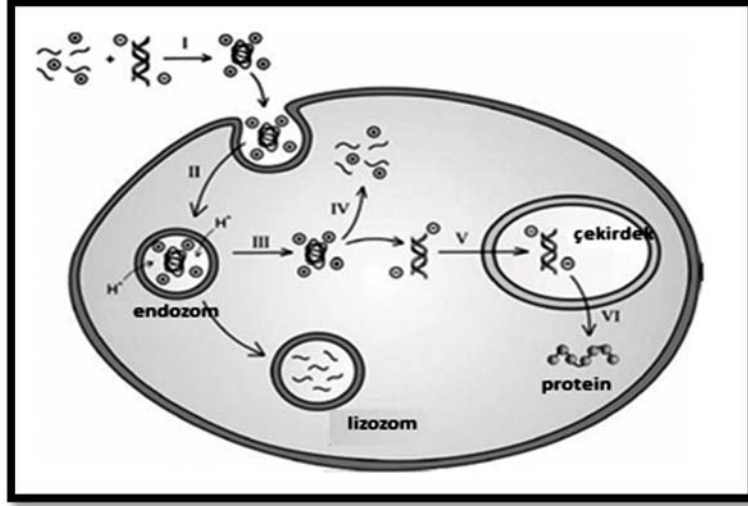
ajanlar tarafından indüklenen apoptozise karşı tümör hücrelerini hassaslaştırmaktadır. Intravenöz enjeksiyon ile aktarılan Bik lipopleksin insan meme kanseri tümör hücrelerinin gelişmesi ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir [32, 33].

Li ve arkadaşları tarafından keşfedilen BikDD, Bik'in mutant formu olup, Bik proteinin yapısal olarak fosforile edilmiş aktif formunu taklit etmek üzere threonin 33 ve serin 35 aminoasitlerinin aspartik aside mutasyonu ile oluşturulmuştur [35]. Bu mutant formun yabancı-tip Bik'e göre *in vitro*'da daha yüksek apoptotik aktivite ve hayvan modelinde 2 kat daha yüksek antitümör aktivite sergilediği gösterilmiştir [34, 35]. Yabancı tip Bik ile kıyaslandığında BikDD'nin antiapoptotik proteinlere çok daha yüksek bir aktivite ile bağlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca terapötik bir gen olan bu Bik mutantı, yabancı tip Bik'e göre pankreas [37], meme [35, 37], akciğer [38, 39], karaciğer [41] ve prostat kanseri [42] hücrelerinde apoptozu artırıcı ve hücre proliferasyonunu önleyici olarak gen tedavi uygulamalarında daha etkili bulunmuştur.

Proapoptotik Bik çıplak (nude) farelerdeki ortotopik tümör dokularında olduğu gibi, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435 ve MDA-MB-468 olmak üzere 4 farklı *in vitro* meme kanseri hücre hatlarında apoptozisi önemli ölçüde indüklemiştir [36].

1.7. Gen Tedavisinde Engeller

Başarılı bir gen aktarımı, seçilen vektörün spesifik bir hücreyi hedefleme, hücreye girme ve yeterli gen ekspresyonu elde etme yeteneğine bağlıdır. Bu süreci güç kılan viral ve viral olmayan vektörler tarafından aşılması gereken çeşitli engeller bulunmaktadır (Şekil 1.6). Öncelikle vektör, özellikle intravenöz ve intramüsküler olarak uygulandığında nükleazlar ve immün sistemi içeren hücre dışı etkenlerden kaçarak spesifik bir hücreyi hedeflemeli ve retiküloendotelial sistem tarafından yakalanmadan kaçmalıdır. Sonrasında vektör, hücreler tarafından alınarak plazma membranını geçmeli ve/veya endozomdan kaçmalı ve nükleusa giden yolda yoğun hücre iskelet ağı içinden geçebilmelidir. Çekirdek zarı son bir engel teşkil eder, çünkü DNA transkribe edilmek üzere çekirdeğe girmelidir. DNA aktarımı mRNA aktarımına göre daha zordur, çünkü mRNA'nın translasyonu sitoplazmada gerçekleşirken, plazmit DNA'nın transkripsiyonu için çekirdeğe transfer edilmesi gerekmektedir. Virüsler genetik materyali taşıma ve yayılmaya devam etme gibi hedef hücrelere girmek için çeşitli mekanizmalar geliştirirken, viral olmayan sistemler bu doğuştan gelen mekanizmalardan yoksundurlar. Sonuç olarak, bu vektörlerin etkinliğini arttırmak için bu bariyerlerin aşılması ve karakterizasyonuna yönelik birçok çalışma yapılmıştır [42–45].



Şekil 1. 6. Gen taşıma engelleri (I) Terapötik genleri paketlenme; (II) hücre içine giriş; (III) endo-lizozomal yoldan kaçış; (IV) DNA/vektör salımı; (V) sitoplazma aracılığıyla çekirdek içine yolculuk; (VI) gen ekspresyonunun etkin hale gelmesi [47]

Hücre içi ve hücre dışındaki engeller aşılmadan önce genetik materyalin paketlenmesi, hücre içerisine aktarımda önem taşımaktadır.

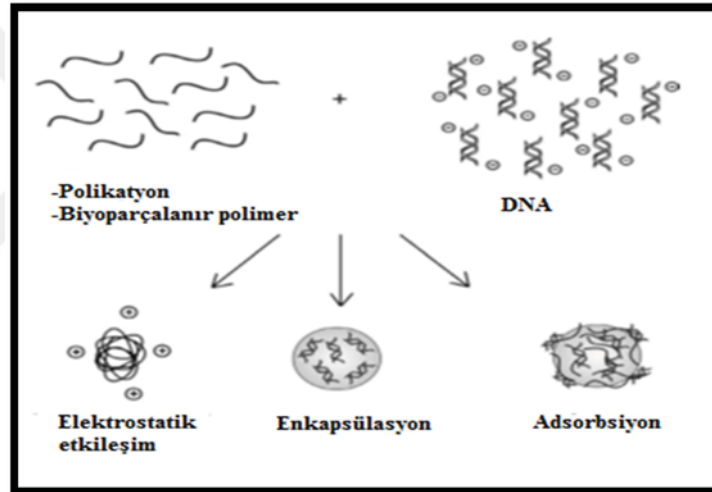
1.7.1. Gen Paketleme

Terapötik genin paketlenebilmesi birkaç yol ile olmakla birlikte, genin paketlenmesinde görev alan taşıyıcı sistemin aşağıda sıralanan bazı özellikleri taşıması önem taşımaktadır. İdeal bir gen taşıyıcı sistem;

- (1) Anyonik hücre yüzeyi ile etkileşiminin gerçekleşebilmesi için, DNA'nın negatif yüklü fosfat omurgasını nötralize edebilmeli
- (2) Yüksek boyutlu DNA'yı hücre içine alabilmek için düşük boyutu ile DNA'yı kondanse edebilmeli (yani, reseptör aracılı endositoz için nanometre, makropinositoz veya fagositoz için mikrometre ölçeğinde olmalı)
- (3) DNA'yı hem hücre dışı hem de hücre içi nükleaz degradasyonundan koruyabilmeli
- (4) Yüksek transfeksiyon etkinliği ile spesifik bir dokuyu hedefleyebilmeli
- (5) DNA'yı etkili ve güvenli bir biçimde nükleus içerisine taşıyabilmeli
- (6) Stabil olmalı, hücre içerisinde herhangi bir toksik etki ya da immünolojik yanıt oluşturmamalı
- (7)Yüksek transfeksiyon için yeterli bir tamponlama kapasitesine sahip olmalı ve kanda minimum düzeyde agregasyona yol açmalıdır [47, 48].

Ne yazık ki, şu anda kullanılan gen aktarım vektörlerinin hiçbiri bu kriterlerin tümünü yerine getirememektedir. Bir vektörün lokal aktarımı hepatik klerensi önlediğinden ve daha az yan etki ve spesifik bölgeye aktarım sağladığından, düşük dozlarla sınırlı bir ekspresyon sergilemekte ancak kesin bir etki alanı ile sonuçlanmaktadır. Bunun tersine, vektörün sistemik uygulaması geniş bir ekspresyon ile sonuçlanmaktadır. Sonuç olarak, vektörler ve uygulama yöntemleri transfeksiyon etkinliğini arttırmanın yanı sıra, hedeflenen aktarıma ulaşmak için de bazı modifikasyonları gerektirmektedir. Bu gereksinimleri karşılamak için araştırmacılar elektrostatik etkileşim, enkapsülasyon ve adsorpsiyon olmak üzere üç ayrı gen paketleme stratejisi ortaya koymuştur [47](Şekil 1.7).

Nükleik asitlerin pozitif yüklü taşıyıcı sistemler ile elektrostatik etkileşimi, adsorpsiyonu ya da enkapsülasyonu, nükleik asidin yükünü azaltır ve nanoboyut aralığında partiküller oluşmasına neden olur.



Şekil 1. 7. Gen paketleme yöntemleri [47]

Elektrostatik etkileşimde, DNA'nın anyonik yapısı, katyonik yapıdaki polimerik vektörler ile elektrostatik olarak kompleks oluşumu sağlamaktadır. Bu kompleksleşmenin gerçekleştirilmesi için Poli (L-Lizin) (PLL), poly(propylenimine) (PPI), Poli(2-(dimetilamino)etil-methacrylate) (PDMAEMA), Dallanmış ve düz Polietilenimin (PEI), Poli L-ornitin, poliamidoamin (PAMAM) dendrimerler ve kitosan gibi çeşitli polikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar *in vivo* ve *in vitro* uygulamalar için en uygun ve en sık kullanılan polikasyonlardır. Tüm bu polimer yapılarının en az bir bölgesinde nötr pH'ta protonlanmış amin grubu bulunmaktadır, böylece bu polimerler DNA ile elektrostatik olarak bağlanarak polileks adı verilen kendiliğinden düzenlenen kompleksler oluşturmaktadır. Uygun bir Amin(Azot):Fosfat (N:P) yük oranında, polimer nükleaz

degradasyonundan sterik koruma sağlarken, DNA'yı hücrel alım için uyumlu boyutlarda kondanase edebilir [46, 49].

Pozitif yüklü taşıyıcı kısımların varlığı, bu DNA paketleme yönteminin temelini oluştursa da, polikasyonlar yüksek katyonik yükü nedeniyle yüksek sitotoksikite sergilemektedir. Ayrıca, elektrostatik yük, DNA paketlenmesi ve DNA'nın korunmasına elverişli olmasına rağmen, polipleks hedef bölgeye ulaştıktan sonra DNA salımında zorluklara yol açabilir. Bu gibi nedenlerle, araştırmacılar poli (β -aminoester), (PBAE), poli (α - 4-aminobutil) -L-glikolik asit (PAGA), poli (4-hidroksi-L-prolin ester) (PHP), poly(orthoester) gibi hem biyoparçalanabilir polikasyonların kullanımı hem de enkapsülasyon ve adsorbsiyon gibi alternatif DNA paketleme yöntemleri geliştirmiştir [47].

Enkapsülasyon, biyoparçalanabilen küresel yapılar içine DNA'nın hapsedilmesine dayanmaktadır. Polimer omurgası boyunca var olan ester bağları, bu polimerlerin (poliesterler) tümünün, vücuttan daha kolay temizlenebilir ve daha kısa oligomerik ve monomerik bileşenlere hidrolitik olarak parçalanabilmesine neden olmaktadır [51]. Polikasyonik karşılıklarına benzer olarak, DNA-enkapsüle eden bu ajanlar inkorpore edilen genleri enzimatik degradasyondan korumaktadır. Bu paketleme yönteminin sınırlamaları, organik çözücülerle temas, aşırı sıcaklık nedeniyle genetik madde taşıyıcısının degrade olması, düşük enkapsülasyon etkinliği, düşük pH mikroçevresinde poliesterin hidroliz edilmesiyle DNA'nın degrade olması ve polimerden düşük salım nedeniyle düşük DNA biyoyararlanımıdır [47].

Adsorbsiyon, enkapsülasyon yönteminin sınırlamalarından dolayı, DNA paketlenmesine alternatif olarak adsorbsiyon yöntemleri geliştirilmiştir. DNA adsorpsiyonu, yukarıda bahsedilen iki yaklaşımın birleşimini temsil eder; çünkü katyonik kısımlar (örneğin katyonik yüzey aktif maddeler, PDMAEMA, PEI), DNA'nın elektrostatik olarak bağlandığı biyolojik olarak parçalanabilen nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe veya konjuge edilmesini ifade etmektedir [47]. Bu yaklaşımın yararı, enkapsülasyondan kaynaklı zorlukları önlemek ve hızlı salım ile biyoyararlanımı arttırmaktır. Bununla birlikte, nükleik asitlerin yüzeyde bulunması onları enzimatik parçalanmaya karşı duyarlı hale getirebilir, ancak bu, kullanılan polikasyon tipi ve adsorbe edilmiş DNA ile elde edilen elektrostatik etkileşimin derecesi ile azaltılabilir.

Polimer kimyasının bu çok yönlülüğü, vektörün gen taşınmasında karşılaştığı engellerin üstesinden gelmek için polimere çeşitli fizikokimyasal özellikler kazandırmak üzere

işlevselleştirilmesine, kopolimerleştirilmesine veya yapısal olarak modifiye edilmesine izin vermektedir [47].

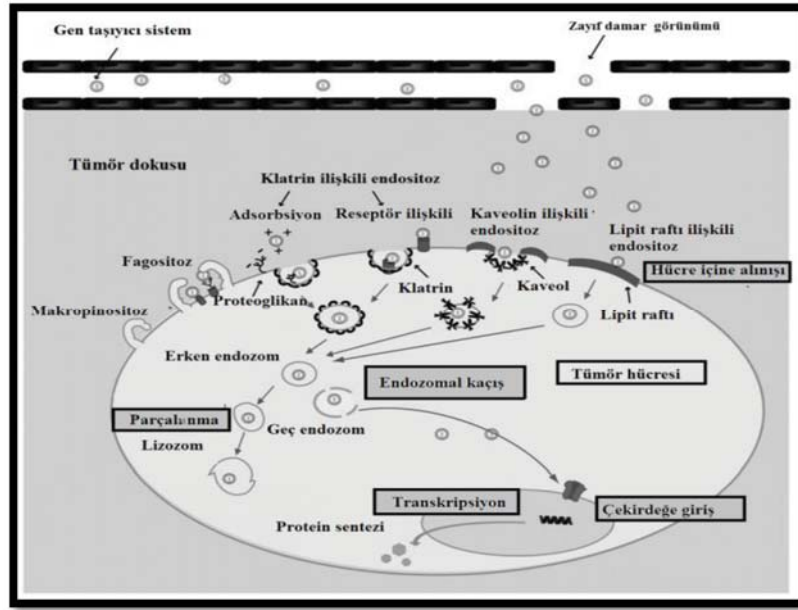
1.7.2. Hücre Dışı Engeller

Viral-olmayan bir vektör, *in vivo* uygulama yolu ne olursa olsun (inhalasyon, kas içi enjeksiyon, gavaaj, intravenöz gibi) hücre dışı çevre ile kaçınılmaz bir şekilde temasa girmektedir. Hücre dışı çevrede, vektörün hedef bölgeye varmadan uzaklaştırılmasına ve yıkımına neden olabilecek birden çok faktör vardır. Intravenöz olarak verilen çıplak DNA'nın serum içinde, DNA'nın topoformuna bağlı olarak 1,2 ile 21 dakika aralığında çok kısa bir yarı ömre sahip olduğu gösterilmiştir. Bunun plazmada hem endo hem de ekzonükleaz aktivitesinin bir sonucu olduğuna inanılmaktadır [51, 52]. DNA'yı nükleaz aktivitesinden korumak için kullanılan stratejiler, plazmit enkapsülasyonu ve DOTAP: DOPE gibi katyonik lipidlerin kullanımınıdır. Buna ek olarak, PEG'lenmiş yapıların kullanımı ile vektörlerin yarılanma ömrünün büyük ölçüde uzatıldığı gösterilmiştir [53–55]. Vektör sadece nükleazlardan kaçmakla kalmayıp, hücre dışındaki serum proteinleri ve hücrelerden de etkilenmemelidir. Serum, viral olmayan vektörler ile etkileşebilen çeşitli proteinler içermektedir [57]. Bu durum vektörün biyolojik aktivitesini inhibe etmekte veya parçalanması ve/veya uzaklaştırılmasına neden olmaktadır. Negatif yüklü serum proteinleri, katyonik yapılar ile etkileşerek ve agregasyonlara neden olarak retikülendotelyal sistem tarafından vektörün dolaşımdan hızlıca uzaklaştırılmasına yol açmaktadır. Serum proteinlerinin yanı sıra kan hücreleri de sahip oldukları negatif yüzey yükünden dolayı intravenöz aktarım sonucu birkaç dakika içerisinde katyonik vektörler ile etkileşime girmektedir [52]. Bu durum transfeksiyon verimliliğini azaltmakta ve karaciğer, dalak yoluyla vektörün uzaklaştırılmasını teşvik etmektedir. Hücre dışı engellerden bir diğeri ise immün sistem aktivasyonudur. İmmün sistem aktivasyonu özellikle viral sistemler ile ilişkili iken bazı viral olmayan sistemlerin de immün cevabı indüklediği gösterilmiştir. Örneğin, intravenöz olarak enjekte edilen katyonik lipopleksler serum içerisine TNF α ve IFN'nin salımını içeren inflamatuvar bir cevap oluşturabilir. Son olarak, viral olmayan vektörlerin PEGilasyonu, bazı hücre dışı engellerden kaçılmasında kullanılan yaygın bir tekniktir, ancak anti-PEG IgM üretiminin tetiklenmesi, vektörün tekrarlanan uygulamalarında sorun oluşturmaktadır. Bu gibi nedenlerden dolayı, spesifik hastalık terapötikleri için uygun viral olmayan vektörün seçilmesine çok dikkat edilmeli ve özen gösterilmelidir [52].

1.7.3. Plazma Membranı

Başarılı bir transfeksiyon, vektörün ilgilenilen hücreye girme kabiliyetine dayanmaktadır bu durumda plazma membranı önemli bir engel teşkil etmektedir. Çıplak DNA, taşıyıcı ajanın olmadığı durumlarda, hem DNA'nın hem de hücre yüzeyinin yüksek negatif yük yoğunluğu nedeniyle plazma zarı ile etkili bir şekilde ilişki kuramaz. Polikasyonlar, DNA'nın negatif yükünü nötralize ederek plazma membranı ile ilişkiyi artırır. Bu elektrostatik ilişki, büyük oranda hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlar tarafından taşıyıcı sistemin endositoz ile hücreye alımını arttırmaktadır. Ayrıca hücre alımı arttırmak için kimyasal konjugasyon ya da elektrostatik adsorpsiyon ile katyonik taşıyıcıların hücreye özgü hedeflendirmesi yapılabilmektedir [51,53]. Bu yaklaşımda spesifik hücre çeşidi ve hücre yüzeyinde eksprese edilen reseptörler etkin rol oynamaktadır. Taşıyıcı sistemlerin hücre içerisine alınmasında fagositoz, makropinositoz, klatrin-iliskili endositoz, kaveol-iliskili endositoz, klatrin/kaveol bağımsız endositoz gibi pek çok yol bulunmaktadır. DNA kompleksinin alımında taşıyıcı çeşidi, taşıyıcı boyutu, yüzey yükü, membran kompozisyonu ve hücre çeşidi önem taşımaktadır [53, 57, 58]. Ayrıca, Morille ve arkadaşları, endositik vezikül büyüklüğü ve vezikül oluşum mekanizmasının da hücre içerisine taşıyıcı sistemlerin alımında etkili olduğunu belirtmişlerdir [60].

Katyonik taşıyıcıların hücre içerisine alımı öncelikli olarak glikoprotein, proteoglikan ve gliserofosfatlar tarafından oluşturan negatif yüklü plazma membranı ile klatrin ve/veya kaveol ilişkili endositik mekanizma ile gerçekleşmektedir. Hücre membranında yer alan bu yüksek negatif yüklü proteoglikanların mekanizmaları net olarak bilinmemekle birlikte, membranın genel negatif yükünden sorumlu olup pek çok hedeflendirilmemiş pozitif yüklü gen taşıyıcı sistemlerin endositik olarak alınmasında önemli bir role sahiptir [47]. Hücre yüzeyindeki proteoglikanların hücre çeşidine göre dağılım farklılıkları gen taşıyıcı sistemlerin farklı oranlarda hücre içerisine alımında etkili rol oynamaktadır. Plazma membranı üzerinde bulunan reseptör aracılı alım da klatrin ilişkili endositoz ile olmaktadır. Fagositoz ya da makropinositoz ise makromoleküllerin sindirilmesi için granülosit ve makrofajların tercih ettikleri yoldur [58, 59] (Şekil 1.8).



Şekil 1. 8. Hücresel alım yolları [60]

1.7.4. Endo-Lizozomal Kaçış

Endositoz ile hücre sitoplazmasına alım gerçekleşmişse, doğrudan endositik kompartmana taşınan vezikül içerisindeki gen taşıyıcı vektör hücre içerisindeki membran yüzeyine geri dönüş, asidik keseciklere (lizozom, fagozom gibi) veya hücre içerisindeki bir organelle (golgi gibi) iletim gibi birkaç yönlendirmeye maruz kalır. DNA'nın lizozomda enzimatik parçalanmasını önlemek için endozomdan salımı gen tedavisinin önemli engellerindendir. Endozomal kaçış için membran füzyonu, proton-sünger etkisi (primer, sekonder, tersiyer aminler, imidazol grupları gibi protonlanabilir aminler) ve pH duyarlı füzojenik peptidler (KALA gibi) ve gözenek oluşturuucu peptidlerin yapıya eklenmesi gibi çeşitli mekanizmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle protonlanabilir amin içeren PEI ve PAMAM gibi polimerlerden oluşan taşıyıcı sistemin katyonik yük yoğunluğu tamponlama kapasitesiyle endozom içerisindeki pH'nın 6'dan 5'e düşmesine bağlı olarak, endozom içerisine proton akışına ve buna bağlı olarak endozomun parçalanmasına yol açmaktadır [46, 51, 57].

1.7.5. DNA'nın Sitozolik Taşınması

Sitozole salınan taşıyıcı sistem, nükleazlar ve hücre iskeletini teşkil eden mikrotübül, ara filamentler ve mikrofilamentler ile çevirili yoğun bir ağ içerisinde kalır. Özellikle çıplak DNA'nın sitozolde 50 ile 90 dakikalık bir yarı ömür ile nükleazlar tarafından parçalandığına dair literatür verileri bulunmaktadır. Bu durum endozomdan kaçış sırasında kompleksten ayrılması gerektiğine inanılan çıplak DNA ve DNA komplekslerinin nükleusa taşınmasında büyük bir sorun oluşturmaktadır. Nükleazların yanı sıra sitoplazmanın

yoğunluğu, DNA'nın boyutu hücre iskeletinin örgü yapısı ve çapraz bağlı aktin filamentlerin var oluşu DNA'nın hareketini azaltmaktadır [60, 61].

Yapılan bir çalışmada 85 nm boyutunda, 250 bp'den büyük çıplak DNA'nın sitolazmadaki difüzyonunun ciddi şekilde engellendiği gösterilmiştir [47]. Bu nedenle, 150–200 nm boyutundaki bir kompleksin sitozolde serbest difüzyonu mümkün olmamaktadır. Endozomdan salınan DNA'nın nükleusa yakınlığı da difüzyonda önem oluşturmaktadır. Çünkü DNA'nın sitozolde aktif taşıma ile taşınmasına dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Genel anlamda kompleksin ya da tek başına DNA'nın sitozoldeki kalış süresini azaltmak ve nükleusa taşınmasını kolaylaştırmak için çeşitli doğal endojen sitozolik faktörler ve ilişkili yollar araştırılmaktadır [52].

1.7.6. Nükleusa Giriş

DNA ile vektör ayrımının gerçekleştiği hücresel kısım ile ilgili henüz net bir sonuç elde edilemese de, etkili bir gen ekspresyonu için DNA'nın vektörden ayrımı gerekli bir kriterdir. Dikkat edilmesi gereken nokta ise, nükleus içerisinde meydana gelen DNA/vektör ayrımının ekspresyonu arttırdığı ve sitozoldeki nükleaz enzimleri ile minimum temasa neden olduğu ile ilgilidir. DNA'nın transfeksiyonu nükleusta gerçekleştiğinden nükleus içerisinde vektör ile DNA'nın ayrılmış olması ya da olmaması önemli olmaksızın genetik materyalin nükleusa ulaştırılması gerekmektedir. Sitozol ya da hücre çekirdeğinde, DNA ile vektör birbirinden ayrıldıktan sonra, nükleusa ulaşan genlerin kopyalanması ve translasyonunun gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda nükleus zarı karşılaşılan engellerin sonuncusudur. Yapılan çalışmalar hücre çeşidine, DNA miktarına ve tayin yöntemine bağlı olarak nükleusa %1 ile %10 civarında plazmit transfekte edildiğini ortaya koymuştur [51, 53, 62].

Genin nükleusa aktarılmasında birkaç mekanizma bulunmakla birlikte en sık karşılaşılanı, hücre bölünmesi sırasında nükleus zarının ortadan kalkmasıyla gerçekleşen aktarımdır [53, 63]. Hücre bölünmesinin gerçekleşmediği durumlarda aktarım çok yavaş ve düşük olup, aktarımı artırmak için spesifik DNA dizilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer bir yaklaşım ise, yaklaşık 9 nm ve altındaki moleküllerin nükleus zarı üzerindeki porlardan pasif difüzyonudur. Bu porlardan büyük moleküllerin geçişine izin verilmemektedir [65]. Bu nedenle, çıplak DNA ve DNA/vektör komplekslerinin nükleusa girişini kolaylaştırmak için nükleer lokalizasyon sinyalleri gibi peptit dizilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nükleer lokalizasyon sinyalleri, 26 nm'den daha düşük boyuttaki DNA/vektör kompleksi veya

çıplak DNA'nın nükleus zarı üzerindeki porlardan aktif taşınmasına yardımcı olan sitozolik proteinlere bağlanmasına neden olarak alımı artırır [65, 66].

Etkin bir gen aktarımı yapmak için tüm bu engelleri geçerek nükleusa ulaşan nükleik asitlerin öncelikle mRNA'ya transkripsiyonu ve sonrasında ise sitozolde terapötik bir proteine dönüşümü gerekmektedir.

1.8. Gen Aktarım Yöntemleri

Etkin bir gen tedavisinde çıplak DNA'nın sahip olduğu yüksek boyut ve hidrofilik doğası gereği tek başına aktarımı bahsedilen hücre dışı ve hücre içi engellerden dolayı kısıtlanmaktadır. Çıplak DNA'nın tümör hücrelerine doğrudan enjeksiyonu etkili sonuçlar vermesine rağmen, sistemik dolaşımında hızlı uzaklaştırılması uygun gen aktarım yöntemlerinin ve gen taşıyıcı sistemlerin kullanılması gerekliliğini ortaya koymaktadır [67, 68]. Bu bağlamda genetik materyalin hedef doku ve hücrelere ulaştırılmasında viral ve viral olmayan vektörler kullanılmaktadır. Viral olmayan gen aktarım yöntemlerinde sentetik bir taşıyıcı (lipozom veya nanopartikül) kullanılırken, adından da anlaşılacağı üzere, viral vektörler biyolojik vektörlere (virüsler gibi) dayanmaktadır. Her vektör sahip olduğu farklı özellikleri nedeniyle, farklı terapötik amaçlar için kullanılmaktadır. Örneğin, genin ekspresyon süresi, transdüksiyon verimi ve güvenlik profilleri vektörün seçiminde önem teşkil etmektedir. Ayrıca gen aktarımındaki önemli nokta, tasarlanan vektör/DNA kompleksinin farklı hücre hatlarıyla etkileşim mekanizmasına bağlı olarak hücre içine alım ve hücredeki transfeksiyon etkinliğinin farklı olmasıdır. Günümüzde, *in vivo* gen transferi için tüm gen taşıma yöntemleri arasında en etkili olanın viral vektörler olduğu ifade edilmektedir [2, 69].

1.8.1. Viral Vektörler

Biyolojik taşıyıcı sistemler arasında bulunan klinikte kullanımı en yaygın viral vektörler, adenovirüsler, lentivirüsler, retrovirüsler (insan immün yetmezlik virüsü (HIV)), Herpes simplex virüsler (HSV) ve adeno bağlantılı virüsler (AAV)'dir. Bu vektörler, genomlarını (transgeni) konak genomuna birleştiren (retrovirüsler ve lentiviral vektörler) ya da konak genomu ile birleşmeden hücre çekirdeğinde epizom olarak kalan vektörler (adenovirüsler, AAV ve herpes simplex virüsler) olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Bunun yanı sıra viral vektörler ekspresyon süreleri ve profilleri, transgen kapasitesi, ve immünojenisitetleri bakımından da birbirlerinden farklılık sergilemektedir. Birleşmeyen viral vektörler geçici ekspresyona (birkaç hafta içinde azalır), birleşen vektörler ise uzun vadeli ekspresyona (aylardan, yıllara kadar) neden olurlar. Retroviral vektörlerin bu birleşmesi, zaman zaman

ekspresyon bölgelerinde gerçekleştiği gözlenmiştir (eklentili mutagenез). Böylece, transgenin konak genomuna birleşimi, bu vektörlerin güvenliğiyle ilgili endişeleri arttırmaktadır [2, 68].

Adenovirüsler, bölünen ve bölünmeyen hücreleri transfekte etme yeteneğine sahip vektörlerdir. Bu nedenle de gen tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar. Yıllardır klinik uygulamalarda kullanımı nedeniyle, virüsün büyük ölçeklerde çoğaltılması ve saflaştırması için uygun maliyetli yöntemlerin geliştirilmiş olması ve saflık, bütünlük, yaşayabilirlik, enfeksiyözlük, potens, stabilite, güvenlik, toksisite ve terapötik etkinliği belirlemek için yapılan testlerin iyi belirlenmiş olması bu virüsleri avantajlı hale getirmiştir. Bu vektörler, meme tümör hücrelerine 1A (E1A), p53, Bcl-xL ve Fas gibi proapoptotik genler, anti-ErbB2 gibi pek çok terapötik geni taşımak için kullanılmıştır [23].

Retrovirüsler, RNA virüsleridir. Bir hücreye girdikten sonra, retrovirüs RNA'sı çift iplikli lineer DNA'ya ters transkribe edilir ve sonra konak genomuna rastgele birleşir. Retroviral DNA'nın konak genomuna birleşme kabiliyeti, kanser gen tedavisinin dezavantajıdır, çünkü terapötik genlerin normal hücre genomlarına birleşmesi, konakçı geni için uzun vadeli hasara neden olabilir. Bu nedenle, retrovirüsler meme kanseri gen tedavisi için önerilmemektedir [23].

Adeno ilişkili virüs ve herpes simpleks virüsü (HSV) gibi diğer viral vektörler, kanser gen tedavisinde, öncelikle *ex vivo* gen aktarımında kullanılmaktadır. HSV virüsleri sahip oldukları büyük genom nedeniyle 40 kb büyüklüğünde DNA taşıma kapasiteleri ile viral taşıyıcılar arasında en yüksek gen taşıma kapasitesine sahip virüslerdir. Ancak terapötik kullanımları belirti göstermeyen enfeksiyon özellikleri nedeniyle sınırlıdır [71].

Adeno ilişkili virüsler (AAV), replikasyon için adenovirüslerden veya herpes virüslerinden farklı olarak ekstra genlere ihtiyaç duyan insan parvovirüsleridir. Bu vektörler konak genomuna birleşen %90'ın üzerinde epizomal transgen ekspresyonu sergilerler. AAV'ler, Adenovirüsler gibi bölünmeyen hücreler de dâhil olmak üzere çeşitli hücreleri transdüksiyona uğratma, uzun süreli gen ekspresyonu, düşük toksisite ve minimum inflamatuvar yanıt gibi avantajlar içermekle birlikte, çok miktarda üretim zorluğu, yetersiz gen ekspresyonu ve düşük boyutlu (<4,5 kb) gen taşıma kapasitesi gibi dezavantajlar içermektedir [71].

Lentivirüsler, konak genomuna birleşme yetenekleri ile çoğalmayan hücrelerde de transfeksiyon sergilerler. Ancak konak genoma spesifik olmayan birleşimi ile onkogenlerin transkripsiyonunu aktiveleştirme potansiyeline sahiptir [17].

Viral vektörlerin yüksek transfeksiyon etkinliğine rağmen, yukarıda sayılan doğal immünojenisite ve toksisite sergilemeleri, transgene birleşme riski, viral rekombinasyon, vektörün üretim ve tekrarlanan uygulamalardaki zorlukları, taşıyabilecekleri genetik materyal boyutunun sınırlı olması ve kan dolaşımından hızlı klerens (sistemik enjeksiyonu) gibi genel güvenilirlik problemleri klinik çalışmalarda kullanımını sınırlamıştır. Bu sınırlamaların üstesinden gelme ihtiyacı, alternatif taşıyıcıların gelişimini hızlandırmış ve viral olmayan vektörler ile gen tedavi klinik çalışmalarına yönelmeyi artırmıştır [72].

1.8.2. Viral Olmayan Vektörler

Viral olmayan gen aktarım yöntemleri/vektörler, hedef hücre genomuna kalıcı birleşme gerçekleştirmedikleri için düşük toksisite ve immünojenisite sergileme, üretim kolaylığı, biyobozunur özellikleri ve yüksek tekrarlı uygulanabilirlik gibi güvenilir özellikleri nedeniyle son yıllarda viral vektörlere alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca viral olmayan vektörler laboratuvar koşullarında kısa sürede üretilebilmekte ve ticari olarak kolay elde edilebilmektedir. Bu vektörler, yüksek saklama stabilitesine ve düşük üretim maliyetine sahip olup, viral vektörlere göre daha büyük DNA molekülleri taşıyabilmektedir. Ancak transfeksiyon ve ekspresyon yetenekleri viral vektörlere göre daha düşük olup geçici gen ekspresyonu sergilerler [72–74].

1.8.3. Viral Olmayan Vektörler ile Gen Aktarım Yöntemleri

Viral olmayan gen aktarım yöntemleri kimyasal ve fiziksel gen aktarım yöntemleri olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır [76].

1.8.3.1. Fiziksel Gen Aktarım Yöntemleri

Viral olmayan fiziksel yöntemlerin en basit formu çıplak DNA'nın aktarımıdır. Transfeksiyon çalışmalarının yaklaşık %18'inde çıplak DNA tek başına viral olmayan vektör olarak kullanılmaktadır. Çıplak DNA kullanımı, düşük toksisite, kolay formüle edilme, ucuz üretim ve istenmeyen reaksiyonlara neden olmama gibi avantajlı özelliklerine rağmen, düşük transfeksiyon etkinliği nedeniyle tercih edilmemektedir [2, 66]. Bu nedenle gen tedavisi çalışmalarında yüksek etkinlikte terapötik geni hedef bölgeye aktarabilmek, DNA'yı korumak ve hücre membranı ile penetrasyonu artırmak için viral olmayan vektörler ile DNA'nın kompleks oluşturması gerekmektedir [67].

Gen taşınmasında çıplak DNA'nın aktarımı için en yaygın kullanılan fiziksel yöntemler, gen tabancası, elektroporasyon (elektrik alan), sonoporasyon (ultrason) ve hidrodinamik (yüksek basınçlı) taşımadır. Bu yöntemler, plazma membranı boyunca hedef bölgeye doğrudan DNA aktarımını kolaylaştırmaktadır [76].

Gen tabancası, yüksek basınçlı helyum akımı ile hızlandırılmış plazmit DNA ile kaplı metal parçacıkların ilgilenilen bir dokuya bombardımanını ifade etmektedir. Oluşturulan kuvvet DNA'nın doğrudan sitoplazmaya hatta nükleusa aktarımını sağlar [69]. Elektroporasyon, hücre membranını geçici olarak destabilize etmek suretiyle kısa süreli (nanosaniye) yüksek voltaj uygulanmasına dayanan bir yöntemdir. Aktarım yapılacak hücre ve plazmit DNA'nın bulunduğu süspansiyona kısa sürelerde uygulanan 2000-4000 V'luk elektrik akımı ile hücre membranında oluşan porlardan DNA'nın hücreye geçişi sağlanmakta ve porların kapanması sonucu DNA'nın hücre içerisine aktarımı gerçekleşmektedir [67].

Sonoporasyon yumuşak dokularda yüksek başarı gösteren, derin bölgelere gen aktarım için uygulama zorluğu taşıyan bir yöntemdir. Yöntem, ultrason kullanılarak akustik kaviteasyon ile hücre permeabilitesini arttırmak ve hücre membranında oluşturulan geçici porlardan DNA'nın sitoplazmaya pasif difüzyonu ile aktarımına dayanmaktadır. Bu yöntem ile elde edilen büyük gelişme mikrobaloncuk ya da kontrast ajanlar ile kombine edilmesine bağlı olarak transfeksiyon etkinliğinin artırılmasıdır. Bu mikrobaloncuklar ile klinikte kullanım amacıyla ilk ticari ürün Optison™ adı verilen DNA yüklü albümin mikrobaloncuklar (Molecular Biosystems, San Diego, CA, USA) piyasaya sürülmüştür [77].

1.8.3.2. Kimyasal Gen Aktarım Yöntemleri

Viral olmayan kimyasal gen aktarım vektörleri çoğunlukla katyonik yapıdaki lipit ve polimerler olup negatif yüklü DNA ile elektrostatik etkileşim yoluyla kompleks oluşumunu sağlayan sentetik vektörlerdir. Bu katyonik özellikleri nedeniyle DNA'nın negatif yükünü baskılamak, kondansasyonunu arttırmakta, negatif yüklü hücre membranlarından hücre içerisine geçişi sağlamakta, kompleksi nükleaz degradasyonundan korumakta ve hücre alımı arttırmaktadır [51, 59, 77]. Ayrıca bu vektörler, spesifik olarak doku ya da hücrelere hedeflenebilir şekilde modifiye edilebilmekte ve boyutları kolaylıkla ayarlanabilecek şekilde tasarlanabilmektedir. Gen aktarımında önemli olan nokta, vektör/DNA kompleksinin biyouyumluluğu, hücre toksisitesi ve uygulama yoludur [62].

Lipit ve polimerlerden oluşan viral olmayan gen taşıyıcı sistemler genellikle 10–1000 nm boyut aralığındaki polimerik ve metalik nanopartiküller, lipozomlar, polimerik miseller,

nanojeller, nanokapsüller, dendrimerler, karbon nanotüpler, nanokristaller ve katı lipid nanopartikülleri gibi pek çok sistemi ifade etmektedir. Bu sistemler, küçük moleküllü ilaçların yanı sıra proteinler, peptidler, aptamerler, DNA ve küçük interfere RNA (siRNA) gibi terapötik makromoleküllerin taşınması için aktif olarak kullanılmaktadır [78, 79]. Bu sistemlerden başlıcaları aşağıda verilmiştir.

1.8.3.2.1. Lipit Tabanlı Gen Taşıyıcı Sistemler

Katyonik lipidler gen taşıma çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Amfifilik yapıdaki bu katyonik lipidler, bir bağlayıcı ile birbirine bağlanan, pozitif yüklü bir hidrofilik baş ve hidrofobik bir kuyruktan oluşurlar. Pozitif yüklü grupları nedeniyle, fizyolojik pH'da DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları ile kompleks oluştururlar. Bu lipidler tek başına DNA taşıyıcısı olarak kullanıldığı gibi lipozom, nanopartikül ve nanoemülsiyonların yapısına katılarak da gen taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilirler. Lipozomlar genellikle fosfolipidler gibi doğal katyonik lipidlerin doğrudan kullanıldığı formülasyonlar olup küresel şekilli nanotaşıyıcılardır. Sulu ortamda hidrofobik gruplar sudan uzaklaşma eğiliminden dolayı iç kısımda toplanırken, hidrofilik baş kısımları su ile etkileşerek çift katmanlı hücre membranına benzer yapıda lipozom formülasyonlarını oluştururlar. Gen taşıma çalışmalarında, lipozom yapısındaki pozitif gruplar DNA'nın negatif yüklü grupları ile elektrostatik olarak etkileşerek lipopleks adı verilen, boyutları 50 nm'den mikrometreye kadar değişen kompleksler oluştururlar. DOTMA ve DOTAP gen taşıma çalışmalarında sıklıkla kullanılan katyonik lipidlerdir. Gen aktarım çalışmalarında katyonik lipidlere ek olarak kullanılan dioleilfosfatidilethanolamin (DOPE) ya da kolesterol gibi yardımcı lipidler lipozomların faz geçişine neden olarak transfeksiyon etkinliklerini arttırmaktadır. Lipidler hücre membranına benzer yapılar olduğundan immünojenite riskleri ya yoktur ya da çok düşüktür [66, 77].

1.8.3.2.2. Polimer Tabanlı Gen Taşıyıcı Sistemler

Sentetik ve doğal yapıdaki katyonik polimerler yapılarında bulunan amin grupları ile DNA'da bulunan negatif yüklü fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşim nedeniyle polipleks adı verilen sıkı paketlenmiş stabil kompleksleri oluştururlar. Bu sayede katyonik polimer/DNA komplekslerinin pozitif yükü, negatif yüklü membranlar ile etkileşimi sağlamakta, sıkı paketlenmeye bağlı olarak meydana gelen düşük boyut (<200 nm) hücresel engellerden geçişi kolaylaştırmakta, endositoz ile hücresel alımı ve transfeksiyon etkinliğini arttırmaktadır [14, 80, 81].

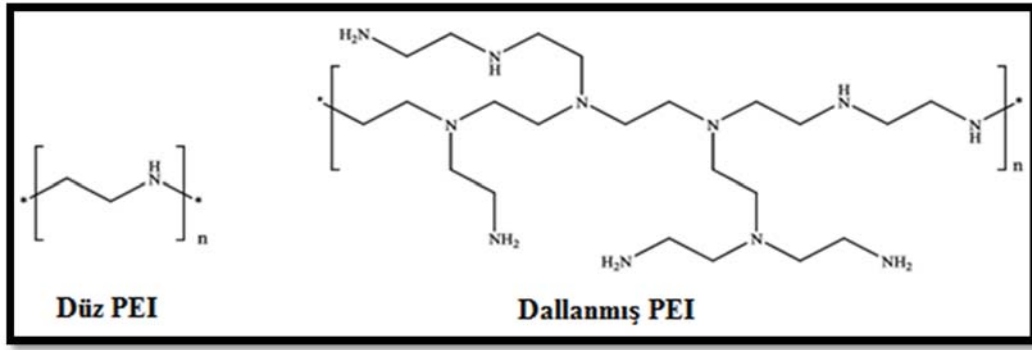
Gen tedavisi için kullanılan pek çok farklı katyonik polimer bulunmaktadır. Bunlar polietilenimin (PEI), poli(L-lizin)(PLL), poliamidoamin (PAMAM) ve polipropilamin dendrimerler, poli (L-histidin)-graft-poli(L-lizin), kitosan, katyonik dekstran, katyonik peptidler ve jelatindir [77, 82, 83]. Lipit tabanlı sistemlere kıyasla katyonik polimerler, yüksek boyutlu DNA'nın sıkı paketlenmesi ile oldukça düşük boyutlu elde edilmesi, saklama stabilitesi, hedeflenebilirlik, büyük miktarlarda kolay üretim, nükleaz degradasyonundan koruma, düşük konak immün cevap ve toksisite gibi özellikleri nedeniyle çok daha avantajlıdır. Ayrıca, düşük boyutları ve ayarlanabilir fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, kanda kalış süreleri ve yüksek hücresel alımları son zamanlarda katyonik polimerleri daha çekici hale getirmiştir [56, 69, 77, 84]. Bu özelliklerin yanı sıra, pozitif yüklü poliplekslere hedefleyici yapılar ve çeşitli salım mekanizmalarının eklenmesi ile akıllı polimerik partikülleri oluşturuvcu tasarım değışiklikleri yapılabilir [86].

Katyonik polimerler arasında yer alan Polietilenimin (PEI) yüksek yük yoğunluğu nedeniyle (her 3.atomu protonlanabilen azot atomuna sahip) nükleik asit taşınması için yaygın olarak kullanılan katyonik polimerlerden biridir ve viral olmayan gen taşıyıcı vektörler olarak sıklıkla kullanılmaktadır [15]. Tez çalışmamız kapsamında, Poli(2-etil-2-oksazolin) polimerinin kısmi hidrolizi ile sentezlenen PEI katyonik polimeri kullanılarak miseller sistemler hazırlandığından dolayı aşağıda PEI polimeri hakkında detaylı bilgilere yer verilmiştir.

Polietilenimin (PEI)

İlk olarak Boussif ve arkadaşları tarafından 1995 yılında rapor edilmiş olan PEI, o zamandan itibaren üstün transfeksiyon yeteneğı nedeniyle gen taşıma çalışmalarında altın standart olarak kabul edilmiştir [87]. PEI, dallanmış ve lineer (düz) olmak üzere iki farklı yapıda olup, yapıdaki yüksek amin varlığının neden olduğu yüksek katyonik yük yoğunluğu, plazmit DNA ve oligonükleotidler ile başarılı bir şekilde kompleks oluşturmasını sağlamaktadır [88] (Şekil 1.9).

Düz ve dallanmış yapıdaki PEI'in sentez yöntemleri farklılık teşkil etmektedir. Düz PEI, düşük sıcaklıkta 2-süstitü-2-oksazolin monomerinin katyonik polimerizasyonu, poli(2-etil-2-oksazolin) (PEtOx) ya da poli (2-metil-2-oksazolin) gibi poli (2-alkil-2-oksazolin)(PAOx) lerin asidik ya da bazik hidrolizi ile sentezlenirken, dallanmış PEI, yüksek sıcaklıkta aziridin monomerinin asit katalizli halka-açma polimerizasyonu ile sentezlenmektedir [78].



Şekil 1. 9. Dallanmış ve düz PEI kimyasal yapısı [47]

Düz PEI omurgasında bulunan ikincil aminler ve dallanmış PEI omurgasında 1:1:1'e yakın oranda bulunan birincil, ikincil ve üçüncül aminler, endositozdan sonra polimerin endozom içerisinde düşük pH'da protonlanmaya uğramasına neden olur. Protonlanmayı takiben, beraberinde klorür iyonları da endozom içersine ATPaz aracılığı ile aktif taşınır. Böylece, endozom içerisinde artan osmotik basınç, endozomun şişmesi ve yırtılmasıyla, PEI/DNA komplekslerinin sitozole salınmasına ve DNA'nın lizozomal degradasyondan korunmasına neden olur. Bu etkiye proton sünger etkisi denilmektedir. PEI'nin yüksek transfeksiyon etkinliği, yüksek kationik yük yoğunluğu ve bu proton süngerisi olarak ifade edilen özelliği ile ilişkilidir [86, 88].

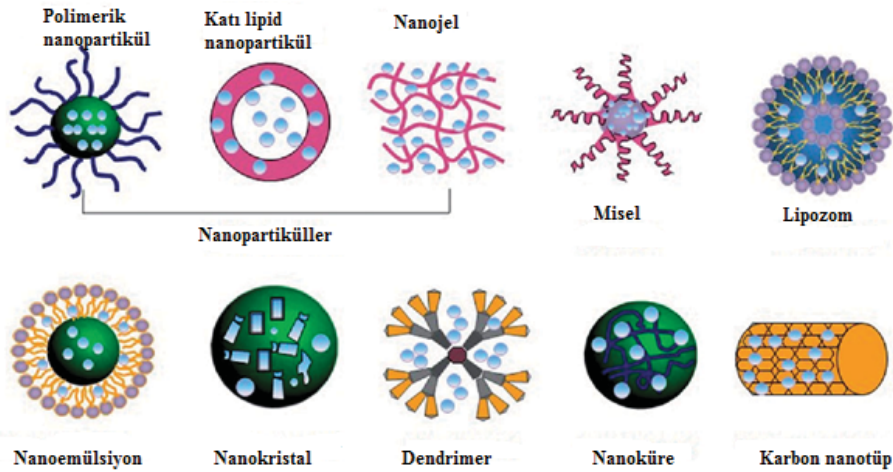
Gen aktarım çalışmalarında genellikle uygun fizikokimyasal özellikleri, stabilite, sitotoksisite özelliklerinin yanı sıra *in vitro* ve *in vivo*'da yüksek gen transfeksiyonu sergiledikleri için dallanmış 25 kDa ve düz 22 kDa ya da 25 kDa PEI'ler, yeni viral olmayan gen aktarım vektörlerinin etkinliklerinin karşılaştırılması ve değerlendirilmesi için referans olarak kullanılmaktadır [90]. PEI'lerin gen transfeksiyon etkinlikleri mevcut viral olmayan gen vektörlerinin birçoğundan üstün olmasına rağmen, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanımlarındaki en büyük zorluk sitotoksisitedir. Özellikle, moleküler ağırlık, dallanma derecesi, çözeltinin iyon kuvveti, zeta potansiyel ve partikül büyüklüğü gibi birçok faktör PEI'nin etkinliğini ve sitotoksisitesini etkilediğinden dolayı, düşük moleküler ağırlıklı düz PEI'lerin düşük yük yoğunluğu ve dallanma taşımaması nedeniyle düşük toksisite ve düşük transfeksiyon etkinliği sergilediği belirtilmiştir. Yüksek moleküler ağırlık ve dallanmış PEI taşıdığı yüksek pozitif yük yoğunluğu nedeniyle yüksek transfeksiyon etkinliği ile birlikte yüksek toksisiteye neden olmakta ve negatif yüklü plazma membranı yüzeyinde büyük agregatlar oluşturarak nekroza yol açmaktadır. Aynı zamanda kan serum bileşenleri ile spesifik olmayan etkileşimleri, RES tarafından komplekslerin sistemden kolaylıkla uzaklaştırılmasına neden olmaktadır. PEI'nin

biyobozunur olmayışı, uzun süreli toksisiteyi arttırmakla birlikte, vücutta birikim nedeniyle sınırlı renal klerense yol açmakta ve *in vivo* uygulamalarda kullanımını azaltmaktadır [77, 90–92].

Belirtilen bu dezavantajların azaltılması, PEI'nin biyoyumluğu ve transfeksiyon etkinliğinin artırılması açısından çok önemlidir. Bu nedenle çeşitli PEI modifikasyonları gen taşıma çalışmalarında önem taşımaktadır. En sık rastlanan, PEI'nin sentezi ile ilişkili olup, yapılan çalışmalar, Poli (2-etil-2-oksazolin) (PEtOx)'in kısmi hidroliziyle sentezlenen düz PEI'nin transfeksiyon aktivitesinin *in vitro*'da dallanmış PEI kadar yüksek ancak sitotoksitesinin daha düşük olduğunu ortaya koymuştur [49, 87, 92–94]. Bu nedenle, gen taşıma çerçevesinde yeni PEtOx tabanlı nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi oldukça ilgi çekici bir yaklaşım olabilir.

1.9. Nanotaşıyıcı Sistemler

Son zamanlarda meme kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünün tedavisi için nanoölçekteki (10-200 nm) terapötik sistemlerin kullanımı oldukça popüler bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir [80, 81, 95]. Bu sistemler, polimerik miseller, polimer-ilaç konjugatları, dendrimerler, lipozomlar ve inorganik partikülleri kapsamaktadır [79, 95] (Şekil 1.10). Geleneksel molekül-tabanlı tedavi modelleri ile kıyaslandığında, nanoterapötik sistemler kanser tedavisi için yüksek yükleme kapasitesi, uzun kan dolaşım süresi, sağlıklı dokulara karşı azaltılmış toksisite ve arttırılmış anti-tümör etkisi gibi önemli potansiyel avantajlara sahiptir.



Şekil 1. 10. Nanoölçekli ilaç/gen taşıyıcı sistemler [97]

Klinik çalışmalarda daha önce bahsedildiği üzere, lipopleks ve poliplekslere dayanan farklı polimerik nano-taşıyıcılar arasında sentetik polimer kimyası ve biyoteknolojideki son atılımlar, spesifik dokuların hedeflenmesi ve kimyasal veya fiziksel uyaran duyarlılığı gibi

akıllı fonksiyonlara sahip polimerik misellerin ön planda tutulmasına neden olmuştur. Bu amfifilik nanoyapıdaki miseller, proteinler, antikanser ilaçları, siRNA, DNA gibi çeşitli terapötik ajanları kanser hücrelerine aktarabilme yeteneğine sahiptir.

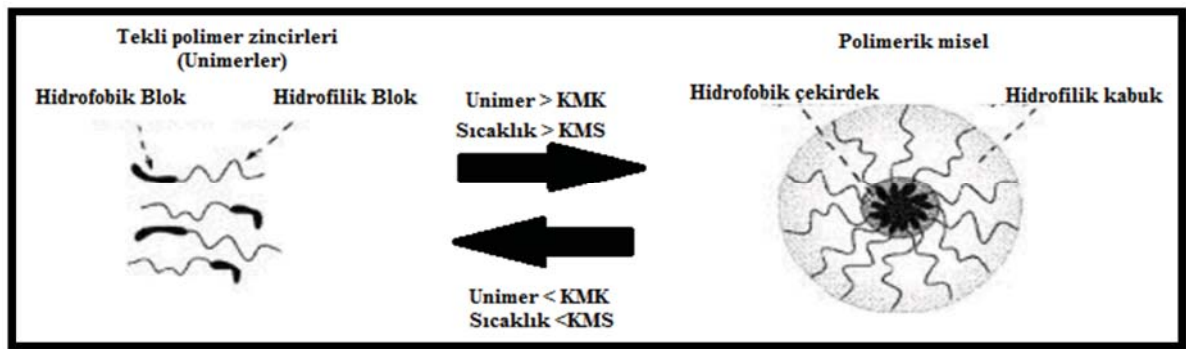
1.10. Polimerik Miseller

1960'ların sonlarında ilaç taşıyıcı sistemler olarak miseller, amfifilik özellikleri ile kendiliğinden oluşum sergilemesi, kolaylıkla kontrol edilebilir özellikleri ve iyi farmakolojik özellikleri ile ilgi görmeye başlamıştır [78, 79]. 1980 yılında ise, ilk olarak Rinsdorf ve arkadaşları tarafından kanser tedavisinde polimerik misellerin kullanımı rapor edilmiştir [98]. Polimerik miseller mükemmel biyouyumluluğu, düşük toksisitesi, uzun kan dolaşım süresi yetenekleri ile ilaç ve gen taşıma alanındaki klinik çalışmalarda popülerlik kazanmıştır. Kore Samyang Şirketi (Seoul, Republic of Korea) tarafından üretilen, Genexol-PM® (mPEG-b-PLLA / paclitaxel), dünyanın ilk nano ölçekli misel preparatıdır [99].

1.10.1. Polimerik Misellerin Oluşumu

Polimerik miseller, genellikle nano ölçekli (10-200 nm), küresel, koloidal partiküller olup sulu ortamlarda biyouyumlu hidrofilik ve hidrofobik blok içeren amfifilik blok kopolimerlerin çekirdek-kabuk şeklinde kendiliğinden düzenlenmesi ile oluşan yapılardır [99–101].

Miselleri oluşturan amfifilik unimerler belirli bir sıcaklık ve konsantrasyon altında tek başına polimer zincirler halinde bulunmaktadır. Bu unimerlerin kendiliğinden düzenlenerek misel oluşturmaları, sulu çözelti ortamında entropik olarak belirli bir sıcaklık ve konsantrasyon üzerine çıktığında meydana gelmektedir (Şekil 1.11) [103]. İfade edilen bu sıcaklığa kritik misel sıcaklığı (KMS), konsantrasyona ise kritik misel konsantrasyonu (KMK) denilmektedir [104].

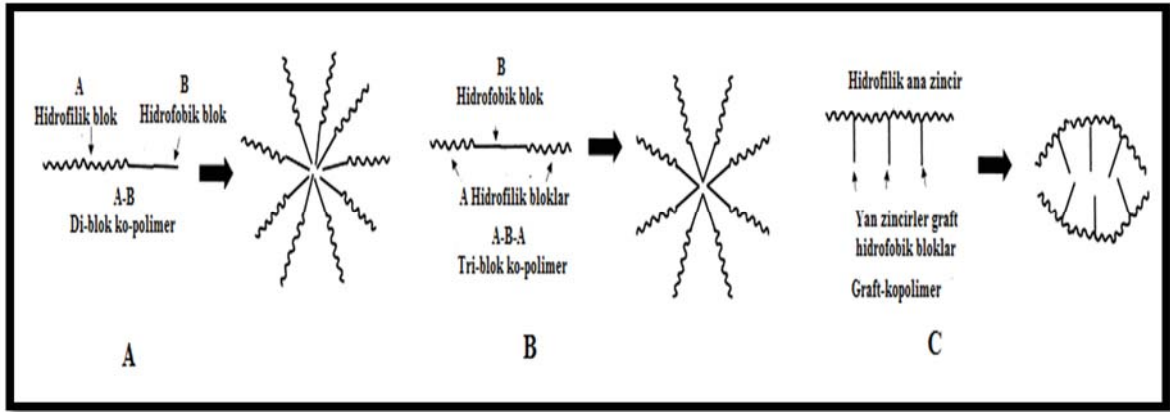


Şekil 1. 11. Polimerik misellerin düzenlenmesi [103]

KMK'da blok kopolimerin hidrofobik kısmı, sudan uzaklaşarak veziküler ya da çekirdek-kabuk şeklinde miseller yapının oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Teorik olarak, misellerin oluşumu serbest enerjinin azalması ile gerçekleşmektedir. Sulu ortamda, miseller oluşurken blok kopolimerin hidrofobik kısmı sudan kaçma eğilimi ile kendi içinde bir araya gelerek yarı-katı misel çekirdeğini oluştururken, hidrofilik kısmı ise sulu ortamla etkileşerek hidrojen bağı kurmakta ve sistemin serbest enerjisinde düşme meydana getirerek kabuk katmanını oluşturacak şekilde kendiliğinden düzenlenmektedir. Bu enerji fazlası kendi içinde bir araya gelen hidrofobik kısımların Van der Waals bağları ile birbirlerine bağlanmasına neden olarak miselleri oluşturmaktadır [103, 104]. Oluşan çekirdek-kabuk mimarisi, ilaç taşıma amacına uygunluk göstermektedir. Çünkü dış kabuk, miseli hızlı klerensten korurken, hidrofobik çekirdek suda çözünmeyen ilaçların çözünürlüğünü arttıran bir rezervuar görevi görmektedir. Polar moleküller ise, misel yüzeyine adsorbe olurken, orta polarlıktaki moleküller ise hidrofilik kılıfa hapsolmaktadır. Misel oluşumu için, farklı özelliklere sahip blok kopolimerler kullanılsa da en önemli kriter polimerlerin biyouyumluluğu ve/veya biyoparçalanabilirliğidir [79, 95].

1.10.2. Polimerik Misellerin Yapısı

Polimerik miselleri oluşturan amfifilik blok kopolimerler, diblok (A-B), triblok (A-B-A), dördümlü blok, çoklu blok ya da graft şeklinde düzenlenebilmektedir (Şekil 1.12). Graft polimer, bir polimer zincirinin omurgasına yan pozisyonunda başka bir polimer zincirinin graft edilmesiyle oluşturulmaktadır. A-B diblok ve A-B-A triblok kopolimerlerde, A hidrofilik bloğu, B hidrofobik bloğu temsil etmek üzere iki farklı polimerden oluşurken, A-B-C blok kopolimerde üç farklı polimer kullanılmaktadır. Bu dizilimin en yaygın olarak kullanılan biçimlerinden biri, ticari olarak Pluronic ve Poloxamer olarak isimlendirilen, PEO-PPO-PEO yapısındaki ABA blok kopolimeridir [104, 105]. Bu yaygın kullanım içerisinde şimdiye kadar, hem di- hem de tri-blok kopolimerleri için en temel kabuk oluşturucu hidrofilik blok, 1 ile 15 kDa aralığında moleküler ağırlığa sahip poli(etilenglikol) (PEG) olarak bilinen poli (etilenoksit) (PEO)'dir [95, 104].



Şekil 1. 12. Farklı amfilik ko-polimerler ile misel oluşum mekanizması A) Di-blok ko-polimer B) Tri-blok ko-polimer C) Graft ko-polimer [105].

Bugüne kadar PEG dışında çeşitli kabuk oluşturuca hidrofilik blok ve poliesterler, polieterler ve poliaminoasitleri içeren bir dizi farklı çekirdek oluşturuca blok bildirilmiştir (Çizelge 1.1). Bunlar arasında en çok kullanılan Poli (D, L-laktid) (PLA) ve poli (glikolik asit) (PGA), ve poli (ϵ -kaprolakton) (PCL), poli (trimetilen karbonat) (PTMC) ve (propilen oksit) (PPO)'i gibi poliesterler, biyomedikal uygulamalar için ABD İlaç ve Gıda Dairesi tarafından onaylı olduklarından dolayı oldukça avantajlıdır. Ayrıca yapıya disteroilfosfatidiletanolamin (DSPE) gibi kısa, hidrofobik fosfolipit eklenmesi misellerin stabilitesini artırdığını ortaya koymaktadır. Ayrıca gen taşınması için kopolimerin bir kısmına Poli(etilenimin)PEI, poli(L-lizin) PLy, polidimetilmetakrilat (PDMAEMA) gibi polikasyonların, diğer kısmına da PEG ya da dekstran gibi yüksek hidrofilik polimerlerin eklenmesinin transfeksiyon etkinliğini büyük ölçüde arttırdığı ifade edilmiştir [107].

Çizelge 1. 1. Polimerik misellerin hazırlanmasında yaygın kullanılan polimerik bloklar [107]

Kopolimerler	Kısaltmalar	Tekrarlayan ünite yapıları
Kabuk oluşturuucu bloklar		
Poli (etilen glikol)	PEG, PEO	
Poli (N-vinil pirolidon)	PVP	
Poli (N-isopropil akrilamid)	pNIPAAm	
Poli (2-oksazolin)	POx	
Çekirdek oluşturuucu bloklar		
Polieterler	PPO	
Poli(Propilen oksit)		
Poliesterler		
Poli (L-laktid)	PLA	
Poli (D,L-laktid)	PDLLA	
Poli (laktid-ko-glikolid)	PLGA	
Poli (ε-kaprolakton)	PCL	
Poli (β-aminoester)		
Poliamidler		
Poli (L-histidin)	pHis	
Poli(L-aspartikasit) türevleri	pAsp	
Poli(L-glutamikasit) türevleri	pGlu	

Amfifilik blok kopolimerlerden oluşan polimerik misellerin hazırlanması, hidrofobik ve hidrofilik blok seçimi ve bunlar arasındaki ağırlıkça orana bağlıdır. Çünkü her segmentin sorumlu olduğu bir özellik bulunmaktadır. Hidrofobik blok, iyi biyouyumluluk, stabilite, yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve kontrollü ilaç salım profilinden sorumlu iken, hidrofilik kabuk hedefleyici ligandların bağlanması ile aktif hedefleme, sterik stabilite ve retiküloendotelial sistemden kaçışa bağlı dolaşımda uzun süre kalmayı sağlamaktadır [75].

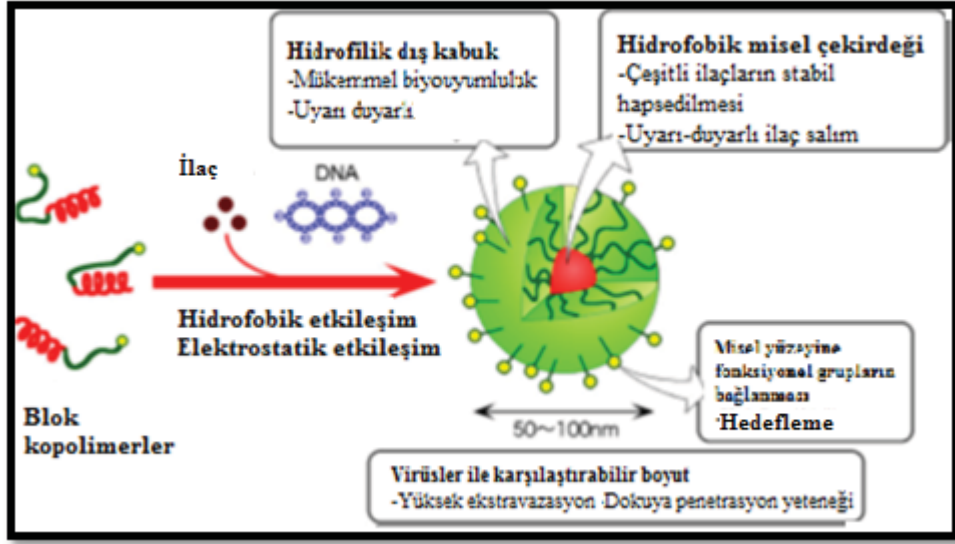
1.10.3. Polimerik Misellerin Avantajları

Polimerik misellerin çekirdek kısmını oluşturan hidrofobik polimerler arasında kurulan bağlar misellerin yüksek stabilitede olmasını sağlamaktadır. Hidrofobik özellikteki çekirdek suda düşük çözünürlüğe sahip hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü artırarak oral biyoyararlanımı arttırmaktadır. Çekirdek-kabuk yapısı, hidrofobik çekirdeğe hapsedilen ilaçların sulu çevrenin yıkıcı etkilerine karşı stabilitesinin korunmasını ve yan etkilerinin azaltmasını sağlamaktadır. PEG gibi polimerlerin yer aldığı hidrofilik kabuk yapısı biyouyumluluğu arttırmakta, misellerin kan bileşenleri, spesifik proteinler ve hücre ve dokular ile etkileşimini azaltmakta ve opsonin absorpsiyonuna bağlı olarak mononükleer fagosit sistem tarafından klerensini önlemektedir [75].

Misellerin sahip oldukları düşük kritik misel konsantrasyonu dolaşımda dilüsyona bağlı olarak ayrışmasını engellemekte ve daha iyi termodinamik stabilite ve kinetik stabilite sergilemesine neden olmaktadır. Düşük boyut, damar tıkanıklığını engellemekte, hidrofilik kabuk yapısı karaciğerdeki mononükleer fagositik sistemden (MPS) kaçınarak kanda kalış süresini arttırmakta, renal klerens için engel oluşturmamakta ve EPR etkisi ile pasif hedeflendirmeye bağlı olarak kusurlu ve sızıntılı bir vaskülatörü olan tümör dokusunda birikmesine neden olmaktadır [107, 108].

Nükleik asitler ve proteinler gibi yüklü moleküllerin pozitif yüklü polimere elektrostatik etkileşimler ile bağlanabilmesi misellere büyük avantaj kazandırmaktadır [110]. Ayrıca uyaran duyarlı (pH, ışık, sıcaklık gibi) polimerik misellerin tasarımı ile ilacın tümör bölgesinde salımının kontrolü sağlanabilmektedir [111].

Bu özelliklerin yanı sıra, düşük toksisite sergilemeleri, büyük ölçekte üretimleri, sterilizasyonlarının özel aseptik işlem gibi yöntemler gerektirmeden basit filtreleme ile gerçekleştirilmesi ve polimerin kimyasal yapısının kontrol edilebilmesi miseller sistemleri intravenöz olarak uygulanabilen ilaç taşıyıcı sistem kullanımları için uygun hale getirir [79, 107, 111, 112] (Şekil 1.13).



Şekil 1. 13. Polimerik misellerin avantajlı özellikleri [114]

1.10.4. Polimerik Misellerin Stabilitesi

Polimerik misellerin stabilitesi, termodinamik ve kinetik stabilite ile ifade edilmekte olup, kritik misel konsantrasyonu (KMK) ve kritik misel sıcaklığı ile ilişkilidir. Kritik misel konsantrasyonu ve sıcaklığı altında amfifilik moleküller sulu çözeltide unimerler şeklinde kalmakta iken, kritik misel sıcaklığı ve kritik misel konsantrasyonu üzerinde bu amfifilik moleküller kendiliğinden düzenlenen agregatlar şeklinde miseli oluşturmaktadır. Kısacası, sulu çözeltideki polimer konsantrasyonu KMK üzerinde olduğunda polimerik miseller termodinamik açıdan stabil olarak kabul edilmektedir. KMK değeri blok kopolimerin kimyasal yapısı, hidrofilik:hidrofobik blok uzunluk oranına bağlı olmakla birlikte misel morfolojisinde de etkilidir. Özellikle hidrofobik bloğun uzunluğunun KMK üzerinde önemli etkisi olduğu belirtilmiştir. Daha uzun bir hidrofobik zincir daha düşük bir KMK'ye neden olmaktadır [103, 114].

Polimerik miselleri oluşturan blok kopolimerler avantajlı özellikleri nedeniyle Tween-80 gibi geleneksel sürfaktanlar ile hazırlanan misellere göre çok daha stabildir. Bu sürfaktanların kritik misel konsantrasyonları 10^{-3} ve 10^{-4} olup polimerik miseller ile kıyaslandığında kritik misel konsantrasyonları çok daha yüksektir. Polimerik misellerde bu konsantrasyon 10^{-6} ve 10^{-7} 'ye düşmektedir. Bu da daha fazla biyoyumluluk ve gelişmiş stabilite anlamına gelmektedir [106].

Genellikle, düşük kritik misel konsantrasyonuna sahip amfifilik blok kopolimer miseller, ortamdaki amfifilin düşük konsantrasyonlarında dahi yüksek stabilite sergilemektedir. Kopolimerin hidrofobitesindeki artış KMK değerini azaltmakta, bu da misel stabilitesini artırmaktadır [104, 115]. Polimerik miseller intravenöz uygulamaya bağlı olarak kan

dolaşımında yüksek oranda seyrelmeye maruz kaldığından (yaklaşık 25 kat ve üstü), kanda uzun süreli dolaşım ve hedef bölgeye seçici olarak taşıdıkları ajanların aktarımını sağlayabilmek için düşük kritik misel konsantrasyonuna sahip olmaları gerekmektedir. Miselleri oluşturan polimer konsantrasyonu, KMK değerinin altında ise, polimerler monomerlere ayrılmaya başlar. Bu nedenle *in vivo* dolaşımda uzun süre kalmaz ve taşıdıkları terapötik moleküller hedef bölgeye ulaşamaz. Özellikle gen aktarım çalışmalarında taşıyıcı sistemden ayrılan çıplak DNA moleküllerinin nükleaz degradasyonuna uğrayarak hızlı klerense uğradığı belirtilmiştir. Düşük KMK'ye sahip polimerik miseller ise çok düşük polimer konsantrasyonlarında dahi stabil kaldıklarından dolayı, seyrelmeye nispeten duyarsız hale gelerek dolaşımda uzun süreli kalabilirler. Ayrıca kopolimer konsantrasyonunun, KMK'nın çok fazla üzerine çıkması miseli oluşturan hidrofilik blokların çapraz bağlanmasına neden olarak misellerin agregasyonuna neden olabilir [116, 117].

Polimerik misellerin kinetik stabilitesi, misellere fiziksel olarak hapsedilen terapötik ilaç ya da genin, miseller taşıyıcıdan salındığı süre ve oranı ifade etmektedir. Miselleri oluşturan blok kopolimerlerin yüksek hidrofobik etkileşimleri yüksek kinetik stabiliteye neden olmaktadır. Ancak, biyolojik çevrede polimerik misellerin kinetik stabilitesi çeşitli proteinler ve kan bileşenlerinden etkilenmektedir. Özellikle α ve β globülinler polimerik misellerin destabilizasyonuna neden olarak ilaç/genin hızlı bir şekilde salınmasını teşvik etmekte, kırmızı kan hücreleri ve γ globülin misel stabilitesini çok fazla etkilememektedir [104].

Misellerin termodinamik ve kinetik stabilitelerinin artırılması için çeşitli polimer stratejileri ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında, misel yapısına polialifatik esterler ve polifosfoesterlerin eklenmesi ile çapraz bağlı çekirdek ya da kabuk oluşturulması, uyarı duyarlı polimerlerin geliştirilmesi ve yapıya uzun hidrofobik, kısa hidrofilik blokların eklenerek KMK azaltılması bulunmaktadır [118, 119].

1.10.5. Polimerik misel çeşitleri

Polimerik misellerin oluşumu çekirdek kısmını oluşturan hidrofobik blokların sulu ortamdan ayrılmasını yöneten moleküller arası kuvvetlere dayanır. Buna bağlı olarak farklı çeşitlerde polimerik miseller bulunmaktadır. Geleneksel polimerik miseller, poliyon kompleks miseller ve kovalent olmayan şekilde bağlı polimerik miseller bunlar arasındadır.

Geleneksel Polimerik Miseller

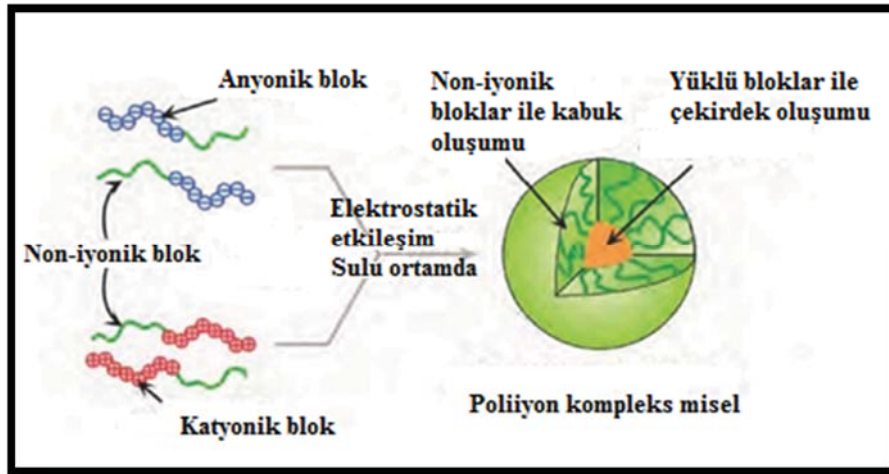
Geleneksel polimerik miseller daha önce belirtildiği gibi, çekirdek oluşturuucu hidrofobik bloklar ve kabuk oluşturuucu hidrofilik bloklar arasındaki hidrofobik-hidrofilik etkileşime bağlı olarak, PEO-PPO-PEO gibi amfifilik blok kopolimerler ile oluşturulmaktadır [121].

Kovalent Olmayan Şekilde Bağlı Polimerik Miseller

Polimerik miseller blok kopolimer içermeyen bir teknikle oluşturulmaktadır. Çekirdek ve kabuk, homopolimerlerin zincir sonlarındaki H-bağı kurulması veya metal-ligand etkileşimleri gibi spesifik moleküller arası etkileşimlerle kovalent olmayan bir biçimde bağlanarak miselleri oluştururlar [121].

Poliiyon Kompleks Miseller

Poliiyon kompleks miseller, polielektrolitler gibi katyonik ve anyonik yük taşıyan sentetik polimerler ya da bir çift ve/veya daha fazla sayıdaki zıt yüklü doğal polimerin sulu ortamda kolaylıkla kendiliğinden düzenlenmesi ile misel oluşumuna dayanmaktadır. Kompleksler hazırlanırken yüklü iyonik polimerlerden en az birine bağlanan iyonik olmayan PEG gibi bir hidrofilik polimerin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Hidrofilik segment sulu ortamda kabuk yapısını oluştururken, zıt yüklü polimerlerin elektrostatik etkileşimi miselin çekirdek kısmını oluşturmaktadır (Şekil 1.14)[121].



Şekil 1. 14. Zıt yüklü blok kopolimerden poliiyon kompleks misellerinin oluşumu [122].

Elektrostatik etkileşimler kendiliğinden düzenleme için gerekli bir temel itici güç olmakla birlikte tek başına misel oluşumunda etkili değildir, hidrofobik etkileşimler ile birlikte nihai misel oluşumu gerçekleşmektedir. Özellikle katyonik polimerler ile hazırlanan poliiyon komplekslerin negatif yüklü DNA ile elektrostatik etkileşimi viral olmayan gen taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için umut vericidir.

Kasyonik misel oluşturucu blok polimerler kullanılarak, negatif yüklü pDNA ve siRNA gibi nükleik asitler elektrostatik etkileşim yoluyla fizyolojik pH'da misel çekirdeğinde tutulabilir ve kararlı kompleksler (miselpeksler) oluşturulabilir. Nükleik asitlerin pozitif yüklü polimerler ile kompleksleşmesi ya da enkapsülasyonu nükleik asidin yükünü azaltır ve nanoboyut aralığında partiküllerin oluşumu ile hücrelere permeabilitesinin artmasıyla sonuçlanır [114].

1.10.6. Polimerik Misellerin Hazırlama Yöntemleri

Polimerik miseller, kimyasal ve fiziksel yöntemler olmak üzere iki şekilde hazırlanmaktadır. Kimyasal yöntem, ilacın polimere kovalent olarak bağlanması takiben, miselin kendiliğinden düzenlenmesi ile çekirdek içerisine hapsolması esasına dayanmaktadır. Yöntem, hazırlama süresinin uzun olması, zorlu ve karmaşık olabilecek bir dizi kimyasal reaksiyon içermesinden dolayı pek fazla tercih edilmemektedir. Bunun yerine polimerik misellerin çoğu, doğrudan çözünme, ince film hidrasyon, diyaliz, çözücü buharlaştırma ve dondurarak kurutma gibi çeşitli fiziksel yöntemler ile hazırlanmaktadır [117].

Doğrudan znme yöntemi, suda çözünürlüğü yüksek kopolimerler ile misel hazırlanması için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, ilaç ve blok kopolimerin doğrudan sulu ortamda çözülmesine dayanmakta olup hızlı ve basit bir yöntemdir. İlacın misellere yüklenmesi için karıştırma, ısıtma ve/ya sonikasyon gerekebilmektedir. Yöntemin dezavantajı ilaç yükleme etkinliğinin düşük olmasıdır [117].

Diyaliz yöntemi, sudaki çözünürlüğü düşük olan amfifilik blok kopolimerler ile misellerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Blok kopolimer ile ortak bir organik çözücü içerisinde çözünebilen ilaçların yüksek etkinlikte misellere yüklenebilmesi açısından avantajlı bir yöntemdir. Yöntem dimetilsülfoksit (DMSO), N,N-dimetilformamid (DMF), asetonitril (ACN) ve aseton gibi su ile karışabilen organik çözücü içerisinde ilaç ve blok kopolimerin çözülmesi ve suya karşı diyaliz edilmesi ile polimerik miselin oluşumuna dayanmaktadır. Diyaliz membran içerisinde bulunan organik çözücü, su ile yer değiştirerek miselin ilaç ile birlikte kendiliğinden düzenlenmesine neden olmaktadır. Yöntem, znrlğ düşük ilaçlar ve yüksek hidrofobisiteye sahip çekirdek oluşturucu blok polimerler için avantajlıdır [117].

Çözücü buharlaştırma yönteminde, kopolimer ve ilaç ortak bir çözücü ya da birbiri içerisinde karışabilen çözücüler içerisinde ayrı ayrı çözülür. Sonrasında organik çözücü evapore edilerek uzaklaştırılır ve oluşan film ılık su ya da tampon ile rekonstitüye edilerek

polimerik misellerin oluşumu gerçekleştirilir. Rekonstitüye edilen örnekler, sonike edilerek ya da yüksek basınçlı bir ekstrüderden geçirilerek geniş boyut dağılımlı partiküllerin oluşumu engellenebilir. Aynı örneklere diyaliz uygulaması yapılarak fazla ilacın uzaklaştırılması da sağlanabilmektedir [117].

İnce film hidrasyon yöntemi, basit, hızlı uygulanabilir, küçük ve uniform dağılımlı partiküllerin elde edilme yeteneğinden dolayı oldukça avantajlıdır ve bu nedenle misellerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Yöntemin temeli, blok kopolimer ve ilacın ortak bir organik bir çözücü ya da birbiri içerisinde karışabilen çözücüler içerisinde çözülmesini takiben, organik çözücünün vakum altında rotavapor aracılığı ile uzaklaştırılması sonucu cam balon yüzeyinde ince bir film oluşumuna dayanmaktadır. Oluşan film, belirli bir sıcaklığa ısıtılmış su ya da tampon içerisinde hidrate edilerek, kendiliğinden düzenlenen misellerin oluşması ile sonuçlanmaktadır. Hidrate edilen örnekler son aşamada steril filtrelerden süzülerek boyutlarının düşürülmesi ve sterilizasyonları sağlanmaktadır [117].

Dondurarak kurutma yönteminde, blok kopolimer ve ilaç, su ile karışabilen dondurarak kurutmaya uygun bir organik çözücü içerisinde çözülür. Çözelti su ile karıştırıldıktan sonra dondurarak kurutulur ve sulu ortamda rekonstitüye edilerek ilaç yüklü miseller elde edilir.

Genellikle, misellerin hazırlanması için seçilen yöntemler misellerin fizikokimyasal özelliklerini ve ilaç enkapsülasyon etkinliklerini etkilemektedir. Ayrıca formülasyonların şekil, boyut ve polidispersite indeksleri, misel hazırlanmasında kullanılan yöntemle bağlı olarak organik fazın yapısı, organik çözücü içerisinde çözülen kopolimer konsantrasyonu, sıcaklık, agregasyon sayısı, iyonik güç ve pH gibi koşullara göre değişmektedir. Bu nedenle, ideal bir misel formülasyonun hazırlanabilmesi zahmetli ve zaman alıcı bir iştir. Etkili bir miseller taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için farklı yöntemler ve çeşitli parametrelerin denenmesi ve doğru bir şekilde optimizasyonlarının yapılması önem teşkil etmektedir [117].

1.10.7. Polimerik Misellerin Karakterizasyonları

1.10.7.1. Kritik Misel Konsantrasyonu

Kritik misel konsantrasyonu, polimerik misellerin oluşumu ve statik stabilitesi için en önemli parametredir. Aynı zamanda misellerin termodinamik stabilitesini ifade etmek için kullanılmaktadır. Kritik misel konsantrasyonu, amfifilik blok kopolimerlerin kendi kendine bir araya gelmeye başladığı ve misel oluşturabildiği belirli bir minimum kopolimer konsantrasyonunu ifade etmektedir. Misel oluşumunda başlıca etkili diğer faktörler,

amfifilik moleküldeki hidrofobik blok konsantrasyonu, sıcaklık ve çözücü olarak belirtilmiştir.

Kritik misel konsantrasyonu genel olarak hidrofobik bloğun uzunluğu ile ilişkilidir. Hidrofobik blok uzunluğu ve moleküler ağırlığın yüksek olması düşük KMK ve dolayısıyla da yüksek stabiliteyle sonuçlanmaktadır. Ayrıca misellerin morfolojisini belirleyen temel faktör, hidrofilik hacim fraksiyonu (f) ile tanımlanan blok kopolimerin hidrofilik hidrofobik dengesidir. Genellikle, amfifilik blok kopolimerlerin f değeri yaklaşık olarak %35 olduğunda polimerik veziküller oluşurken, %45'in üzerinde sferik miseller oluşmaktadır. Amfifilik kopolimerdeki hidrofobik blok uzunluğu değiştirilerek polimerik misellerin boyutu ve morfolojisi kolaylıkla kontrol edilebilmektedir. Hidrofilik blok uzunluğunun hidrofobik blok uzunluğuna göre çok yüksek oranda olması, blok kopolimerlerin miseller yapıya düzenlenmesini engelleyerek, çözelti içerisinde blok kopolimerlerin unimerler halinde kalmasına neden olmaktadır [115, 122]. Ayrıca hidrofilisitedeki yüksek artış, polimerin suda çözünürlüğünü artırmakta, amfifilik polimerlerin misel oluşturma eğilimini azaltmakta ve buna bağlı olarak KMK'yı arttırmaktadır. Yapıyı oluşturan çekirdek kısmında, uzun hidrofobik segmentlerin var olması ise çubuk ya da lameller gibi misel dışı yapıların oluşturulmasına neden olduğundan blok uzunluklarının uygun şekilde belirlenmesi doğru ve etkili bir miseller taşıyıcı sistem geliştirilmesi açısından önemlidir [115]. Hidrofilik ve hidrofobik dengenin bozulması sulu çözeltide stabilitenin bozulmasına neden olduğundan, misel formülasyonlarının intravenöz uygulama sonrası uzun-dönem stabilitesini sağlamak için liyofilize edilerek saklanması etkili bir yöntem olarak belirtilmektedir [124].

Kritik misel konsantrasyonu temel olarak yüzey tensiyometresi ve floresan prob teknikleri ile ölçülmektedir. Bunların yanı sıra iletkenlik, çözündürme deneyleri, osmometre, diferansiyel tarama kalorimetrisi, kromatografi, küçük açılı nötron saçılımı (SANS), küçük açı X-ışını saçılması ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi yöntemler ile tayin edilebilmektedir [123]. Kritik misel konsantrasyonu, yüzey geriliminin azaldığı ve platoya ulaştığı noktayı ifade etmektedir. KMK tayinde yukarıda belirtilen yöntemler arasında, floresan prob teknikleri çok sık kullanılmaktadır. Çeşitli floresan problemler arasında, piren, ortamın hidrofobitesine duyarlı yüksek hidrofobik bir aromatik hidrokarbondur. Misellerin oluşumuna bağlı olarak hidrofobik çekirdeği oluşturan polimer konsantrasyonundaki artış, yüksek hidrofobitesitedeki pirenin çekirdek içerisine girişine neden olur. Pirenin floresan yoğunluğundaki ani düşüş misellerin iç kısmına pirenin

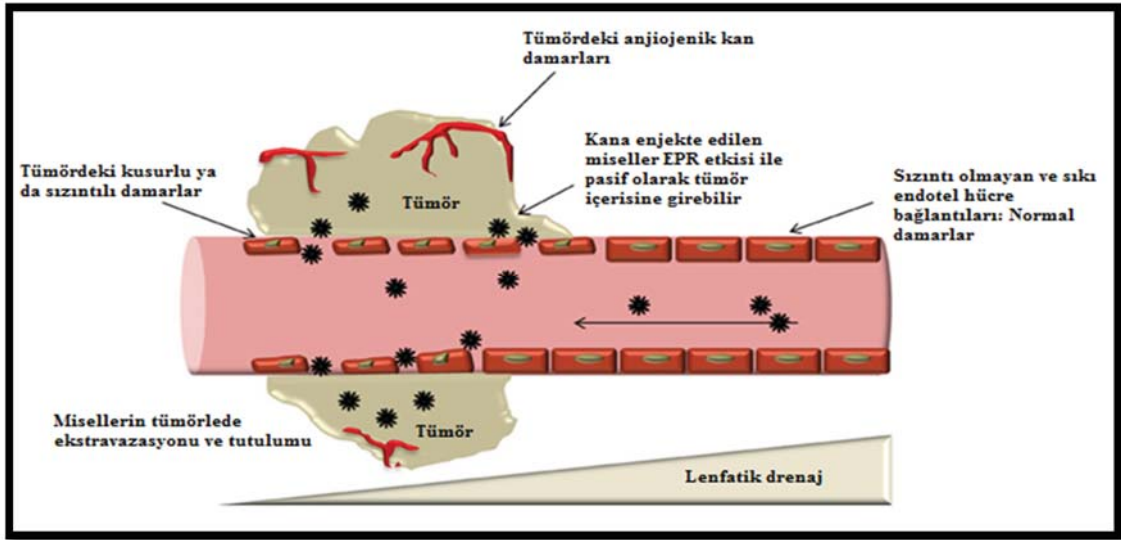
hapsolduğunu ve miselin oluştuğu kritik misel konsantrasyonunu belirtmektedir [121], [123].

1.10.7.2. Misellerin Boyut, Şekil ve Polidispersite İndekslerinin Tayin Edilmesi

Sulu çözeltilerdeki misel boyutu hidrodinamik çap olarak ifade edilmekte olup, misel boyutu ve polidispersite indeksinin karakterizasyonu dinamik ışık saçılımı/foton korelasyon spektroskopisi ile yapılmaktadır [125]. Polidispersite indeksi (PDI), polimerik misellerin homojen dağılım derecesini göstermektedir. Misellerin boyut ve şekilleri, sıklıkla Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM), Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) gibi yöntemlerle belirlenmektedir [121]. SEM ve TEM blok kopolimer misellerin boyut ve şekillerinin doğrudan görüntülenmesi için uzun zamandan beri kullanılmakta olup, son zamanlarda popüler hale gelen Cryo-TEM misel morfolojisi ve boyutların belirlenmesi için kullanılan yeni geliştirilmiş bir yöntemdir [126]. AFM ise misellerin boyut dağılımları hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca ilaç yüklü polimerik misellerin boyutları, asimetrik akış alan akış fraksiyonu, yapıları ise küçük açılı nötron saçılımı (SANS) ile tayin edilebilmektedir [127].

1.10.8. Polimerik Misellerin Pasif Hedeflendirilmesi

Kanser tedavisindeki en büyük engellerden biri, ilaç ya da gen taşıyıcı sistemin sağlıklı hücrelere seçici olmayan iletimidir. Normal dokulardaki kan damarları, dokudan makromoleküllerin ya da nanopartiküllerin geçişini sınırlayarak sadece küçük moleküllerin difüzyonuna izin vermektedir. Tümör dokusu ise tümörün artan besin ve oksijen ihtiyacını karşılamak için hızla büyür ve endotel hücrelerinin aralarında büyük fenestasyonlarla sonuçlanır. Bu oluşumlar ile birlikte nitrik oksit, bradikinin, matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) gibi çeşitli vasküler geçirgenlik faktörlerinin aşırı üretimi ve salgılanması gerçekleşerek, tümör dokusu kan damarlarının yüksek oranda geçirgen hale gelmesine neden olur. Büyüyen tümör hücreleri lenf damarlarını sıkıştırır ve böylece zayıf lenfatik drenaja neden olan çökmelere neden olur (Şekil 1.15) [127–129].



Şekil 1. 15. Artan permeabilite ve retensiyon etkisi (EPR) ve pasif hedefleme [80]

Tümör dokusundaki kan damarları yüksek geçirgenlikleri nedeniyle hem büyük hem de küçük moleküllerin geçişine izin vermektedir. Artan Permeabilite ve Retensiyon etkisi (EPR etkisi) olarak bilinen bu durum, artan vasküler geçirgenlik ve zayıf lenf drenajına bağlı olarak kan plazma bileşenleri ve miseller taşıyıcı sistemlerin endotel hücreleri arasındaki boşluklar vasıtasıyla tümör dokularına sızmalarını ve aynı zamanda orada tutulmalarını ifade etmektedir [130–132]. Pasif hedeflendirmenin temelini oluşturan EPR etkisi, polimerik misellerin tümör dokularına hedeflendirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu şekilde pasif hedeflendirmeye yönelik tasarlanmış polimerik misellerin başarısını ortaya koymak için pek çok prelinik ve klinik faz çalışmaları yapılmış ve literatür bilgileri ile bazı örnekleri Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1. 2. Pasif hedeflendirmeye yönelik tasarlanan polimerik misellere ait klinik denemeler [80]

Misel bileşenleri/formülasyon	İlaç(lar)
PEG2000-PE	Dosataksel
PEG2000-PE/Vitamin E	Paklitaksel, Kurkumin
PEG2000-PE/Hidrojenlenmiş fosfatidilkolin (PEG2000-PE/HSPC)	Paklitaksel, Elakridar
Adamantin uçlu PEG ve β -siklodekstrin'e dayalı 7 kollu poli (L-glutamik asit) (mPEG-Ad@ β -CD-7PLGA/CDDP)	Doksorubisin
Stearat graft edilmiş dekstran mPEG-b-poli(D,L-laktid) Pluronik P123/F127	^b CDDP(cis-diklorodiamin platinyum (II))
Genexol®-PM, mPEG-PDLLA (Ph-IV/Kore'de onaylı)	Doksorubisin
NK105, PEG-p(Asp) (Ph-III)	Dosataksel
SP1049C, Pluronik L61 ve F127 (Ph-III)	Paklitaksel
NK012, PEG-P(Glu)-SN38 (Ph-II)	Doksorubisin
NC-6004, PEG-P(Glu)-cisplatin (Ph-I/II)	SN-38
NK911, PEG-P(Asp)-DOX (Ph-II)	Cisplatin
NC-4016, PEG-P (Glu) DACHPt (Ph-I)	Doksorubisin
	DACHPt Dikloro-(1,2diaminosikloheksan) platinyum (II)

Polimerik misellerin pasif hedeflendirilmesinde EPR etkisinin yanı sıra, misellerin boyutları, yüzey özellikleri ve stabiliteleri gibi bazı parametrelerin de etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bunlardan en önemlisi polimerik misellerin tümör kan damarlarından

geçebilecek kadar küçük boyutta olmalarıdır. Tümör damarlanma aralıkları tümör çeşidine bağlı olarak 200–800 nm arasında değişiklik göstermektedir. Genellikle 200 nm’den büyük partiküller kan dolaşımında yabancı madde olarak algılandığından, RES tarafından doğrudan yıkıma uğramaktadır. Tümör damarlanma aralıklarının altında bir boyuta sahip polimerik miseller, RES tarafından alınmadan dolaşımda uzun süre kalabilmekte ve buna bağlı olarak EPR etkisi ile tümör dokusuna ulaşabilmektedirler [132, 133].

Ayrıca misellerin termodinamik stabilitesinde etkili olan kritik misel konsantrasyonu da pasif hedeflendirmede önemli rol oynamaktadır. Hidrofobik blok oranının arttırılmasına bağlı olarak elde edilen düşük KMK değeri ile kanda dolaşım süresi uzatılmış miseller, pasif hedeflendirme ve EPR ile etkili bir şekilde tümör dokularındaki zarar görmüş ya da sızıntılı bölgelerden geçerek hedef bölgelerde birikim gösterebilmektedir [130, 131].

İkincisi, polimerik miselin yüzey özelliklerinin dolaşımdaki ömrünü arttırmaya yönelik olarak modifiye edilebilir olmasıdır. Genellikle polimerik misel kabuğunun PEG gibi esnek, sterik bir bariyer görevi gören hidrofilik polimerler ile oluşturulması ya da kaplanması misellerin yüzey yükünü gizlemeye, kan bileşenleri ile etkileşimini engellemeye ve kandaki dolaşım süresini uzatarak mononükleer fagositik sistem elemanları olan karaciğer ve dalaktaki makrofajlar tarafından opsonizasyonlarını engellemeye yardımcı olmaktadır. Böylece polimerik misellerin EPR etkisi ile tümör dokularında birikimine izin verilmektedir [79].

Pasif hedeflendirme bu gibi avantajlarının yanı sıra, bazı dezavantajlar da içermektedir. Tümör geçirgenliklerinin çeşitli tümör hücrelerine göre değişmesi ve tümör damarlanma aralıklarının aynı tümörde dahi farklılıklar oluşturması, EPR etkisinin oluşmasına engel olabilir, bu durum ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğini kısıtlamaktadır [79, 120]. Spesifik ligandların misel yüzeylerine bağlanması ya da uyarı duyarlı hedeflendirme gibi aktif hedeflendirme stratejileri ile pasif hedeflendirmenin dezavantajları ortadan kaldırılabilir. Ayrıca biyouyumlu bir yüzey kaplaması olmasına rağmen PEG’in sahip olduğu bazı dezavantajlar ilaç ve gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde PEG kullanımını kısıtlamaktadır [81]. Bu nedenlerden dolayı son zamanlarda alternatif görünmezlik özelliğe sahip bir polimerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Bu bağlamda yakın zamanda PEG’e potansiyel alternatif olarak, iyonik olmayan, hidrofilik, düşük toksisite ile biyoparçalanır özellikteki Poli(2-oksazolin)ler keşfedilmiştir.

Bu düşünceden yola çıkarak, tez çalışmamızda polimerik misellerin hazırlanmasında kullanılan Poli 2-oksazolin polimerlerinden bir sonraki bölümde detaylıca bahsedilmiştir.

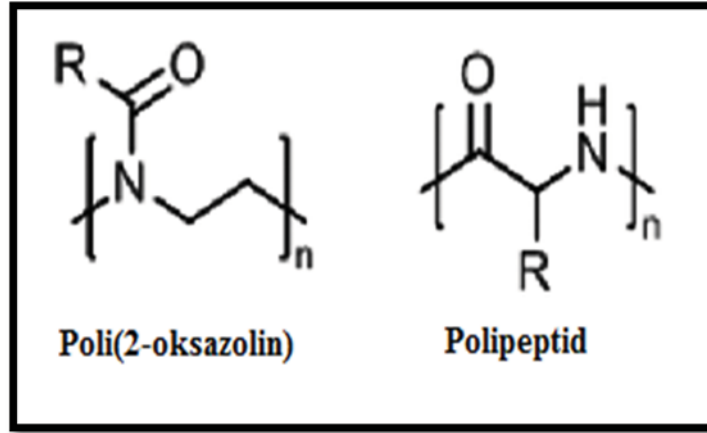
1.11. Poli (2-oksazolinler)(POx)

Poli(2-oksazolinler)(POx) sentetik polimerlerin önemli bir çeşidi olup, son zamanlarda çok yönlü özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. 1990'lı yılların başında ticarileştirilen bu polimerler, her ne kadar gelecek vaat eden sistemler olsa da gelişimleri 20 yıl boyunca askıda kalmıştır [134–136].

Daha önce bahsedildiği üzere, misellerin hidrofilik kabuk kısmının iyonik olmayan bir polimer ile hazırlanması, kan dolaşımındaki stabilitesini arttırmak amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir. Bu amaç için kullanılan altın standart olarak bilinen PEG, iyonik olmayan bir polimer olup, hidrofilik doğası ve görünmezlik özellikleri ile immün sistemden kolaylıkla kurtulabilmektedir. Fakat üretimindeki istenmeyen safsızlıklar ile zorlu polimerizasyon süreci, yüksek vizkozitesi, molar kütlelerinin yüksek oluşu ve biyoparçalanır özellikte olmayışı ile vücutta birikebilmesi, tekrarlı uygulamalarda anti-PEG IgM'ye dayalı immün cevap oluşturması (PEG ile hiçbir şekilde tedavi görmemiş hastaların %25'inde antiPEG antikorları gözlenmiştir), PEG'in polieter omurgasının oksidatif degradasyona yatkın olması sonucu peroksidaz oluşumu gibi çeşitli ciddi dezavantajları bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca sadece -20 °C'nin altındaki sıcaklarda stabil olması önemli bir sorun teşkil etmektedir. Bu dezavantajları nedeniyle son zamanlarda PEG moleküllerine alternatif polimerler olarak poli (2-oksazolin)(POx)ler keşfedilmiştir [137–145].

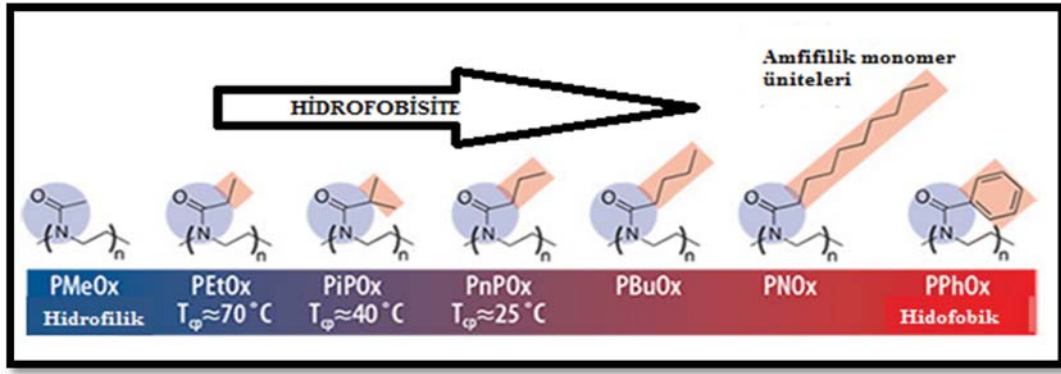
POx çok yönlü iyi ayarlanabilir özellikleri, dar bir moleküler ağırlık dağılımı ($PDI = 1,05-1,30$) sergilemesi, yüksek biyouyumluluğu, iyonik olmayan yapısı ile görünmezlik etki oluşturması ve yüksek fonksiyonelleştirilebilmesi ile ilaç geliştirilmesi, taşınması ve doku mühendisliği gibi biyomedikal uygulamalarda kullanımı açısından ilgi çekici polimerler haline gelmiştir [146–148]. Oda sıcaklığında, 4°C ve -20°C gibi çeşitli sıcaklıklarda stabil kalabilmesi de önemli avantajlarından. POx, peptidlere olan yapısal benzerliği nedeniyle yalancı-peptidler olarak adlandırılmaktadır [150] (Şekil 1.16). 2-etil oksazolin monomerlerinin yaşayan katyonik halka açılım polimerizasyonu ile sentezlenen POx'un hidroksil (-OH), karboksilik asit (-COOH) ve amin(-NH) gibi pek çok fonksiyonel uç grup ile sonlandırılması işlevsel formlara dönüştürülmesini sağlamaktadır. Böylelikle aktif hedeflendirme için hedefleyici ajanların ve görüntüleme için radyoaktif işaretleyicilerin yapıya eklenmesine izin vermektedir. Ayrıca bu işlevsel özellikleri ile nanotaşıyıcı sistemlerin yüzey modifikasyonlarında kullanımını da sağlamaktadır. Yan zincir

ayarlanabilir özelliği ile polimer zincirine pek çok fonksiyonel grupların eklenmesi yüksek ilaç ve gen taşıyıcı ajanların hazırlanmasına olanak vermektedir [146, 150].



Şekil 1. 16. Yalancı polipeptit yapısı ile Poli(2-oksazolin) ve polipeptit zincir yapısı [152]

Poli (2-oksazolin)ler, hidrofilik/hidrofobik özelliklerine göre 2-metil-2-oksazolin (MeOx), 2-etil-2-oksazolin (EtOx), 2-izopropenil-2-oksazolin (iPrOx), 2-fenil-2-oksazolin (PheOx) olmak üzere heterosiklik oksazolin monomerlerinin katyonik halka açılım polimerizasyonu ile sentezlenmekle birlikte, nitril, karboksilik asit ya da aldehit türevleri kullanılarak da sentezlenmektedir. POx çeşitleri arasında özellikle Poli(2-metil-2-oksazolin)(PMetOx) ve Poli(2-etil-oksazolin)(PEtOx) polimerleri, iyonik olmayan, suda çözünür ve yüksek hidrofilik yapıdaki polimerlerdir. POx polimerlerinin bu hidrofilik özelliği, alifatik yan zincir uzunluğunun kademeli artışı ile yüksek hidrofilikten Poli(2-metil-2-oksazolin), yüksek hidrofobisite Poli(2-nonil-2-oksazolin)'ye ayarlanabilmektedir (Şekil 1.17). Karbon sayısı 4'ten az sayıdaki zincirler, suda çözünür iken yapıya daha uzun alifatik ya da aromatik yan zincirlerin eklenmesi, polimerin hidrofobisitesinde artışa neden olarak, geçiş sıcaklığı giderek azalan ve ısıya duyarlı davranış sergileyen hidrofobik bir polimer elde edilmesini sağlar. Böylelikle sıcaklığa duyarlı ve geçiş sıcaklığı düşük bir polimer, hidrofilik ve hidrofobik 2-oksazolinlerin blok kopolimerizasyonu ile elde edilebilir. Bu sayede, polimerin hidrofilik/hidrofobik denge kontrolü ve daha düşük kritik çözelti sıcaklığına ulaşılması kontrol edilebilmektedir. Bu özelliği ile POx, sıcaklık uyarana karşı duyarlı akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, tespit ve teşhis amaçlı uygulamalarda kullanımı için ideal bir polimerdir [135, 152].



Şekil 1. 17. Yan grup eklenmesine bağlı poli (2-oksazolin)lerin farklı suda çözünürlükleri [153]

Yüksek hidrofilik ve non-iyonik yapısı ile PEtOx ve PMetOx polimerleri nanotaşıyıcı sistemlerin yüzeyine bağlandığında tıpkı PEG’de olduğu gibi görünmezlik etkisi sergilemektedir. Böylece kanda serum proteinleri ile düşük etkileşim sonucu çok hızlı böbrek klerensi ve intravenöz uygulama sonrası retiküloendotelial sistem organları tarafından çok düşük alıma uğramaktadırlar. Bu polimerlerin çok düşük *in vitro* sitotoksiste, yüksek hücresel alım, serum proteinleri ile düşük etkileşim ve görünmezlik özellikleri yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Hatta oksidasyona uğramama, radikal ve peroksit ürünler oluşturmama özellikleri ile PEG’e göre çok daha avantajlıdır. Böylelikle sensör ve implantlarda kaplama malzemesi olarak uzun dönem kullanım için PEG’e alternatif olarak kullanılmaları önerilmektedir [146, 153].

1.12. POx’un Biyouyumluluğu

Peptide benzer yapısı, immün cevap oluşturmama ve görünmezlik etkisi ile POx tabanlı polimerler *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda hücresel uygunluk sergilemektedir [154, 155]. POx biyouyumluluğunun belki de en güvenilir örneği, hâlihazırda insan-için Faz I klinik denemesine olan ilk ticari POx tabanlı farmasötik ürünün geliştirilmesidir [157].

POx tabanlı polimerlerin insan nöral ata hücreleri, Madin-Darby Canine böbrek hücreleri, MCF-7, HEPG2 ve CATH-a-hücreleri gibi farklı hücrelerdeki *in vitro* sitotoksiste sonuçları, bu polimerlerin düşük toksiste ile yüksek biyouyumluluk sergilediğini ortaya koymuştur [158].

Van Kuringen ve arkadaşları, PEtOx’un kısmi hidrolizi ile hazırlanan farklı hidroliz derecelerindeki polimerlerin sitotoksiste, termal ve çözünürlük özelliklerini değerlendirmişlerdir. Hidroliz derecesindeki artış, düşük sıcaklıklarda polimerin çözünürlüğünü etkilediğinden, biyomedikal uygulamalardaki kullanımı problem oluşturmuş olmakla birlikte, %25 hidroliz yüzdesinden daha düşük polimerler doku hasarı

ya da mukozal iritasyona yol açmamıştır. İnsan dermal fibroblast hücrelerinde 24 saat içerisinde %10 hidroliz derecesindeki PEtOx (5 mg/mL) toksik etki göstermemiştir. Elde edilen sonuçlar hidroliz derecesinin toksisite ile ilişkisini ortaya koymaktadır [159].

Lee ve arkadaşları, Poli(2-etil-2-oksazolin)-poli(ε-kaprolakton) (PEtOx-PCL) amfifilik blok kopolimerleri ile antikanser bir ilaç olan paklitakselin insan epidermoid karsinom hücrelerine taşınması amacıyla polimerik miseller hazırlamışlardır. Miseller, 18-23 nm arasında oldukça dar bir boyut dağılımına sahip olup, hemoliz testi sonuçları lipit membranında 1 g/L’de toksik etki oluşturmadığını ve amfifilik misellerin biyoyumluğunu ortaya koymuştur. Ayrıca paklitaksel yüklü misellerin KB insan epidermoid karsinoma hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir [160].

Wang ve arkadaşları tarafından Poli(L-laktit)-*b*-PEtOx-Poli(L-laktit), (PLA-PEtOx-PLA) blok kopolimeri ile hazırlanan hidrojel sisteminin yüksek biyoyumluluk sergilediği ortaya konulmuştur. Elde edilen sitotoksikite sonuçları hidrojellerin 50g/L’de sitotoksikite göstermediğini ve insan derisi fibroblastlarında hücre canlılığında sadece % 15 oranında azalma sergilediğini ortaya koymuştur. Yeni sentezlenen bu hidrojellerin çeşitli doku mühendisliği uygulamaları ve taşıyıcı ajanlar için matriks olarak görev yapabilecek sistemler olabileceği belirtilmiştir [161].

Yine, Wang ve arkadaşları başka bir çalışmada PEtOx-*b*-PCL-*b*-PEtOx blok kopolimerleri ile Bevacizumab yüklü hidrojeller hazırlamışlardır. Bu hidrojellerin insan retinal pigment epitel hücre hattında 10g/L konsantrasyonda sitotoksikite sergilemediği ortaya konulmuştur. Hazırlanan hidrojellerin göz içi biyoyumluluğunun yüksek oluşu, bu blok kopolimerin biyomedikal uygulamalarda kullanım için büyük bir potansiyel olabileceğini ortaya koymuştur [162].

Viegas ve arkadaşları, metil (PMetOx) etil (PEtOx) ve propil (PPOx) zincirleri ile üç farklı polioksazolin polimeri sentezlemiştir. Sentezlenen bu polimerlerin sıçanlardaki akut ve kronik dozları belirlenerek güvenirliliği tespit edilmiştir. Sonuçlar, 1–40 kDa molekül ağırlığındaki Poli (2-oksazolin) (POx) türevlerinin 1,10 altında polidispersite indeksine sahip olduğunu ortaya koymuştur. POx polimerleri (10 ve 20 kDa), sıçanlara intravenöz uygulandığında herhangi bir yan etkiye neden olmamış ve maksimum tolere edilen dozun (MTD) 2g/kg’dan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kan sayımı, serum kimyası, organ ağırlıkları ve organların histopatolojisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık göstermemiştir [163].

Luxenhofer ve Kabanov, farklı hidrofilik/hidrofobik blok yapıdaki POx polimer amfifillerinin hücrel alım ve sitotoksitesini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonuçları bu polimerlerin yüksek konsantrasyonlarda dahi düşük toksisite sergilediğini ve hücrel alımın polimer yapısındaki molar kütle ve zincir değişikliklerine bağlı olduğunu ortaya koymuştur [164].

Bauer ve arkadaşları, aynı moleküler ağırlıktaki (0,4-40 kDa) PEG ve PEOx'u, PEG'in klinik denemelerdeki ilaç taşıma ile ilgili sınırlamalarını test etmek için sitotoksite ve hemouyumluluk testleri açısından karşılaştırmışlardır. Kısa süreli uygulamada her iki polimer yüksek konsantrasyonlarda dahi kırmızı kan hücreleri ve fare fibroblast hücrelerinde düşük toksisite sergilemekle birlikte, uzun dönem inkübasyon süresinde (12 ve 24 saat) yüksek konsantrasyonlarda orta ölçekte sitotoksik bulunmuştur. PEOx, sentez kolaylığı, düşük vizkozite ve yüksek stabilite gibi fizikokimyasal özellikleri ve sitotoksitesi açısından PEG ile kıyaslandığında çok daha avantajlıdır [146].

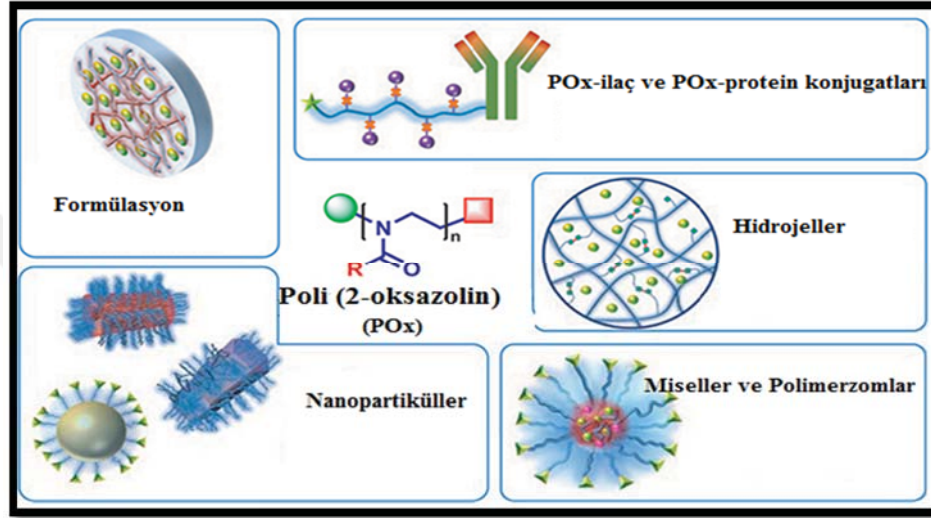
Pidhadika ve arkadaşları tarafından sentezlenen PLL-PMetOx filmlerinin PLL-PEG filmleri ile yüzey kaplama materyalleri olarak kullanımlarına dair karşılaştırılmaları yapılarak filmlerin fizyolojik ve oksidatif ortamdaki stabiliteleri değerlendirilmiştir. Üç farklı yüzey analiz tekniği ile elde edilen sonuçlar PLL-PMetOx filmlerinin, PLL-PEG filmlerine göre yüksek stabiliteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu çalışma, PMetOx ile hazırlanan kaplamaların, fizyolojik ve oksidatif ortamlarda daha yüksek stabilite ve protein kirliliğine karşı daha uzun süre direnç göstermesi nedeniyle PEG kaplamalarına göre güçlü bir alternatif olduğunu göstermiştir [165].

Gaertner ve arkadaşları, radyoaktif işaretli suda çözünür PEOx ve PEOx polimerlerinin farede biyodağılım ve atılımını çalışmışlardır. Araştırmacılar, yüksek hidrofilik özellikteki poli-2-oksazolinlerin dokularda birikmediğini, böbrekte glomerular filtrasyon ile çok hızlı bir kan klerensine uğradığını ve dikkate değer oranda retiküloendotelial sistem organlarında düşük alım gösterdiğini ortaya koymuştur [166].

Yukarıda tartışıldığı üzere, POx polimerleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen tüm sonuçlar bu polimerin *in vitro* ve *in vivo* uygulamalardaki başarılı biyoyumluluğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, POx polimerlerinin ilaç ve gen taşıma uygulamalarında kullanımına yönelik POx tabanlı yeni taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile sistemin başarısının arttırılacağı düşünülmektedir.

1.13. POx Tabanlı Taşıyıcı Sistemler

Yüksek biyouyumluluk ve işlevselleştirilme özellikleri ile POx tabanlı polimerler ilaç ve gen taşıyıcı sistemler olarak terapötik özellikte çeşitli biyomateryallerin geliştirilmesi için ideal kaynaklardır. Özellikle, ilaç ve gen taşınması için POx tabanlı polimerlerin kovalent olmayan etkileşimi ile hazırlanan polimerik miseller, hidrojeller ve kovalent etkileşim ile hazırlanan POx-ilâç, POX-protein konjugasyonları ve POx tabanlı polipleksler sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 1.18).



Şekil 1. 18. POx tabanlı ilâç/gen taşıyıcı sistemler [151]

Buna rağmen, POx'un, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından insanlarda klinik kullanımı için bir ilâç onaylanmamıştır. Sadece PEtOx'un besin takviyesi olarak dolaylı yoldan kullanımı ABD İlaç ve Gıda Dairesi tarafından onaylanmıştır [153]. Klinikte kullanım için POx'un onay alması, POx'a dayalı biyomateryallerin hızlı bir şekilde gelişmesine ve pazar payının artmasına neden olacaktır.

1.13.1. POx Tabanlı Miseller Sistemler

PEtOx yüksek hidrofilik yapısı gereği, hidrofobik biyouyumlu bir polimer ile amfilik miseller yapıya düzenlenebilmekte ve ilâç ve gen taşıma çalışmalarında ideal bir nanotaşıyıcı sistem olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra hidrofilik PEtOx polimer omurgasına eklenen yan hidrofobik gruplar ile de polimerin amfilik yapı oluşturması sağlanabilmektedir. Bu da amfilik POx polimerin sulu çözeltiler içerisinde kendiliğinden düzenlenerek miseller yapıyı oluşturabileceğini ortaya koymaktadır. Bu hidrofilik/hidrofobik dengenin ayarlanabilir olması miseller boyut ve ilâç taşıma özelliklerinin etkili bir şekilde kontrol edilebilmesine yardımcı olmaktadır.

POx tabanlı miseller genellikle POx-Poliester şeklinde hidrofilik ve hidrofobik 2-oksazolin monomerlerin ardışık olarak yapıya eklenmesiyle, A-B diblok ve A-B-A triblok yapısında oluşturulmaktadır. Bu yapının oluşturulmasında hidrofobik blok olarak poliestерlerden PLA ve PCL polimerleri sıklıkla kullanılmaktadır [149, 150].

Zhao ve arkadaşları, hidrofobik poli-ε-kaprolakton ile hidrofilik PEOx kompleksleştirilmesi ile folat dekore miseller hazırlamışlardır. Folat dekore misellere doksorubisin yüklenmiş ve misellerin parçacık boyutu, folat dekorasyon derecesi, ilaç yükleme etkinliği, enkapsülasyon verimliliği, morfolojisi ve yüzey yükü karakterize edilmiştir. Hedefleme yeteneği ve hücre canlılığı HeLa, KB, A549 ve MCF-7/ADR hücre hatlarında değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doksorubisinin ağırlıkça %10'dan daha fazla kapasite ile miseller sistemlere yüklendiğini ve %58 ile %60 arasında tümör hücrelerinin canlılığını azalttığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar *in vivo* antitümör testleri ile de desteklenmiştir. Hazırlanan folat dekore PEOx-PCL misellerin tümöre hedeflenmiş ilaç tedavisinde umut verici taşıyıcı sistemler olduğunu ortaya konulmuştur [167].

Benzer bir folat hedeflendirilmiş poli(2-etil-2-oksazolin)-*b*-poli(ε-kaprolakton) polimerik miseller ile tümör görüntüleme ve fototermal tedaviye yönelik bir çalışma amaçlanmıştır. Misellere suda çok düşük çözünürlüğe sahip indosiyenin yeşil boyası yüklenerek *in vivo* KB tümörlerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu miseller sistem ile tümör görüntüleme ve tedavisinin başarılı bir şekilde yapıldığını ve taşıyıcı sistemin yüksek etkinlikte aktarımını ortaya koymuştur [168].

Li ve arkadaşları, PEOx-*b*-Poli(D-L-laktit) blok kopolimerleri ile hazırladıkları miseller sistemin dış kabuğunu çift ligand ile fonksiyonelleştirerek tümör hücrelerine hücre alımı arttırmayı hedeflemişlerdir. Miseller yaklaşık 30 nm gibi çok küçük boyutlarda elde edilmiş olup, çift ligand modifiye edilmiş miseller ile endolizozomal pH'ta hızlı hücre içi ilaç salımı ve artmış hücre alım ile paklitakselin prostat hücrelerinde yüksek sitotoksikite sergilediğini ortaya koymuşlardır. Böylece tasarlanan miseller sistemin yüksek fonksiyonelleştirme ile farklı özellikteki hedefleyici ajanların birlikte taşınmasına imkân veren umut verici bir yaklaşım olduğu ortaya konulmuştur [169].

Kabanov ve Luxenhover tarafından hidrofobik blok olarak, poli(2-n-butil-2-oksazolin)(PBOx) ve hidrofilik blok olarak PMEOx kullanıldığı ya da PBOx'un orta blok olarak ve PMEOx'un iki dış blok olarak kullanıldığı, A-B diblok ve A-B-A triblok yapıda miseller sistemler hazırlanmıştır. Bu miseller sistem ile paklitaksel ve suda

çözünürlüğü olmayan farklı antikanser ilaçlarının çözünürlüğünün artırılması hedeflenmiştir. %45 ilaç yükleme kapasitesi ile ilacın suda çözünürlüğünün artırıldığı başarılı bir şekilde ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar, paklitaksel yüklü PBuOx-PMeOx misellerin, ticari misel formülasyonları ile kıyaslandığında üstün tümör inhibisyonu sergilediğini göstermiştir. Aynı zamanda bu miseller sistemin tek bir ilaç yüklü miseller ile kıyaslandığında stabiliteyi arttırdığı ve her bir ilaç için %50 oranında ilaç yükleme kapasitesi sergilediği ortaya konulmuştur [164].

Aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında, P(MeOx-*b*-BuOx-*b*-MeOx) miseller ile taksoid türevi ilaçların suda çözünürlüklerini arttırmayı amaçlamışlardır. Bu blok kopolimer sistemi ile 100 nm'nin altında oldukça stabil miseller elde edilmiş olup, %50 oranında yüksek ilaç yükleme kapasitesi tayin edilmiştir. Elde edilen bu veriler antikanser ilaçların düşük suda çözünürlüğünün blok kopolimerik miseller sistemler ile yüksek oranda artırıldığını ortaya koymuştur [170]. Şu anda Kabanov ve ekibi, hangi POx tabanlı misel taşıyıcılardan en iyi şekilde yararlanılabileceğini belirlemek üzere cheminformatic veri tabanı oluşturma çalışmaları üzerine yoğunlaşmışlardır.

Hsiue ve arkadaşları, PEtOx-poli(aspartik asit) poliyon kompleks misellere yükledikleri hidrofobik antifungal bir ilaç olan Amfoterisin B'nin çözünürlüğünü ve mantar hücrelerine karşı etkinliğini arttırmayı hedeflemişlerdir. Araştırmacılar, amfoterisin B'yi %47 oranında misellere yüklemeyi başarmışlardır. Ayrıca insan fibroblast hücreleri üzerine gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksikite çalışma sonuçları bu formülasyonun klinikte kullanılan ticari Fungizone® ile kıyaslandığında çok daha düşük toksisite gösterdiğini ortaya koymuştur [171].

Yukarıda verilen çeşitli literatür bilgileri, POx'un taşıdığı amfifilik özelliği ile polimerik misellerin hazırlanmasında etkili yapılar olduğunu ortaya koymuştur. Amfifilik yapısının yanı sıra hidrofilik ve hidrofobik bloklar şeklinde ayrı ayrı yapıya katılarak misellerin oluşturulmasına da yüksek katkı sağlamaktadır. Hedeflenebilir özellikleri, suda çözünürlüğü düşük ya da hiç olmayan antikanser ilaçlarının çözünürlüğünün artırılması ve yüksek etkinlik ile hücrelere aktarımı bu polimer ile hazırlanan miseller sistemleri potansiyel ajanlar haline getirmektedir.

1.13.2. Gen Taşınmasında POx Tabanlı Polimerik Miseller

Polimerik miseller gelişmiş ve ayarlanabilir özellikleri ile nükleik asitlerin taşınması için ümit verici ajanlardır. Polimerik misellerin nükleik asitler ile kompleksleşmesi poliyon kompleks miseller şeklinde, elektrostatik olarak negatif yüklü DNA ile bir hidrofilik blok

ve katyonik yüklü blok arasında meydana gelmektedir. Katyonik polimerler arasında yer alan PEI, gen taşıma çalışmalarında sıklıkla kullanılan viral olmayan bir vektördür. N-(2-tetrahidropirani)l aziridinin katyonik halka açılım polimerizasyonu ve/veya poli(2-etil-2-oksazolin)(PEtOx) ya da poli (2-metil-2-oksazolin)(PMetOx) gibi poli (2-alkil-2-oksazolin)(PAOx) lerin tam ve kısmi asidik ya da bazik hidrolizi ile sentezlenmektedir. Özellikle PEtOx'un tam ve kısmi hidrolizi ile sentezlenen lineer PEI'nin polimerik misellerin yapısına katılması, tek başına lineer PEI ile kıyaslandığında düşük sitotoksisite ve yüksek transfeksiyon etkinliği ile oldukça etkili bulunmuştur. Bu nedenle, polimerik POx tabanlı misellerin tasarlanması ve gen taşıma uygulamalarına yönelik sistemler olarak kullanılması gen aktarımının başarısını avantajlı hale getirmektedir.

Klibanov ve Thomas, Poli(2-etil-2-oksazolin)'in asit katalizli hidrolizi ile 22kDa, 87 kDa ve 217 kDa ağırlığında farklı lineer PEI türevleri sentezlemiş ve fare akciğerine gen aktarımı için kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar 87 kDa ağırlığındaki PEI ve 217 kDa ağırlığındaki PEI'nin en yüksek *in vitro* transfeksiyon etkinliğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Geleneksel PEI ile kıyaslandığında 87 kDa ağırlığındaki PEI'nin *in vitro* transfeksiyon etkinliği 115 kat, *in vivo* transfeksiyon etkinliği ise 200 kat yüksek bulunmuştur. siRNA ile oluşturulan komplekslerde ise akciğerlerde %93 oranında gen baskılanması elde edilmiştir [172].

Jeong ve Park, PEtOx'un kısmi hidrolizi ile hazırlanan PEtOx-co-PEI polimerini viral olmayan DNA transfeksiyon ajanı olarak kullanmışlardır. % 50 ile % 90 arasında değişen farklı hidroliz derecelerinde sentezlenen blok kopolimerlerden % 88 hidroliz derecesine sahip lineer PEI içeren polimerin, DNA ile kondensasyonunun ve *in vitro* transfeksiyon etkinliğinin geleneksel dallanmış PEI'de olduğu gibi oldukça yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Hidroliz derecesindeki artış, hücresel toksisite ve transfeksiyon etkinliğinde artışa neden olmuştur [50].

Fernandes ve arkadaşları, Lineer PEI'nin hücresel toksisitesini azaltmak için, PEtOx'un kısmi hidrolizi ile üç farklı hidroliz derecesinde (%30, %70 ve %96) PEI içeren blok kopolimerler hazırlamışlardır. Çalışmada farklı hidroliz derecelerinde lineer PEI içeren blok kopolimerlerin toksisite ve transfeksiyon etkinlikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, %30 hidrolize blok kopolimerin düşük transfeksiyon etkinliği ve %96 hidrolize blok kopolimerin yüksek toksisitesi nedeniyle transfeksiyon çalışmaları için etkin olmadığını ortaya koymuştur. Araştırmacılar, %70 hidrolize PEI'nin düşük hücre

toksitesitesi ve yüksek transfeksiyon etkinliği nedeniyle ideal bir taşıyıcı sistem olduğunu ifade etmiştir [15].

Hsiue ve arkadaşları, PEtOx-lineer PEI blok kopolimerlerini tiyol-disülfid bağlama reaksiyonu ile sentezlemişlerdir. Lineer PEI, PEtOx'un kısmi hidrolizi ile hazırlanmış ve PEtOx ile bağlanmıştır. Blok kopolimerdeki lineer PEI'nin hidroliz derecesindeki artış DNA ile kondensasyonu arttırmış ve 300–500 nm boyutlarındaki dallanmış ve lineer PEI ile kıyaslandığında 190 nm gibi düşük boyutta stabil polipleksler elde edilmiştir. HeLa hücrelerinde yapılan *in vitro* hücre canlılık ve gen ekspresyon analiz sonuçlarının, blok kopolimerdeki PEI hidroliz miktarının artışı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Nihai blok kopolimerlerin dallanmış ve düz PEI'ye göre düşük toksite ve yüksek transfeksiyon etkinliği sergilediği bulunmuştur [173].

Zhong ve arkadaşları, PMetOx'un asit hidrolizi ile sentezlenen PEI ile düşük moleküler ağırlıklı PEI-PEG-PEI triblok kopolimerleri hazırlamışlardır. Blok kopolimerlerin *in vitro* COS-7 ve sığır endotel hücrelerini yüksek oranda transfekte ettiği ortaya konulmuştur. Blok kopolimerin plazmit DNA'yı 100 nm'den daha düşük boyut ile kondanse edebilme yeteneği ve geleneksel lineer PEI ile kıyaslandığında 3 kat daha yüksek oranla transfeksiyon aktivitesi sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, tasarlanan sistemin başarısını, serumun transfeksiyon üzerinde herhangi bir inhibe edici etkisinin bulunmadığını göstererek ortaya koymuştur. Taşıyıcı sistemin güvenlik profili değerlendirildiğinde, triblok kopolimerin yüksek gen ekspresyon koşullarında dahi sitotoksitesinin oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar, PMetOx'un asit hidrolizi ile sentezlenen PEI-PEG-PEI triblok kopolimerin yeni bir gen taşıyıcı ajan olarak ilgi çekici olduğunu ortaya koymuştur [174].

Guis ve arkadaşları, poli(etilen glikol-b-(etiloksazolin-ko-metiloksazolin)) (poly(EG-b-(EtOx-co-MeOx))) sentezini takiben gen taşıyıcı ajan olarak PEG-bağlı PEG-b-PEI polimeri elde etmek için EtOx-co-MeOx komonomerlerinin alkali hidrolizini gerçekleştirmişlerdir. PEG-b-PEI blok kopolimeri ile yapılan gen aktarım deney sonuçları, yeni bir ürün olan bu blok kopolimerin önemli ölçüde DNA transfeksiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir [175].

Bauhuber ve arkadaşları benzer bir yaklaşımda, PMeOx'un hidrolizi ile redoks parçalanabilir, PEI-SS-PEG blok kopolimeri sentezlenmiştir. 1,5–10 kDa aralığında sentezledikleri PEI hidroliz ürünü arasından, 3 kDa ya da daha uzun PEI'nin DNA'yı iyi

derecede kondanse ettiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu sistemin yapısında bulunan PEG'in, düşük toksisite ve yüksek transfeksiyon etkinliği ile polipekslerin başarısını ortaya koyduğunu ifade etmişlerdir [176]. Gen taşıma çerçevesinde her ne kadar POx'un hidrolizi ile elde edilebilen tanımlanmış lineer poli(etilenimin) (PEI) oldukça uygun bir kaynak olsa da, POx'un kendisi de gen taşıma çalışmalarında sıklıkla kullanılan başarılı taşıyıcı sistemler ortaya koymaktadır.

Brissault ve arkadaşları hidrofilik blok oluşturucu PEG yerine Poli (2-metil-2-oksazolin) kullanarak sentezledikleri amfifilik Poli[(Propilen-blok-Poli(2-metil-2-oksazolin))(PMeOx-PPG-PMeOx) triblok kopolimeri iskelet kasına gen aktarımında kullanmayı hedeflemişlerdir. Amfifilik blok kopolimerler kullanılarak 5 µg Lusiferaz DNA'nın transfeksiyon etkinliğinin çıplak DNA ile kıyaslandığında Balb/c farelerde 18 kat arttığı gösterilmiştir [177].

Luhmann ve arkadaşları Poli(L-lizin) omurgası üzerine graft edilmiş PMeOx zincirleri ile (PLL-g-PMeOx) fırça yapısını çalışmışlardır. Elde edilen sonuçlar PLL-g-PEG fırçaları ile benzerlik göstermekte olup, COS-7 hücrelerinde %10 transfeksiyon etkinliği sergilemiştir. Ayrıca araştırmacılar, PLL-g-PMeOx-DNA komplekslerinin serum ve DNaz aktivitesine karşı son derece yüksek bir stabilite sergilediğini ortaya koymuştur [178].

Gaspar ve arkadaşları hidrofilik PEG yerine PEtOx kullanarak, PEtOx-PLA-g-PEI blok kopolimerleri ile hazırlanan miselleri minicircle DNA (mcDNA) taşınması için kullanmışlardır. Amfifilik misellerin düşük kritik misel konsantrasyonuna, yüksek serum ve kan stabilitesine sahip olduğu ortaya konulmuştur. Miseller sistem, MCF-7 meme kanseri hücreleri tarafından yüksek alım ve kontrol partiküllerine göre 2,7 kat yüksek gen ekspresyonu sergilemiştir. Aynı zamanda bu miseller sistemlerin doksorubisin ve mcDNA'yı birlikte taşıma etkinlikleri değerlendirilmiş olup, kombine sistemin yüksek etkinlik, hücresel alım ve antitümör aktivitesine sahip olduğu tayin edilmiştir. Elde edilen tüm bulgular, PEG işlevselleştirmesi olmaksızın, ilaç/mcDNA kombinasyonunun miseller ile birlikte taşınması için potansiyel bir ajan olduğunu ortaya koymuştur [179].

Gaspar ve arkadaşlarının kanser tedavisine yönelik geliştirdikleri diğer bir kombine tedavi yaklaşımında, uyarı duyarlı PEtOx-PLA-g-PEI-SS polimeri ile amfifilik miseller hazırlanmıştır. PEI-SS yapısı mcDNA ile kompleksleşmeyi arttırmanın yanı sıra hücre içerisinde uyarı-duyarlı bir salım meydana getirmiştir. Araştırmacılar, tümör içi uygulamaya bağlı olarak mcDNA yüklü miseller ile 8 güne kadar *in vivo* gen ekspresyonu

görüntülemişlerdir. Ayrıca kombine tedavi ile doksorubisin ve mcDNA'nın başarılı bir şekilde ve yüksek etkinlikte enkapsülasyonu sağlanmış ve kanser hücrelerine yüksek alımı ortaya konulmuştur. İki ayrı terapötik ajanın birlikte aktarımı tümör hacminde ve kanser hücrelerinin canlılığında önemli ölçüde azalmaya yol açmıştır [180].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

PEtOx- <i>b</i> -PCL ve PEtOx- <i>ko</i> -PEI- <i>b</i> -PCL polimerleri	Tübitak-MAM
Agaroz (düşük erime sıcaklığına sahip)	Sigma-Aldrich, ABD
Bromfenol mavisi	Sigma-Aldrich, ABD
Detöro kloroform, Detöro su	Sigma-Aldrich, ABD
Diklorometan (DCM)	Merck,Almanya
Dimetil tiyazolil difeniltetrazolyum bromid(MTT)	Sigma-Aldrich, ABD
Diyaliz membran (2000, 10000 Da)	Millipore, Almanya
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), (High glikoz, Low glikoz)	Biochrom AG, Almanya
DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)	Biochrom AG, Almanya
DNA Molekül Ağırlık Standardı (1kb)	New England BioLabs, ABD
DNAz-I (DNA nükleaz)	Sigma-Aldrich, ABD
DRAQ-7 TM hücre canlılık boyası	Biolegend, ABD
Enjektör ucu Filtre 0,2 µm, steril	Sartorius Stedim, Almanya
Etidyum bromür	Sigma-Aldrich, ABD
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)	Biochrom AG, Almanya
Fötal sıgır serumu (FBS)	Biochrom AG, Almanya
Jel yükleme boyası (6X)	New England BioLabs, ABD
L-glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Almanya
Metanol, Tetrahidrofuran(THF)	Merck, Almanya
Penisilin / Streptomisin	Biochrom AG, Almanya
Piren	Sigma-Aldrich, ABD
Plazmit DNA izolasyon kiti	Invitrogen, ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich, ABD
Tripan mavisi (<i>tripan blue</i>)	Sigma-Aldrich, ABD
Tripsin-EDTA çözeltisi	Biochrom AG, Almanya

2.1.2. Kullanılan Biyolojik Malzemeler

Escherichia coli(*E. coli*) DH 5α

Yeditepe Üniv. Biyomühendislik Bölümü

L929 fare fibroblast hücre hattı	American Type Culture Collection (ATCC)
MCF-7 ve MDA-MB-468 insan meme adenokarsinom hücre hattı	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC)
pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD plazmit DNA	Yeditepe Üniv. Biyomühendislik Bölümü

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

¹ H-NMR Spektroskopisi	Varian-Mercury 600, Agilent Tech, ABD
AT-FTIR Spektroskopisi	Perkin-Elmer BX Spectrophotometer, ABD
Bio-Rad Subcell Elektroforez sistemi	Bio-Rad Lab. Inc, ABD
Biyogüvenlik kabini	Faster BHG 2004, Class 2 ,İtalya
ELISA Okuyucu	Molecular Devices, Spectra Max Plus/ ABD
Evaporatör	IKA RV 10 basic, Almanya
Flow sitometre cihazı	BD FACSAria II, ABD
Floresan mikroskop Leica DMIL, DFC 320	Leica, Wetzlar, Almanya
Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	Tecnai G ² Spirit Biotwin (FEI, Hollanda).
Hassas Terazı	Mettler Toledo, İsviçre
Jel görüntüleme cihazı	Kodak Gel Logic 200, ABD
Jel permeasyon Kromatografisi (GPC)	Agilent Instrument (Model 1100), ABD
Jel permeasyon Kromatografisi (GPC)	Malvern, ViscoTek TDA 302, ABD
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Nanodrop 2000	Sigma, ThermoScientific, ABD
pH Metre	Sartorius Professional meter PP-20
Spektroflorimetre, plaka okuyucu	Spectramax M2, Molecular Devices, ABD
Ultra saf su cihazı Simplicity 185	Millipore, ABD
Ultrasonik banyo	Bronson B 220 Smith Kline
Vorteks	Ika, Brezilya
Zetasizer Nano Series ZS	Malvern Ins. İngiltere

2.2. Yöntem

2.2.1. Genetik Materyalin Elde Edilmesine Yönelik Çalışmalar

2.2.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Plazmit Vektörler

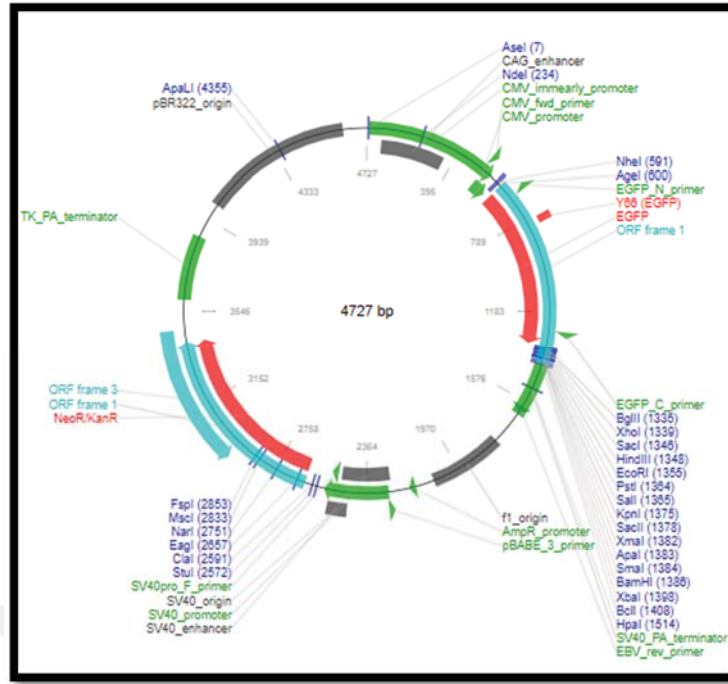
Çalışmamızda, pEGFP-C3 plazmit ve bu plazmide BikDD geni sokulmuş pEGFP-BikDD olmak üzere 2 ayrı plazmit vektör kullanılmıştır. Her iki vektör yeşil floresan protein (GFP) kodlamakta ve üzerinde kanamisin direnç geni taşımaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. Çalışmada kullanılan plazmit vektörlere ait genel bilgiler

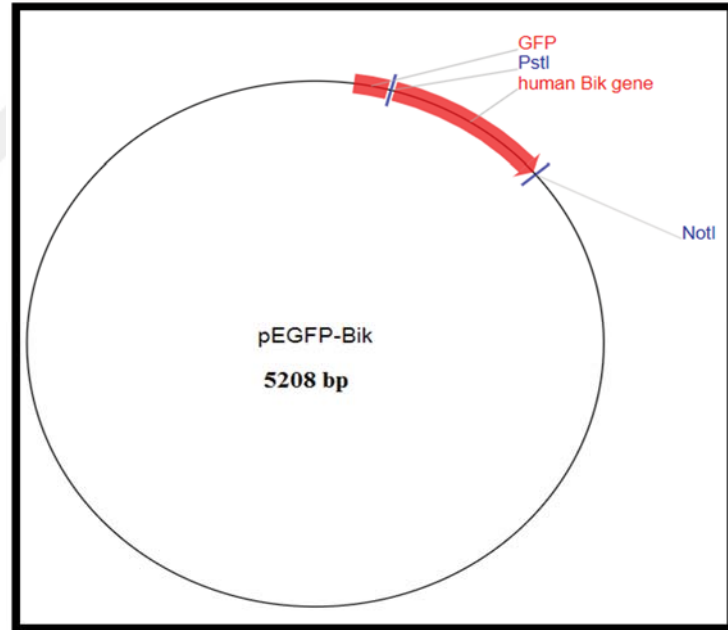
Vektör adı	pEGFP-C3	pEGFP-BikDD
Baz çifti (bç)	4727	5208 (481 bç sokulmuş)
Bakteriyel Direnç	Kanamisin	Kanamisin
Seçici belirteç	Neomisin	Neomisin

481 bç Bik geni, pEGFP-C3 plazmidine sokulmuş şekilde ticari olarak Addgene firmasından satın alınmıştır. Proapoptotik gen olarak kullanılacak BikDD geninin plazmide sokulmuş mutasyonlu hali piyasada satılmadığından Bik geni üzerinde Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Dilek TELCİ ve ekibi tarafından yönlendirilmiş mutagenez yapılmış ve BikDD genine çevrilmiştir. Yönlendirilmiş mutagenez ile Bik geninin sentezlediği proteinin 33. aminoasiti olan treonin ve 35. aminoasiti olan serin aspartik asite dönüştürülmüştür.

Hücre kültürü çalışmalarında *in vitro* transfeksiyon ve apoptoz kaynaklı ölümün tayini için miseller ile kompleks oluşturulmuş boş pEGFP-C3 plazmidi, terapötik geni taşıyan pEGFP-BikDD'ye kontrol olarak kullanılmıştır. Plazmit haritaları Şekil 2.1 ve 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2. 1. pEGFP-C3 plazmidine ait gen haritası [181]



Şekil 2. 2. pEGFP-Bik plazmidine ait gen haritası [182]

Her iki plazmit, *Escherichia coli* (*E. coli*) DH 5 α hücrelerine transforme edilmiş ve transformasyon sonrası çoğaltılan hücrelerden DNA izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Aşağıda verilen genetik materyalin üretimine ait tüm protokoller, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü moleküler hücre biyolojisi araştırma laboratuvarında Prof. Dr. Dilek TELCİ önderliğinde yapılmıştır. Çoğaltım ve saflaşmaları aşamaları

sırasında bir hafta süresince deneylere katılım sağlanmış ve bu süre zarfında deneyler Zeynep Büşra BOLAT'ın yardımı ile Uzm. Bio. Aslı KARA tarafından yapılmıştır.

2.2.1.2. Plazmit DNA (pDNA)'nın Çoğaltılması

2.2.1.2.1. Bakteri Kültürünün Hazırlanışı

E. coli DH5α suşu Luria-Bertani, Miller (LB) Agar plağına ekilerek, 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün LB Agar ortamında (LB Agar besi ortamının içeriği Çizelge 2.2'de verilmiştir) inkübe edilen hücrelerden tek koloni seçilerek 50 mL'lik falkona alınmış, 5 mL sıvı LB (LB besi ortamının içeriği Çizelge 2.3'de verilmiştir) içerisine aktararak 37°C'de gece boyunca yatay çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

Çizelge 2. 2. LB Agar besi ortamı içeriği

İçerik	Miktar (1 Litre'de)
Kazeinin enzimatik sindirim ürünü	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Sodyum Klorür	10 g
Agar	12 g

1 Litre saf suda 37 g ortam, topaklanmayı önlemek amacıyla önce ısıtılarak sonrasında bir dakika kaynatılarak çözülmüştür. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra plaklara dökülmüş ve katılaşması beklenmiştir. Ortamın pH'sı 25°C'de $7,3 \pm 0,2$ olarak ölçülmüştür.

Kanamisin içeren LB Agar besi ortamı hazırlanması için, sterilizasyon sonrası besiyerinin el değecek kadar soğuması için beklenip, 100µg/mL konsantrasyonda antibiyotik çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra plaklara dökülerek katılaşması için beklenmiştir.

Çizelge 2. 3. LB besi ortamı içeriği

İçerik	Miktar (1 Litre'de)
Kazeinin enzimatik sindirim ürünü	10 g
Maya ekstraktı	5 g
Sodyum Klorür	10 g

25 g ortam 1 Litre saf su içerisinde çözülmüş ve iyice karıştırıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Kanamisin içeren LB sıvı besi ortamı hazırlanması için; sterilizasyon sonrası besiyerinin soğuması beklenmiş, sonrasında 100µg/mL konsantrasyonda antibiyotik çözeltisi eklenmiştir.

2.2.1.2.2. Kompetan Hücre Hazırlanması

- Gece boyunca 37 °C’de sıvı LB içerisinde büyümeye bırakılan tek koloniden alınan *E. coli* DH 5α suşunun 1 mL’si, antibiyotik içermeyen 200 mL LB içerisine ekilmiştir (200:1 oran olacak şekilde çalışılmıştır).
- 180–200 rpm’de 37°C’de çalkalayıcıda yaklaşık 1–2 saat inkübe edilmiştir.
- 20 dakika aralıklarla UV spektrofotometrede (Thermo Labsystem) 600 nm dalga boyunda Optik yoğunluk (OD) ölçümü yapılmıştır.
- OD değerinin 0,3 ile 0,4 arasında olması gerektiğinden aralıklarla takip edilmiştir (Bu değer, mikroorganizmaların stasyonel faza geçmeden, büyüme değerini ifade etmektedir).
- İstenilen OD değerine ulaşıldığında, hücreler 50 mL’lik falkona tüplere alınarak, 1000 g’de +4°C’de 10–15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılmış, oluşan bakteri pelleti üzerine -80°C’de saklanan 10 mL iyileştirilmiş tampon çözelti eklenmiş, 15 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve el yardımıyla pellet dağıtılmaya çalışılır. Sonrasında tekrar 1000–1500 g’de 10 dakika boyunca +4°C’de santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra her bir tüpteki pellet üzerine 1’er mL iyileştirilmiş tampon çözelti eklenmiş ve 5–10 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. İyileştirilmiş tampon içerisinde dağıtılan pellet parçalara bölünerek –80 °C’de saklanmıştır. Böylece kompetan bakteri hücresi hazırlanmıştır. İyileştirilmiş tamponun içeriği Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2. 4. İyileştirilmiş tamponun* içeriği

İçerik	50 mL tampon için
Gliserol (Hacimce %15)	7,5 mL
CaCl ₂ (2 M stoktan 75 mmol/L olacak şekilde)	1,87 mL
Steril su	42,5 mL

*İyileştirilmiş tampon hazırlandıktan sonra 0,22 µm steril filtre ile filtrelenerek -80°C’de saklanmıştır.

2.2.1.2.3. Kompetan Hücrelerin pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD Plazmidleri ile Transformasyonu

- 100 µL kompetan hücre üzerine yaklaşık 450–500 ng (1- 2) µL olacak şekilde plazmit eklenmiştir ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.

- Isı şoku ile öncelikle 42°C’de 90 saniye inkübe edilmiş sonrasında tekrar buz üzerinde 5 dakika bekletilmiştir.
- Yaklaşık 300 µL SOC Medium ya da NZY+ Broth eklenerek 1 saat süre ile 37°C’de 300 rpm’e ayarlanmış çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda 100 ya da 200 µL transforme edilmiş örnek alınarak, steril edilmiş 100µg/mL konsantrasyonda kanamisin içeren LB Agar plağı üzerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C’ye ayarlanmış etüvde bir gece inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrası tek koloni seçilerek, büyük ölçekte üretim için 100µg/mL kanamisin içeren 200 mL sıvı LB içerisinde 180 rpm’de 37°C’de gece boyunca çoğaltılmış ve plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır.

2.2.1.2.4. Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmit DNA izolasyonu PureLink™ HiPure Plazmit DNA Saflaştırma Kiti Midiprep (İnvitrogen K2100, USA) kullanılarak üreticinin belirttiği protokole göre gerçekleştirilmiştir. Başlamadan önce;

Bütün izolasyon adımları oda sıcaklığında yapılmıştır.

Resüspansiyon tamponu içerisine belirtildiği miktarda RNaz A eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Tampon 4 °C’de saklanmıştır.

Lizis tamponu, çöken tuzları uzaklaştırmak için 37°C’ye ayarlanmış su banyosunda inkübe edilmiştir.

İzolasyon Basamakları

- 10 mL dengeleme tamponu HiPure Midi kolona eklenmiş ve çözeltinin kolondan yerçekimi kuvvetiyle akışına izin verilerek kolonun dengeye getirilmesi sağlanmıştır.
- 200 mL sıvı LB içerisinde çoğaltılmış plazmidler 50 mL’lik 4 ayrı falkon tüpe bölünmüş ve 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- 4mL RNaz içeren resüspansiyon tamponu hücre pelleti üzerine eklenmiş ve homojen bir çözelti elde edene kadar pellet pipetleme yoluyla resüspanse edilmiştir.
- Çözelti üzerine 4 mL lizis (parçalama) tamponu eklenmiş ve tüpün kapağı kapatılarak 5 kez hızlıca alt üst edilmiştir.
- İşlemden sonra tüpler 5 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- Tüplerin üzerine 4 mL çöktürme tamponu eklenmiş ve homojen bir karışım elde edene kadar tekrar hızlıca alt üst edilmiştir.
- Elde edilen lizat 15000 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
- Pellet kaldırılmadan dengeye getirilmiş kolon üzerine süpernatant yüklenmiştir.
- Çözelti yer çekiminin etkisiyle kolondan uzaklaştıktan sonra, 10 mL yıkama tamponu ile 2 kez yıkanmıştır.
- Kolon steril 15 mL'lik falkon tüplere alınmış ve üzerine 5 mL elüsyon tamponu eklenmiş ve DNA'nın kolondan elüe olması beklenmiştir. Elüsyon tüpü saf DNA içermektedir.
- —20°C'de bulunan izopropanolden 3,5 mL alınarak elüat üzerine eklenmiş, iyice karıştırılmış ve 15000 rpm de 30 dakika 4°C'de santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 3 mL -20 °C'de bekletilen %70'lik etanol eklenmiş ve 10000 g'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Pellet 10–15 dakika süre ile alkolün uçması için havada kurutulmuş, sonrasında saflaştırılmış Plazmit DNA 150 µL Tris-EDTA(TE) tamponu içerisinde resüspande edilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.1.3. Plazmit DNA Karakterizasyonu

İzolasyon sonucunda elde edilen plazmit DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları 260 nm ve 280 nm'de NanoDrop Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür (ND-2000, Sigma). Ayrıca plazmidler %1 agaroz jel elektroforezde yürütülerek etidyum bromür ve UV yardımıyla görüntülenmiş ve saflık kontrolü teyit edilmiştir.

Agaroz Jelin Hazırlanması:

Agaroz jel elektroforezi için tüm çalışmalar boyunca genellikle %0,8 ya da %1 agaroz içeren jel kullanılmıştır. Yürütme tamponu ve yükleme jeli hazırlamak için stok 50X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tampon çözeltisinden dilüe edilen 1X TAE kullanılmıştır.

- Agaroz jel kasetine örnek sayısına uygun olan tarak seçilip kasete yerleştirilmiştir.
- % 1 (a/h)'lik jel hazırlamak için; Düşük erime sıcaklığına sahip 1 g agaroz tartıldıktan sonra üzerine 100 mL 1X (TAE) agaroz jel elektroforez tamponu eklenmiştir. Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

- Jel, eli yakmayacak kadar soğuduktan sonra üzerine son konsantrasyonu 0,2 µg/mL olacak şekilde 10 mg/mL konsantrasyondaki stok etidyum bromür çözeltisi eklenmiştir.
- Jel tepsiye dökülerek polimerleşmeye bırakılmıştır.
- Jel katılaştıktan sonra yan destekler ve taraklar dikkatlice çıkarılıp jel tepsi, içerisinde 1X TAE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

DNA örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Görüntülenmesi

Jel üzerinde açılan ilk kuyucuğa, 2 µL 1 kilobazlık (kb) DNA işaretleyici (yükleme boyası ile hazır karıştırılmış) yüklenmiştir.

Kullanılacak DNA miktarına ve kuyucuğa yüklenecek hacime bağlı olarak uygun miktarda 6x yükleme boyası DNA örneği ile karıştırılmıştır ve jele yüklenmiştir.

Elektroforez koşulları 100 V'da yaklaşık 45–60 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir.

Jel Görüntüleme cihazında (Kodak Gel Logic 200, ABD) 260 nm'de jel görüntüsü alınmıştır.

Agaroz Jel Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Etidyum Bromür Çözeltisi

10 mg etidyum bromür tartılarak 1 mL saf su içerisinde çözülmüş ve stok çözelti oluşturulmuştur. Çalışmalar sırasında 100 mL'lik bir jel içerisinde 0,2 µg/mL olacak şekilde etidyum bromürün stok çözeltisinden 2 µL alınarak jele hazırlama esnasında eklenmiştir.

TAE tampon çözeltisi (50x), 500 mL tampon çözelti için

50 X TAE tampon çözeltisi

Malzeme	Miktar
Trizma bazı	121 g
Glasiyel asetik asit	28,55 mL
0.5 M EDTA (pH 8)	50 mL
Saf su	Son hacim 500 mL olacak şekilde

Hazırlanan 50X TAE tamponu 1X olacak şekilde saf su ile seyreltilerek oda sıcaklığında ağzı parafillenerek saklanmıştır. Tüm elektroforez işlemlerinde 1X'e seyreltilmiş tampon çözelti kullanılmıştır.

2.2.2. PEOx-*b*-PCL ve PEOx-*ko*-PEI-*b*-PCL Blok kopolimerlerinin Sentez Çalışmaları

TÜBİTAK MAM Malzeme Enstitüsü çalışma ekibimiz tarafından 213M760 numaralı TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında hidroliz edilmemiş [Poli (2-etil-2-oksazolin)-blok-Poli(ϵ -kaprolakton) (PEOx-*b*-PCL) ve hidroliz edilmiş Poli(2-etil-2-oksazolin)-ko-Poli(etilenimin)-blok-Poli(ϵ -kaprolakton) (PEOx-*ko*-PEI-*b*-PCL)] blok kopolimerleri sentezlenmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle farklı moleküler ağırlıklarda hidroliz edilmemiş PEOx-*b*-PCL blok kopolimerleri sentezlenmiştir (Çizelge 2.5). Misel oluşumu için hidrofobik bloğun toplam blok kopolimere göre ağırlıkça yüzdesi ve hidrofilik:hidrofobik blok kopolimer molekül ağırlıkları önem teşkil etmektedir. Bu nedenle ideal özelliklerde misel formülasyonlarının hazırlanması için öncelikle PEOx-*b*-PCL blok kopolimer için farklı hidrofilik:hidrofobik oranlarda blok kopolimerler ile çalışılarak uygun oranın belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 2. 5. Farklı moleküler ağırlık oranlarında sentezlenen PEOx-*b*-PCL polimerleri

BLOK KOPOLİMER
PetOx ₃₈₀₀ - <i>b</i> -PCL ₁₉₀₀
PetOx ₄₅₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₂₅₀
PetOx ₉₂₀₀ - <i>b</i> -PCL ₅₁₀₀
PetOx ₇₅₁₆ - <i>b</i> -PCL ₄₀₄₇
PetOx ₇₄₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₆₀₀
PetOx ₇₄₀₀ - <i>b</i> -PCL ₁₅₀₀
PetOx ₆₄₀₀ - <i>b</i> -PCL ₁₅₀₀
PetOx ₁₁₃₀₀₍₁₀₇₀₀₎ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀

Saflaştırması tarafımızdan yapılan bu polimerlerden hazırlanan misellerin karakterizasyonları yapıldıktan sonra boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri açısından en uygun bulunan PEOx polimerin kısmi hidrolizi ile 3 farklı hidroliz derecelerinde (%30, %60 ve %70) PEOx-*ko*-PEI(%30,%60,%70) blok kopolimerleri sentezlenmiş ve PCL polimeri ile bloklanmıştır. Hidroliz sonucu elde edilen PEOx-*ko*-PEI(%30,%60,%70)-*b*-PCL blok kopolimerlerinden hazırlanan boş misel formülasyonları arasından uygun partikül boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeksine sahip 2 farklı hidroliz derecesindeki blok kopolimerler seçilerek miseller hazırlanmış ve terapötik gen ile kompleksleştirme yapılmak üzere tez çalışmalarına devam edilmiştir.

2.2.2.1. PEtOx-b-PCL Blok Kopolimer Sentezi

Poli (2-etil-2-oksazolin) – blok – Poli (ϵ -kaprolakton) (PEtOx-*b*-PCL) amfifilik blok kopolimerinin sentezi öncelikle hidrofilik blok olarak PEtOx ve hidrofobik blok olarak PCL polimerinin canlı halka açılım polimerizasyonu (LCROP) ile ayrı ayrı sentezlenmesi ve sonrasında klik kimyası ile bakır katalize, azid-alkin siklokatılım reaksiyonu (CuAAC) sonucu blok haline getirilmesi ile elde edilmiştir. Kliklenebilir α -alkin-işlevselleştirilmiş-Poli(ϵ -kaprolakton) ve ω -azid işlevselleştirilmiş-Poli (2-etil-2-oksazolin) (PEtOx-N₃) kolaylıkla hazırlanmış ve oda sıcaklığında bakır sülfat / askorbik asit katalizör sistemi kullanılarak birleştirilmiştir (Şekil 2.3). Amfifilik blok kopolimerlerin yapıları, spektroskopik ve kromatografik analizler kullanılarak aydınlatılmıştır [183].

Aşağıda blok kopolimerlerin ve misellerin sentez ve hazırlama koşullarına ait detaylar verilmiştir.

Azid İşlevselleştirilmiş PEtOx-N₃ Polimerinin Sentezi

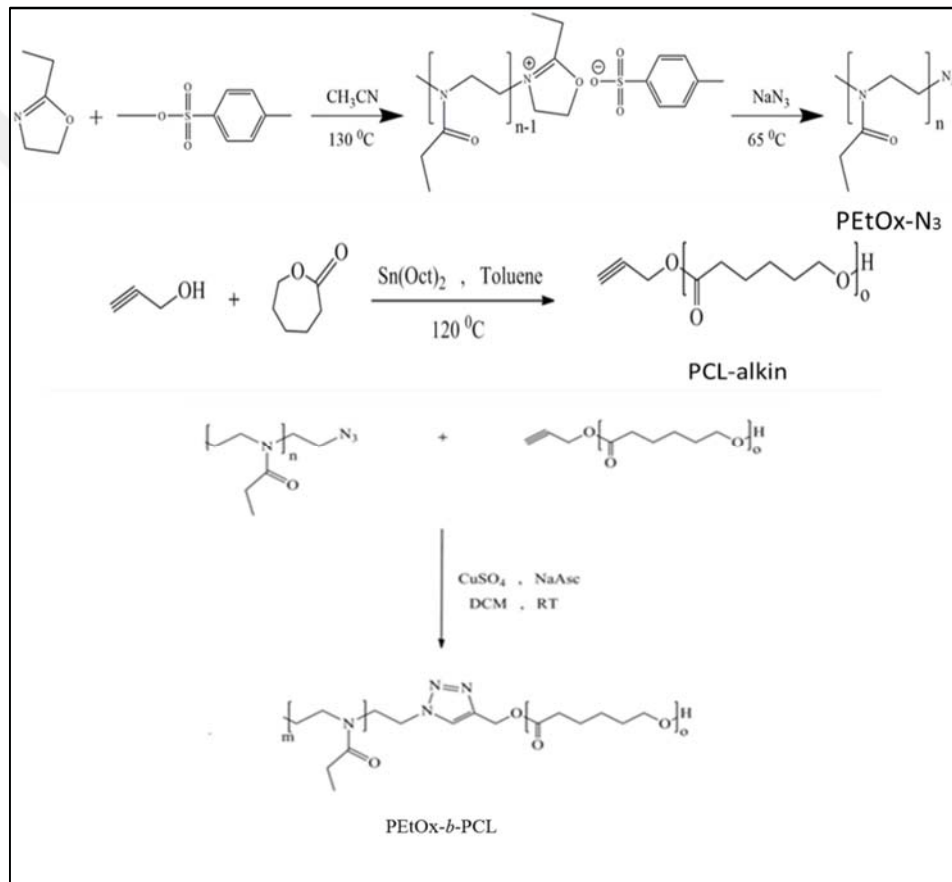
PEtOx, 2-etil-2-oksazolin monomerinin varlığında canlı halka açılım polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Bunun için, oda sıcaklığında inert atmosfer varlığında asetonitril (ACN) içinde çözülmüş metil p-toluen-sülfonat (MeTos) (1.403 mmol) başlatıcısı ile 2-etil-2-oksazolin (EtOx)(148,6 mmol) monomerinin canlı katyonik halka açılım polimerizasyonu ile azid-işlevselleştirilmiş PEtOx-N₃ sentezlenmiştir. 15 saat 130 °C’de polimerizasyondan sonra, reaksiyon karışımı oda sıcaklığında tekrar soğutulmuş ve inert atmosfer altında sonlandırma ajanı olarak sodyum azid (NaN₃) (5,612 mmol) kullanılarak reaksiyon sonlandırılmıştır. Polimerizasyon, 24 saat 65°C sıcaklıkta karanlıkta sonlandıktan sonra çözücü düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır. Nihai ürün diklorometan (DCM) içinde çözülerek soğuk dietileterde çöktürülmüş ve gece boyunca vakum altında kurutulmuştur.

Alkin İşlevselleştirilmiş PCL Polimerinin Sentezi

PCL-Alkin, başlatıcı olarak propargil alkol ve katalizör olarak kalay oktoat Sn(Oct)₂ kullanılarak ϵ -kaprolakton’un halka açılma polimerleşmesiyle sentezlenmiştir. ϵ -kaprolakton (45.12 mmol), toluen içindeki kalay oktoat çözeltisi (0.039 mmol), propargil alkol (3.21 mmol) ve toluen kurutulmuş tüpe ilave edilmiş ve tüp bir vakum hattı kullanılarak argon gazı ile doldurulmuştur. Reaksiyon karışımı 120°C’de 5 saat boyunca karıştırılmıştır. Çözücünün düşük basınç altında uzaklaştırılmasından sonra, kalıntı DCM’de çözülmüş ve soğuk metanolde çöktürülmüştür. Elde edilen polimer vakumlu etüvde gece boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Klik Kimyası ile PEtOx-N₃, Alkin-PCL Polimerlerinin Bloklanması

PEtOx-b-PCL blok kopolimeri, klik kimyası ile bakır katalize, azid-alkin siklokatılım reaksiyonu sonucu blok haline getirilmiştir. Kliklenebilir α -alkin-işlevselleştirilmiş-Poli(ϵ -kaprolakton)(PCL alkin), ω -azid işlevselleştirilmiş-Poli(2-etil-2-oksazolin) (PEtOx-N₃), bakır sülfat (CuSO₄) ve askorbik asit DCM içerisinde çözülmüştür. Sonrasında, karışımın nitrojenle havası alınmış ve 24 saat karanlıkta oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon süresinin tamamlanmasından sonra, karışım silika kolondan geçirilmiş ve çözücü alçak basınç altında uzaklaştırılmıştır. Son olarak kalıntı DCM içerisinde çözülmüş, soğuk dietil eterde çöktürülmüş ve gece boyunca vakum altında kurutulmuştur [183].



Şekil 2. 3. PEtOx-b-PCL blok kopolimerinin sentez şeması

2.2.2.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL Blok Kopolimerlerinin Sentezi

Uygun blok oranlarına sahip blok kopolimer belirlendikten sonra gen kompleksleştirme için gerekli asıl yapı olan PEtOx-ko-PEI-b-PCL sentezi için, PEtOx'un farklı oranlarda kısmi hidrolizi ile yapıya düz PEI'nin katılması gerçekleştirilmiş ve PCL ile klik kimyası yapılarak nihai polimer sentezi yapılmıştır [184](Şekil 2.4).

PETox'un PEtOx-ko-PEI'ye kısmi hidrolizi

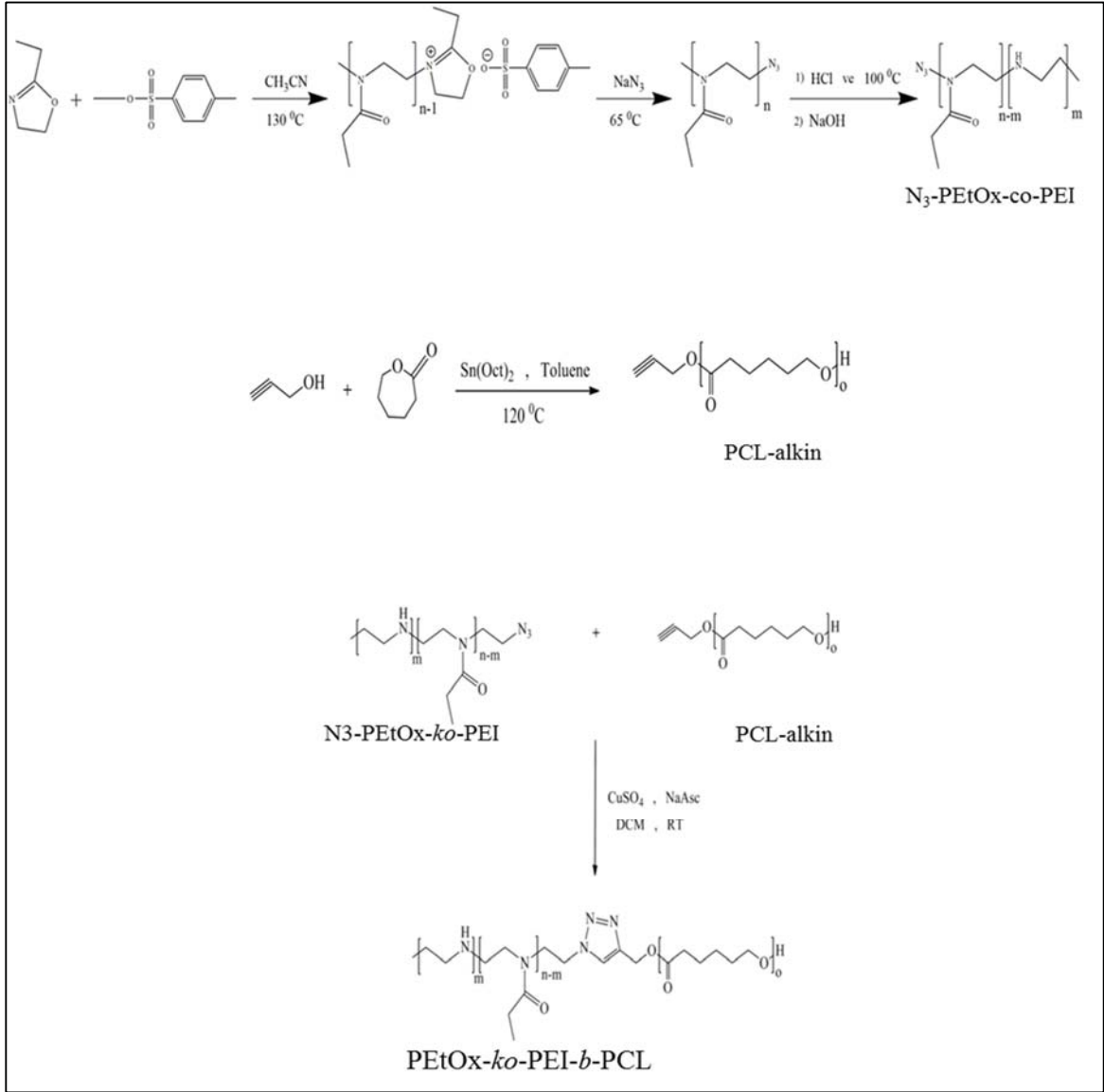
2-etil-2-oksazolin (EtOx)(49,531 mmol) monomerinin canlı katyonik halka açılım polimerizasyonu ile azid-işlevselleştirilmiş PEtOx-N₃'ün Poli(2-etil-2-oksazolin)-ko-Poli(etileneimin)(PEtOx-co-PEI)'e kısmi hidrolizi geri akış koşulları altında araştırılmıştır. Bu nedenle, gerekli miktarlarda 11,96 M HCl (sulu) ve PEtOx stok çözeltisi (amit konsantrasyonu = [A] = 0,48 M) karıştırılmış ve 100° C'de farklı zaman noktalarında ısıtılarak hidroliz edilmiştir. Farklı reaksiyon süreleri tamamlandığında, elde edilen örnekler soğutulmuş ve 5M NaOH solüsyonu ile pH:10'a ulaşmak için (tam asit protonasyonu) nötralize edilmiştir. Oluşan tuzların filtrasyonundan sonra çözücü düşük basınç altında uzaklaştırılmış ve kalıntı DCM/metanol karışımı içerisinde çözülmüş ve soğuk dietileterde çöktürülmüştür. Sonrasında, örnekler FT-IR ve ¹H-NMR spektroskopisi için vakum altında kurutulmuştur.

PEtOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimer sentezi

Amfifilik blok kopolimer sentezi bakır-katalize azid-alkin siklokatalim klik kimyası tarafından gerçekleştirilmiştir. ω-azid işlevselleştirilmiş farklı hidroliz yüzdesindeki poli (2-etil-2-oksazolin)-ko-poli(etilenimin), alkin-işlevselleştirilmiş poli (ε-kaprolakton) (PCL-alkin), bakır sülfat (CuSO₄), sodyum askorbat, DCM ve metanol karışımında çözülmüştür. Sonrasında, karışımın nitrojenle havası alınmış ve 24 saat karanlıkta oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon süresinin tamamlanmasından sonra, karışım silika kolondan geçirilmiş ve çözücü alçak basınç altında uzaklaştırılmıştır. Son olarak kalıntı DCM içerisinde çözülmüş, soğuk dietil eterde çöktürülmüş ve gece boyunca vakum altında kurutulmuştur. PEtOx'un kısmi hidrolizi ile farklı hidroliz derecesinde PEI içeren blok kopolimerlerin, molekül ağırlıkları ve hidroliz yüzdeleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2. 6. PEtOx₍₁₁₃₀₀₎₁₀₇₀₀-b-PCL₂₁₀₀ blok kopolimerinin kısmi hidrolizi ile hazırlanan farklı PEI derecelerindeki blok kopolimerlerin molekül ağırlıkları ve hidroliz yüzdeleri

BLOK KOPOLİMER HİDROLİZ YÜZDESİ VE MOLEKÜL AĞIRLIĞI
PEtOx ₄₃₀₀ -ko-PEI ₂₈₀₀ (%60)-b-PCL ₂₁₀₀
PEtOx ₇₅₀₀ -ko-PEI ₁₄₀₀ (%30)-b-PCL ₂₁₀₀
PEtOx ₂₇₅₀ -ko-PEI ₃₆₀₀ (%70)-b-PCL ₂₁₀₀



Şekil 2. 4. PETox-ko-PEI-b-PCL blok kopolimeri sentez şeması [184]

TÜBİTAK MAM Malzeme Enstitüsü araştırma ekibi tarafından sentezlenmiş tüm bu blok kopolimerlerden öncelikle boş misel formülasyonları hazırlanmıştır. Ayrıca saflaştırma işleminin misel boyutu üzerine etkisini incelemek amacıyla PETox-b-PCL blok kopolimerlerin diyaliz yöntemi ile saflaştırılmasına karar verilmiştir. Sentezlenen blok kopolimerin saflaştırılması, polimer üretim aşamaları sırasında ortamda kalabilme ihtimali olan safsızlıkların giderilmesi sebebiyle gerçekleştirilmiştir. Diyaliz yönteminde, yüksek hidrofilik yapısı nedeniyle suda çözünür olan 400 mg blok kopolimer 4 mL suda çözölmüş sonrasında oda sıcaklığında 6 gün süre ile günde 2 kez 2'şer litre suya karşı diyaliz edilmiştir. PETox bloğunun uzunluğu göz önünde bulundurularak 3500 g/mol moleküler ağırlığı ayırma sınırı (MWCO) diyaliz membran (Spectra-por, U.S) ile saflaştırma işlemi yapılmasına karar verilmiştir. Fakat bu boyutlu diyaliz membran ile fazla polimer kaybına

uğranıldığından, 2000 g/mol MWCO diyaliz membran ile saflaştırma işlemine devam edilmiştir. 6 gün süre sonunda diyalizi tamamlanan kopolimer çözeltisi -20°C'de dondurularak sonrasında 2 gün süre ile liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyonu takiben toz haline getirilen örneklerden misel formülasyonları hazırlanmış ve saflaştırmanın misel boyutu ve polidispersite indeksine (PDI) indeksi dinamik ışık saçılım yöntemi ile tayin edilmiştir.

2.2.3. Misel Formülasyonlarının Hazırlanması

Tezin özgünlüğünü oluşturan PEOx tabanlı blok kopolimerler, ticari polimerler olmadığından, orjinal sentezlenmelerinden kaynaklı çeşitli zorluklar ile karşılaşmıştır. Özellikle bu blok kopolimerler ile hazırlanan misellerin saflıkları ve optimizasyon çalışmaları sırasında nihai formülasyonlar elde edilene kadar pek çok ön formülasyon çalışmaları yapılmış ve problemlerin giderilmesi sağlanmıştır. Bu ön formülasyon çalışmaları ile istenilen tüm özelliklere sahip üstün yetenekli misellerin elde edilmesini sağlamıştır.

2.2.3.1. Hidroliz Edilmemiş PEOx-PCL Blok Kopolimerleri ile Hazırlanan Boş Misellerin Ön Formülasyon Çalışmaları

DNA ile kompleksleştirme çalışmalarından önce miselleri hazırlamak için öncelikle ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Gen kompleksleştirme işlemi için ihtiyaç duyulan uygun özelliklere sahip hidroliz edilmiş katyonik özellikteki blok kopolimerin belirlenebilmesi adına hidroliz edilmemiş polimerler ile boş misel formülasyonları hazırlanmıştır.

Literatür araştırmalarına göre, PEOx polimerin PCL gibi poliesterler ile blok kopolimerlerinden misel oluşturmada, en sık kullanılan ve daha düşük boyutta misel elde edildiği belirtilen diyaliz [185], çözücü buharlaştırma [168] ve ince film hidratasyonu [186] olmak üzere 3 farklı yöntemin çeşitli modifikasyonları ile ön formülasyon çalışmaları yapılmış ve en uygun boyut, PDI ve zeta potansiyel değerlerine sahip optimum özellikte misel oluşturduğu belirlenen tayin yöntemi seçilerek miseller hazırlanmış ve çalışmalara bu yöntem ile devam edilmiştir.

Yöntem I. Diyaliz Yöntemi ile Misellerin Oluşturulması

Tez çalışmasında, Kim ve arkadaşlarına ait diyaliz yönteminin üzerinde yapılan birkaç modifikasyon ile miseller hazırlanmıştır [185]. Öncelikle 20 mg tartılan PEOx-*b*-PCL kopolimerleri amber renkli tüplere alınmış ve 4 mL Tetrahidrofuran (THF) içerisinde 40 °C sıcaklıkta manyetik karıştırıcı üzerinde 5 dakika süre ile çözülmüştür. Sonrasında, oda

sıcaklığında gece boyunca karıştırılmış ve ertesi gün MWCO 2000 g/mol olan rejenere selüloz diyaliz membran içerisine alınmış ve 48 saat süre ile ultra saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası formülasyonlar 0,22 µm steril filtre (Millipore, Merck) ile süzülmüştür. Süzülen örnekler derin dondurucuda (-20 °C) 1 gece boyunca dondurulmuş ve ardından 48 saat süre ile liyofilize edilmiştir (FreeZone Freeze Dry System, Labconco). Liyofilize edilen örnekler son konsantrasyonları 2 mg/mL olacak şekilde saf su içerisinde disperse edilmiş ve partikül büyüklüğü, polidispersite indeksleri (PDI) ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür.

Yöntem II. Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Misellerin Oluşturulması

Kullandığımız yöntemlerden bir diğeri, Yan ve Qiu'nun kullanmış olduğu yöntemin modifiye edilmiş halidir [168]. 1 mL Tetrahidrofuran (THF) içerisinde çözülen 20 mg PEtOx-*b*-PCL kopolimeri 20 mL ultra saf su (Milli-Q®, Merck) üzerine şırınga ile damla damla eklenmiştir. 5 dakika boyunca manyetik karıştırıcı altında karıştırıldıktan sonra misel oluşumu için organik çözücü vakum altında 30°C 100 rpm'de rotavapor ile 2 saat süre boyunca uzaklaştırılmıştır. Son konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde ultra saf su içerisinde hazırlanan misel formülasyonları 0,22 µm steril filtreden süzülmüştür. Taze hazırlanmış örneklerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.

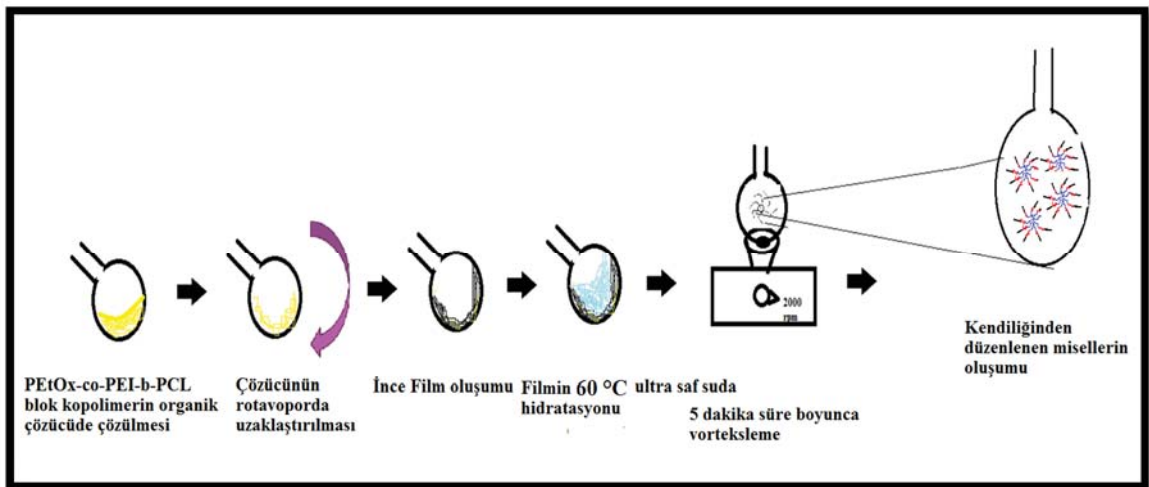
Yöntem III. İnce Film Hidratasyon Yöntemi ile Misellerin Oluşturulması

Tez çalışmamızda denenen yöntemlerden sonuncusu, Gao ve arkadaşlarının kullandığı yöntemin modifiye edilmesiyle oluşturulan ince film hidratasyon yöntemidir [186]. Yönteme göre, polimer kaybına uğramamak amacıyla balon içerisine tartılan 20 mg PEtOx-*b*-PCL kopolimeri, 4 mL Tetrahidrofuran (THF) içerisinde manyetik karıştırıcıda 1 saat süre ile 550 rpm hızında karıştırılarak çözülmüştür. Balon içerisindeki organik çözücü 60°C'de 20 dakika vakum altında 100 rpm hızında rotavapor ile uçurularak balon yüzeyinde ince bir film tabakasının oluşumu sağlanmıştır. Sonrasında 60 °C'ye ısıtılmış 10 mL ultra saf su balona eklenerek son konsantrasyon 2 mg/mL olacak şekilde misel çözeltisi hazırlanmış, hidrate edilmiş ve 5 dakika boyunca karışım vortekslenmiştir. Temiz ve homojen bir misel solüsyonu elde etmek için süspansiyon 0,22 µm steril filtreden süzülmüştür. Taze hazırlanmış miseller hiç bekletilmeden partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri açısından karakterize edilmiştir.

2.2.3.2. Hidroliz Edilmiş PEOx-ko-PEI-b-PCL Blok Kopolimerleri İle Boş Misel Formülasyonlarının Hazırlanması

Daha önce belirtildiği üzere, hidroliz edilmemiş 8 farklı blok kopolimer ile üç farklı yöntemle hazırlanan boş misel formülasyonları arasından optimum partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksine sahip blok kopolimer ve en uygun misel hazırlama yöntemi belirlenmiştir. Belirlenen bu polimer için kritik misel konsantrasyonu ve TEM analizleri gerçekleştirildikten sonra PEOx'un kısmi hidrolizi ile farklı hidroliz derecelerinde PEOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimerleri sentezlenmiştir.

PEOx'un kısmi hidrolizi ile hazırlanan farklı hidroliz derecelerindeki blok kopolimerlerden daha önce belirtildiği şekilde ince film hidratasyon yöntemi ile boş misel formülasyonları hazırlanmıştır (Şekil 2.5). Hidroliz sonucu yapıya katılan PEI, blok kopolimerin hidrofobisitesini arttırdığından dolayı, blok kopolimerin THF içerisinde çözünmediği görülmüştür. Bu nedenle farklı organik çözücüler içerisinde blok kopolimerin çözünürlüğü değerlendirilmiş ve hacimce (1:1) oranda DCM/Metanol karışımı içerisinde en iyi çözünürlük elde edilmiştir. Amber renkli cam tüplere, 8 mg tartılan hidrolize blok kopolimer 8 mL (1:1) DCM/Metanol karışımı içerisinde 2 saat süre ile manyetik karıştırıcıda 550 rpm hızında karıştırılarak çözülmüştür. Balon içerisindeki organik çözücü 60°C'de 20 dakika vakum altında 100 rpm hızında rotavapor ile uçurularak balon yüzeyinde ince bir film tabakasının oluşumu sağlanmıştır. Sonrasında 60°C'ye ısıtılmış ultra saf su balona eklenerek son konsantrasyon 2 mg/mL olacak şekilde misel çözeltisi hazırlanmış, hidrate edilmiş ve 5 dakika boyunca karışım vortekslenmiştir. Temiz ve homojen bir misel solüsyonu elde etmek için süspansiyon 0,22 µm steril filtreden süzölmüştür.

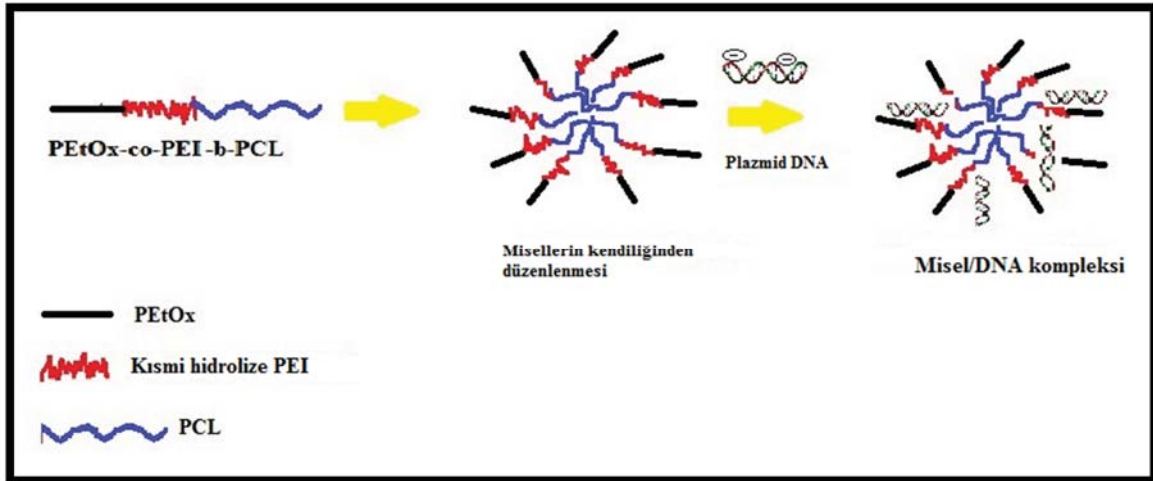


Şekil 2. 5. İnce film hidratasyon yöntemine göre misellerin hazırlanışı

Boş misel formülasyonlarının tasarım, üretim ve karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, farklı hidroliz dereceleri arasından optimum partikül boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeksi belirlenen misellerin kritik misel konsantrasyon ve TEM analizleri yapılmıştır. Tüm analizlerin tamamlanmasını takiben belirlenen hidroliz derecesindeki blok kopolimerden hazırlanan misel formülasyonlarının öncelikle çıplak plazmit DNA (pEGFP-C3) ile sonrasında ise terapötik geni içeren plazmit (pEGFP-BikDD) ile kompleksleştirme çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan miseller her defasında taze hazırlanmıştır.

2.2.3.3. %30 ve %60 Hidrolize Blok Kopolimerler ile PPP30-PPP60 Misel/Gen (pEGFP-C3, pEGFP-BikDD) Komplekslerinin Hazırlanması

Farklı hidroliz derecelerindeki blok kopolimerlerden ince film hidratasyonu yöntemi ile hazırlanan boş misellerin, genetik materyal ile kompleks oluşumunun sağlanması için, elektrostatik etkileşim yönteminden yararlanılmıştır. Yöntem daha önce belirttiğimiz gibi, katyonik yapıdaki polimer ile negatif yüklü genetik materyalin uygun koşullarda pozitif ve negatif yükler arasındaki elektrostatik etkileşimine dayanmaktadır (Şekil 2.6). Uygun kompleks oluşumu, N/P oranı ile belirlenmiş olup, N/P oranı polimerdeki pozitif yüklü amin (N) gruplarının mol oranlarının DNA'daki fosfat (P) gruplarının mol oranlarına oranını ifade etmektedir [187].



Şekil 2. 6. Elektrostatik etkileşime dayalı misel/plazmit DNA-gen kompleksinin oluşumu

Çalışmamızda uygun özelliklere sahip olduğu belirlenen hidroliz derecelerindeki (%30 ve %60) blok kopolimerler seçilmiş ve sonraki çalışmalarda bu blok kopolimerlerden hazırlanan misel formülasyonları kullanılmıştır. DNA içeren misel formülasyonlarının hazırlanmasında öncelikle boş misel formülasyonlarının üretimi gerçekleştirilmiş olup,

sonrasında uygun koşullar altında geni taşıyan plazmidler ile kompleksleştirme işlemi yapılmıştır.

Seçilen uygun hidroliz derecesindeki PPP30 (%30 hidrolize) ve PPP60 (%60 hidrolize) blok kopolimerler ile ince film hidratasyon yöntemine göre taze hazırlanan 2 mg/mL konsantrasyondaki boş miseller, steril HEPES tamponu (pH 7,4, 10 mM) ve ultra saf su olmak üzere iki farklı çözücü ortamı ile farklı N/P oranlarına ulaşacak şekilde dilüe edilmiştir (Çizelge 2.7 ve 2.8). Komplekslerin hazırlanmasında 0,5'ten 30'a kadar olmak üzere 8 farklı N/P oranı çalışılmıştır. Kompleksleştirme çalışmaları için stok pEGFP-BikDD ve pEGFP-C3 plazmidleri ayrı ayrı HEPES tamponu (pH 7,4, 10 mM) ve ultra saf su ile seyreltilerek 25 µL hacim içerisinde 2 µg ve 4 µg olacak şekilde sabit tutulmuş ve öncelikle miseller ile ideal boyut ve özellikte kompleks oluşturabilen uygun gen miktarı belirlenmiştir. Belirlenen N/P oranlarına ulaşmak için uygun oranlarda seyreltilen misel çözeltileri üzerine eşit hacimde (25 µL) ayrı ayrı HEPES tamponu ve ultra saf su içerisinde disperse edilmiş DNA çözeltisi damla damla eklenerek toplam 50 µL hacimde karışımlar hazırlanmış ve 1 dakika süre ile kuvvetlice vortekslenmiştir. Kompleksleşmenin elektrostatik etkileşim ile meydana gelmesi için, misel/gen karışımları 1 saat süreyle oda sıcaklığında dengeye gelmeleri için bırakılmıştır.

Ayrıca, farklı çözücülerin misel/gen komplekslerinin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve stabilitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla kompleksler ultra saf su ve 10 mM, pH 7,4 steril HEPES tamponunda hazırlanmış ve karakterize edilmiştir.

Çizelge 2. 7. %30 Hidrolize polimer (PPP30) ile hazırlanan misel/gen komplekslerinin formülasyondaki miktarları

N/P oranı	Polimer miktarı (50 µL'de)	DNA miktarı (50 µL'de)
N/P 0,5	2 µg	4 µg
N/P 1	4 µg	4 µg
N/P 2	8 µg	4 µg
N/P 4	16 µg	4 µg
N/P 8	32 µg	4 µg
N/P 10	40 µg	4 µg
N/P 20	80 µg	4 µg
N/P 30	120 µg	4 µg

Çizelge 2. 8. % 60 Hidrolize polimer (PPP60) ile hazırlanan misel/gen komplekslerinin formülasyondaki miktarları

N/P oranı	Polimer miktarı (50 µL’de)	DNA miktarı (50 µL’de)
N/P 0,5	1 µg	4 µg
N/P 1	2 µg	4 µg
N/P 2	4 µg	4 µg
N/P 4	8 µg	4 µg
N/P 8	16 µg	4 µg
N/P 10	20 µg	4 µg
N/P 20	40 µg	4 µg
N/P 30	60 µg	4 µg

Misel/gen kompleksleri her defasında taze hazırlanmış olup, karakterizasyon ve transfeksiyon deneyleri için üzerinde herhangi bir değişiklik yapılmadan kullanılmıştır.

Genetik materyalin misellere yüklenme etkinliğini tayin etmek ve kompleks oluşumunu doğrulamak için farklı N/P oranlarında hazırlanan formülasyonların jel reterdasyon analizleri yapılmıştır. Miseller sistemler dinamik yapıda olduğundan ve kompleksleşme, blok kopolimerin yapısında bulunan PEI ile genlerin elektrostatik etkileşimine dayandığından dolayı misellere gen yükleme etkinliğinin tayininde spektrofotometrik bir analiz yöntemi kullanılmamıştır. Bunun yerine, jel reterdasyon analizi ile %100 kompleks oluşturan ve dolayısı ile jel üzerinde bant profili vermeyen N/P oranı belirlenerek gen yükleme etkinliği tayin edilmiş ve çalışmalara belirlenen N/P oranı ile hazırlanan miseller ile devam edilmiştir.

2.2.4. PEOx-*b*-PCL ve PEOx-*ko*-PEI-*b*-PCL blok kopolimerlerin karakterizasyonu

Hidroliz edilmemiş PEOx-*b*-PCL ve farklı derecelerde hidroliz edilmiş PEOx-*ko*-PEI-*b*-PCL blok kopolimerlerinin kimyasal yapısı TÜBİTAK MAM ekibi tarafından Proton nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) ve Zayıflatılmış toplam yansıma Fourier dönüşümü kızılötesi (ATR-FTIR) spektrumu ile karakterize edilmiş ve molekül ağırlıkları ve polidispersite indeksleri Jel permeasyon kromatografisi (GPC) ile tespit edilmiştir. Polimerlerin ¹H-NMR analizi Varian 600 Spektrometre ile çözücü olarak CDCl₃ kullanılarak, 600 MHz’de, 90° vuruş genişliğinde, 298,15 °K’de gerçekleştirilmiştir. ATR-FTIR spektroskopisi ölçümleri Perkin-Elmer spektrum BX FT-IR spektrometre ile maksimum 1 cm⁻¹ OPD çözünürlükte, 4000-500 cm⁻¹ aralığında analiz edilmiştir. Blok kopolimerlerin GPC analizleri hidrofobik ve hidrofilik blok için ayrı ayrı iki farklı sistem

ile analiz edilmiştir. Agilent Instrument (Model 1100), THF'nin elüent olarak kullanıldığı düz polistiren standartlarının kalibrasyonu ile PCL polimerin molekül ağırlıkları ve polidispersite indeksinin tayini için kullanılmıştır. ViscoTek TDA 302 GPC ise hidrofilik segment olarak PEtOx'un analizi için kullanılmıştır [183].

2.2.5. Misel Formülasyonlarının Karakterizasyonu

2.2.5.1. PEtOx-*b*-PCL, PEtOx-*ko*-PEI-*b*-PCL Blok Kopolimerleri İle Hazırlanan Miseller ve Misel/Gen Kompleks Formülasyonlarının Partikül Boyutu, Polidispersite İndeks ve Zeta Potansiyel Analizleri

Seçilen iki hidroliz derecesindeki (%30 ve %60) blok kopolimer ve ön formülasyon çalışmaları için sentezi yapılmış hidroliz edilmemiş blok kopolimerler ile hazırlanan boş misel formülasyonları ile pEGFP-BikDD ile kompleksleştirilmiş misel formülasyonlarının partikül büyüklüğü (hidrodinamik çap), zeta potansiyeli ve polidispersite indeksleri(PDI) Dinamik ışık saçılımı (DLS) analiz yöntemi ile tayin edilmiştir. Ölçümler her defasında taze hazırlanan formülasyonlar üzerinden Zetasizer Nano ZS partikül cihazında yapılmıştır (Malvern Instruments, UK). Boyut ve PDI ölçümleri, düşük hacimli (40 µL) tek kullanımlık plastik mikro küvet (Zen 0040) içerisinde, zeta potansiyel ölçümleri ise tek kullanımlık kapiller hücre (DTS 1070) içerisinde yapılmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25 °C, ışık saçılım açısı 173° olacak şekilde ayarlanmıştır [179]. Ultra saf su içerisinde 2 mg/mL konsantrasyonda bulunan taze hazırlanmış örnekler doğrudan, liyofilize örnekler ise ultra saf su içerisinde 2 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde süspande edilerek ölçüm küvetlerine konulmuş ve analizleri yapılmıştır. Farklı N/P oranlarında hazırlanan kompleks formülasyonlar ise 50 µL'de 2 µg ve 4 µg DNA içerecek şekilde ultra saf su ve 10 mM HEPES tamponu içerisinde olduğundan cihazın refraktif indeksi değiştirilerek ölçümler tekrar alınmıştır. Her formülasyonun ölçümü 3 tekrarlı olarak yapılmış olup, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümlerinden elde edilen bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir ($n=3$, $\bar{x} \pm SS$).

2.2.5.2. Kritik Misel Konsantrasyonu ile Misel Oluşumunun Belirlenmesi

Kritik misel konsantrasyonu (KMK), blok kopolimerin misel oluşturabildiği minimum konsantrasyonu belirlemek için kullanılan bir karakterizasyon tekniğidir. Tez çalışmamızda piren'in hidrofobik floresan bir prob olarak kullanıldığı standart tayin yöntemi kullanılmıştır. Piren, suda çözünürlüğü düşük, floresan özellik gösteren, hidrofobik bir molekül olup, kritik misel konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılan hızlı ve hassas bir yöntemdir. Yöntem, misel oluşumu öncesinde sulu çözeltide serbest halde bulunan pirenin, misel oluşumuna bağlı olarak hidrofobik çekirdeğe hapsolması sonucu

çözeltideki floresan yoğunluğunda meydana gelen farklılığın ölçümüne dayanmaktadır [188]. KMK analizi, hidroliz edilmemiş PEtOx-*b*-PCL polimeri ve tez çalışmamızda kullanımına karar verilen iki farklı hidroliz derecesindeki PPP30 ve PPP60 blok kopolimerlerinde gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmamızda KMK tayini için öncelikle pirenin THF içerisinde hazırlanan stok çözeltisinden amber renkli şişelere son konsantrasyonu 6×10^{-7} M olacak şekilde eklenmiş ve çözelti oda sıcaklığında 400 rpm hızında 20 dakika süre ile manyetik karıştırıcı altında karıştırılmıştır. Bu sırada, blok kopolimerin kademeli dilüsyonu ile ultra saf su içerisinde 2 mg/mL ile $1,9 \times 10^{-6}$ mg/mL aralığında değişen 21 farklı konsantrasyonda blok kopolimer çözeltileri hazırlanmıştır. Pirenin içerisinde bulunduğu organik çözücü 30 saniye boyunca azot gazı altında uçurulmuş ve üzerine farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sulu polimer dispersiyonlarından 1 mL eklenerek oda sıcaklığında gece boyunca manyetik karıştırıcı altında karıştırmaya bırakılmıştır [189]. Her ölçüm grubu için blok kopolimer içermeyen piren örneği de hem THF, hem de ultra saf su içerisinde hazırlanmış ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Öncelikle su ve THF içerisindeki pirenin 300–360 nm dalga boyu aralığında floresan eksitasyon spektrumu, 360–460 nm dalga boyunda ise emisyon spektrumu verileri alınmıştır. Sudaki pirenin floresan eksitasyonun maksimum piki 332 nm’de kaydedilmiş olup, organik çözücü ortamında bu pikin 336 nm’ye kaydığı görülmüştür. Emisyon spektrumunda ise en yüksek pik 390 nm’de kaydedilmiştir. Bu nedenle, farklı konsantrasyonlardaki blok kopolimerlerin piren floresan yoğunlukları, iki farklı uyarılma dalga boyunda (eksitasyon: 332 ve 336 nm, emisyon: 390 nm) floresan spektrometre ile analiz edilmiştir (SpektraMax M2, Molecular Devices, USA). Eksitasyon verilerine göre, spektrumlarda, (332 nm) I1 ve (336 nm) I3 nm’lerde elde edilen I3/I1 piklerinin oranlanmasıyla, blok kopolimer çözeltisi içerisindeki pirenin ait konsantrasyon grafikleri çizilmiş ve floresan şiddetindeki ani düşmenin gözlemlendiği derişim ya da başka bir ifade ile I3/I1 oranındaki ani artışın meydana geldiği konsantrasyon KMK olarak belirlenmiştir. Misel oluşumu sırasında çekirdeğe hapsolan pirenin eksitasyon ve emisyon piklerinde azalma görülmekte ve I3/I1 değerinde artış meydana gelmektedir.

2.2.5.3. Misel Oluşumunun Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) Analizi ile Doğrulanması

Tez çalışmamızda, iki farklı hidroliz derecesinde sentezlenen blok kopolimerlerin (PPP30 ve PPP60) misel oluşturma yetenekleri floresan prob yöntemine ek olarak proton nükleer manyetik rezonans ($^1\text{H-NMR}$) yöntemi ile doğrulanmıştır. Blok kopolimer ve aynı blok

kopolimer ile hazırlanan misellere ait spektrumlar karşılaştırılarak, analiz piklerindeki değişiklikler tespit edilmiş ve misel oluşumu doğrulanmıştır [190]. Analizler Varian-Mercury 400 (Agilent Technologies) cihazı ile 400 Mhz, 45° vuruş, ve 298,1 °K (25 °C) sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen misellerin ¹H-NMR analizi öncesinde dayanıklılığını sağlamak amacıyla liyofilizasyonu gerçekleştirmiştir. Analiz sırasında döteryumlu su (D₂O) içerisinde redisperse edilen liyofilize misel örnekleri ve Dötorlenmiş kloroform (CDCl₃) içerisinde çözölen blok kopolimerler, ¹H-NMR analizleri yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

2.2.5.4. Misel/Gen Kompleks Oluşumunun Jel Retardasyon Analizi ile Değerlendirilmesi

PPP30 ve PPP60 miseller ile 0,5'ten 30'a kadar değişen çeşitli N/P oranlarında hazırlanan misel/gen komplekslerinin oluşumları jel retardasyon analizi ile tayin edilmiştir. Bu analiz için, Bölüm 2.2.3.3'de belirtildiği şekilde 8 farklı N/P oranında 50 µL hacimde hazırlanan misel/DNA kompleksleri, 0,2 µg/mL etidyum bromür içeren 1X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) tamponu ile hazırlanan %0,8'lik agaroz jelde 1 saat boyunca 100 V'da Bio-Rad Subcell Elektroforez sistemi ile (Bio-Rad Lab. Inc, US) elektroforeze tabi tutulmuştur.

Jel üzerinde DNA bantlarının görüntölenmesi amacıyla her bir kompleks çözeltisinden jelde 1 µg DNA olacak şekilde 12,5 µL alınarak, 2,4 µL 6X LB örnek boyası ile karıştırılmış ve jel kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez sonrası miseller ile kompleks genin, serbest gene olan jeldeki konumunun görüntölenmesi Kodak Gel Logic 200 görüntöleme sistemi ile yapılmıştır. Jel retardasyon analizi sonrası kompleks oluşturduğu belirlenen N/P oranlarındaki misel formölasyonları, partiköl boyut analizi sonuçları ile birlikte değerlendirilerek, belirlenen optimum iki N/P (20 ve 30) oranında hazırlanan miseller ile stabilite çalışmaları ve morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır.

Ayrıca formölasyonların hücre költürüne uygulanmaları sırasında költür ortamı (DMEM) ile dilölasyonları yapıldığından dolayı, formölasyonların yapılarında herhangi bir değişiklik olup olmadığını belirlemek için költür ortamı içerisinde hazırlanan misel/gen komplekslerinin jel üzerindeki analizleri de yapılmıştır.

2.2.6. Boş Miseller ve Misel/Gen Komplekslerinin Morfolojik Karakterizasyonları

Taze hazırlanmış hidrolize ya da hidrolize olmayan boş misellerin ve seçilen N/P oranlarında BikDD geni ile kompleks misellerin morfolojik karakterizasyonları geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) ile yapılmıştır. Ultra saf su içerisinde bulunan 2 mg/mL konsantrasyondaki boş misel dispersiyonundan ve kompleks formölasyonlarından 10 µL

alınarak herhangi bir boyama yapılmadan karbon kaplı bakır grid üzerine damlatılmış ve çözeltinin buharlaşması için bir gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. TEM görüntüleri Tecnai G² Spirit Biotwin 20–120 kV (FEI, Eindhoven, Netherland) kullanılarak analiz edilmiştir.

2.2.7. Misel/Gen Komplekslerinin Stabilité çalışmaları

2.2.7.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Salım Çalışması

SDS yüksek negatif yüke sahip olduğundan, plazmit DNA ile yer değiştirerek misel/gen kompleksinden genin salınmasına neden olmaktadır. Genin misel kompleksinden salımı için gerekli SDS konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla misel kompleks çözeltisi içerisine hacimce %0,2, %0,5 ve %1 oranında olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda SDS eklenmiştir. Öncelikle, 2 g SDS 100 mL saf su içerisinde çözölmüş ve %2’lik stok SDS çözeltisi hazırlanmıştır. %2’lik SDS çözeltisi ise hacimce 1:1 seyreltilerek %1’lik stok SDS çözeltisi hazırlanmıştır.

SDS salım analizi iki farklı hidroliz derecesindeki blok kopolimer ile hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin, kompleks oluştuğu belirlenen N/P oranları arasından seçilen N/P 20 ve 30 oranları için çalışılmıştır. Son hacimde 0,05 µg/µL gen içeren komplekslere gerekli miktarlarda stok SDS çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir (Çizelge 2.9). İnkübasyon sonrası örnekler iki tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiş ve 1X TAE tamponu ile hazırlanan %0,8’lik agaroz jelde 100 V’da 1 saat boyunca Bio-Rad Subcell Elektroforez sistemi ile (Bio-Rad Lab. Inc, US) elektroforeze tabi tutulmuştur.

Çizelge 2. 9. SDS salım analizi için hazırlanan formölasyonlar

	Toplam hacimdeki SDS konsantrasyonu %0,2 iken formölasyon miktarları	Toplam hacimdeki SDS konsantrasyonu %0,5 iken formölasyon miktarları	Toplam hacimdeki SDS konsantrasyonu%1 iken formölasyon miktarları
Tüm Misel/BikDD gen formölasyonları için	20 µL misel/gen kompleks + (1 µg) BikDD + 5 µL SDS Çözeltisi (%1’lik) Toplam Hacim: 25 µL (1 µg BikDD ile)	30 µL misel/gen kompleks + (2 µg) BikDD + 10 µL SDS Çözeltisi (%2’lik) Toplam Hacim: 40 µL (2 µg BikDD ile)	20 µL misel/gen kompleks + (2 µg) BikDD + 20 µL SDS Çözeltisi (%2’lik) Toplam Hacim: 40 µL (2µg BikDD ile)

2.2.7.2. Misel/Gen Komplekslerinin DNaz-I Nükleaz Stabilite Analizi

Çalışılan iki farklı hidroliz derecesindeki blok kopolimer ile hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin, kompleks oluşturduğu belirlenen N/P 20 ve 30 oranları için DNaz-I nükleaz stabilite analizi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle PPP30 ve PPP60 blok kopolimerleri ile daha önce Bölüm 2.2.3.2’de belirtildiği şekilde boş miseller hazırlanmış ve 20 µL son hacimde Çizelge 2.10’da verilen oranlarda kompleksler oluşturulmuştur.

Çizelge 2. 10. DNaz-I nükleaz stabilite analizi için hazırlanan formülasyonlar

Formülasyon Kodu	N/P Oranı	
	N/P20	N/P30
PPP30	10 µL’de 1 µg BikDD	10 µL’de 1 µg BikDD
	10 µL’de 20 µg PPP30	10 µL’de 30 µg PPP30
PPP60	10 µL’de 1 µg BikDD	10 µL’de 1 µg BikDD
	10 µL’de 10 µg PPP60	10 µL’de 15 µg PPP60

Misel/gen komplekslerinin nükleaz stabilitesi, komplekslerin DNaz-I ile belirli koşullarda inkübasyonu sonrası tayin edilmiştir. Bunun için, misel/gen kompleks oluşumunu takiben 1 µg BikDD geni içeren kompleksler üzerine 1X Reaksiyon tamponu içerisinde bulunan DNaz-I enzim çözeltisinden 1U (Ünite) (5 µL) eklenmiş ve 37°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DNaz-I aktivitesini inhibe etmek amacıyla formülasyon çözeltisine 0,125 M stok EDTA (pH 8,0) çözeltisinden son hacimde 5 mM olacak şekilde 1 µL eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir [191]. Bu işlemi takiben kompleksten genin salımını sağlamak amacıyla SDS salım çalışması ile belirlenen uygun konsantrasyondaki SDS çözeltiye eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada kontrol olarak, aynı miktarda serbest (çıplak) BikDD geni, DNaz-I enzimi ile muamele edilmiş ve aynı işlemlere tabi tutulmuştur. Ayrıca DNaz-I uygulanmamış çıplak BikDD geni pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm basamaklar sonrasında her bir kuyucukta 500 ng DNA olacak şekilde jele 20 µL yüklenen örnekler %0,8’lik agaroz jelde 100 V’da 1 saat boyunca Bio-Rad Subcell sistemi ile elektroforeze tabi tutulmuş ve bant profilleri kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilerek komplekslerin nükleaz dayanıklılıkları tayin edilmiştir.

2.2.7.3. Misel/Gen Komplekslerinin Serum Stabilite Analizleri

Taşıyıcı sistemlerin hücrelerde maksimum etkinlik sergileyebilmesi için serum bileşenlerine karşı dayanıklı olması gerekmektedir. Bu kapsamda, BikDD ile kompleks misel formülasyonlarının serum stabiliteyi, PPP30 misel/gen ve PPP60 misel/gen

kompleksleri ile belirlenen N/P (20 ve 30) oranlarındaki formülasyonlar ile heparin yer değiştirme yöntemine göre tayin edilmiştir [192]. Öncelikle 10 mg heparin 1 mL suda çözülerek, 1000 U/mL olacak şekilde heparin sodyum çözeltisi hazırlanmıştır. 4 µg BikDD içeren, 50 µL hacimdeki N/P 20 ve 30 oranlarındaki PPP30 misel/BikDD gen ve PPP60 misel/BikDD gen kompleksleri %10 FBS içeren DMEM ile eşit hacimde karıştırılarak 37°C’de belirli sürelerde (1/2, 1, 2, 4, 24 ve 48 saatlerde) inkübe edilmiştir. Kontrol olarak 4 µg çıplak BikDD geni aynı şekilde FBS içeren kültür ortamı ile muamele edilmiştir. Her bir zaman noktasının sonunda örnekler içerisinden 15 µL alınarak üzerlerine serum aktivitesini durdurmak amacıyla 1 µL 0,5 M EDTA eklenmiş ve 60 °C’de 30 saniye ile 1 dakika arasında inkübe edilmiştir. Tüm zaman noktaları için örnek alımı tamamlanana kadar örnekler -20°C’de saklanmıştır. 48 saat sonunda misel/gen kompleksinden genin ayrılmasını sağlamak amacıyla, örnekler üzerine 1 µL Heparin (ağırlıkça %1 oranında) çözeltisi eklenerek, oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnekler %0,8’lik agaroz jelde 1 saat süre ile 100 V’da elektroforeze tabi tutulmuştur. Jel görüntüleri Kodak Gel Logic 200 görüntüleme sistemi ile analiz edilmiştir.

2.2.7.4. Misel/Gen Komplekslerinin Kolloidal Stabilite Analizleri

Misel/Gen komplekslerinin +4°C’deki, 1 aylık kısa dönemde belirli zaman aralıklarındaki (0, 1, 3, 7 ve 30 gün) stabiliteleri HEPES tampon çözeltisi içerisinde (10 mM, pH 7,4) dinamik ışık saçılım yöntemi ile tayin edilmiştir. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25 °C, ışık saçılım açısı 173° olacak şekilde ayarlanmış ve her bir ölçüm üç tekrarlı olarak gerçekleştirilerek, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümlerinden elde edilen bulgular ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

Ayrıca misel/gen komplekslerinin kolloidal stabiliteleri 37°C’de, belirlenen zaman aralıklarında (0, 1, 4, 24, ve 48 saat) dinamik ışık saçılımı yöntemi ile tayin edilmiştir. Bunun için 2 farklı hidroliz derecesinde N/P 20 ve N/P 30 oranlarındaki kompleks misel formülasyonları HEPES tamponu (10 mM, pH 7,4) içerisinde hazırlanmış ve partikül boyutu, zeta potansiyel ve polidispersite indeksleri açısından kolloidal stabiliteleri değerlendirilmiştir (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

2.2.7.5. PPP30 ve PPP60 Misellere Yüklü BikDD Geninin Stabilite Çalışmaları

Elektrostatik olarak miseller ile kompleksleştirme işleminin ardından 24 ve 48 saat sonunda BikDD’nin kompleksteki stabilitesini belirlemek ve yapısında herhangi bir değişiklik olup olmadığını tayin etmek amacıyla agaroz jel elektroforez ile analizi yapılmıştır. Bunun için her bir kuyucukta 500 ng DNA olacak şekilde jelle 20 µL yüklenen

tüm örnekler 1XTAE içerisinde hazırlanan %0,8'lik agaroz jelde 100 V'da 1 saat boyunca Bio-Rad Subcell sistemi ile elektroforeze tabi tutulmuş ve Kodak Gel Logic 200 görüntüleme sistemi ile analiz görüntülenmiştir.

2.2.8. Misel Formülasyonlarının Sterilizasyonu

In vitro hücre kültürü çalışmalarına uygulanacak tüm formülasyonların kontaminasyona yol açmaması için steril olması gerekmektedir. Misellerin sterilizasyonunda en sık kullanılan yöntemlerden biri 0,22 µm'lik rejenere selüloz şırınga ucu membran steril filtreler ile yapılan aseptik filtrasyondur. Ancak kompleks oluşumu gerçekleştirildikten sonra sterilizasyon amaçlı yapılacak herhangi bir süzme işlemi filtrede tutulmalara yol açacağından dolayı tercih edilmemektedir. Bu nedenle misel/gen kompleksleri hazırlanmadan önce geliştirilen boş miseller süzülerek, süzmedeki kayıp hesaplanmış ve doğru N/P oranı buna göre belirlendikten sonra BikDD geni ile kompleksleştirilmiştir.

Ayrıca kompleksleşme işlemi öncesi boş misellerin üretimi ve dilüsyonları ile genetik materyalin dilüsyonları ve kompleksleştirme işlemleri aseptik koşullar altında laminar kabinde yapılmıştır. Gen ekspresyon çalışmaları ekstra hassasiyet gerektirdiğinden dolayı, hücre kültür çalışmalarında kullanılan pipet uçları gibi malzemeler DEPC-muamele edilmiş solüsyon ile bir gece boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiş, ertesi gün DEPC'nin yıkımı için 121° C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.2.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışmamız kapsamındaki *in vitro* hücre kültür deneyleri, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda Prof. Dr. Güneş Esendağlı önderliğinde yürütülmüştür. Çalışmada meme kanserinin BikDD geni ile apoptotik gen tedavisi hedeflendiğinden dolayı, MCF-7 ve MDA-MB-468 olmak üzere iki farklı insan meme kanseri adenokarsinoma hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri yüksek glikoz Dulbecco's modifiye Eagle's medium (DMEM), MDA-MB-468 hücreleri ise düşük glikoz DMEM ortamında büyütülmüştür. Boş misel formülasyonların hücresel biyouyumlulukları ise sağlıklı fare fibroblast hücre hattında (L929) DMEM-F12 ortamında gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları içerisinde yer alan hücre transfeksiyon ve ekspresyon analizleri, her bir PPP30 ve PPP60 miseller için 4 farklı N/P oranları (8, 10, 20 ve 30) ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.9.1. Hücre Canlılığı Çalışmaları

Boş misel formülasyonlarının biyoyoumluluğu ve kanser hücrelerindeki *in vitro* sitotoksiteleri iki farklı hücre canlılık analizi ile değerlendirilmiştir. Bunlardan bir tanesi pek çok çalışmada sıklıkla kullanılan geleneksel bir kolorimetrik/spektrofotometrik yöntem olan metil-tiyazol-tetrazolyum (MTT), ikincisi ise flow sitometre ile ölçüme dayalı bir gerçek zamanlı canlılık analizi olan DRAQ-7 yöntemidir.

2.2.9.1.1. MTT Analizi ile Boş Misellerin L929 Hücrelerindeki Hücresel Biyoyoumluluğunun Değerlendirilmesi

Tez çalışmamızda boş misel formülasyonlarının sağlıklı hücrelerdeki biyoyoumluluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla iki farklı hidroliz derecesinde PEtOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimerleri (PPP30 ve PPP60) ile farklı N/P oranlarında hazırlanan boş misellerin L929 sağlıklı fare fibroblast hücre hattındaki hücresel biyoyoumlulukları geleneksel bir canlılık testi olan MTT toksisite analizi ile değerlendirilmiştir. Hidroliz derecesi ve buna bağlı olarak polimer omurgasındaki PEI blok uzunluğu değişiminin biyoyoumluluk üzerindeki etkisini tayin etmek amaçlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında *in vitro* transfeksiyon ve gen ekspresyon çalışmaları için optimum misel/DNA kompleksini belirlemek amacıyla farklı N/P oranlarındaki formülasyonlar ile çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle boş misellerin toksik olmayan dozunu belirlemek amacıyla her bir N/P oranı için gerekli polimer konsantrasyonu ve bu konsantrasyonun 3 farklı dilüsyonu hazırlanmış (Çizelge 2.11 ve 2.12) ve hücrelerdeki etkisi değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.11. Hücre canlılık analizlerinde kullanılan PPP30 blok kopolimer konsantrasyonları ve dilüsyon oranları

N/P oranı (50 µL hacimde)	Dilüsyon oranı			
	1	1:2	1:4	1:8
N/P 8	32µg	16 µg	8 µg	4 µg
N/P 10	40 µg	20 µg	10 µg	5 µg
N/P 20	80 µg	40 µg	20 µg	10 µg
N/P 30	120 µg	60 µg	30 µg	15 µg

Çizelge 2.12. Hücre canlılık analizlerinde kullanılan PPP60 blok kopolimer konsantrasyonları ve dilüsyon oranları

N/P oranı (50 µL hacimde)	Dilüsyon oranı			
	1	1:2	1:4	1:8
N/P 8	16 µg	8 µg	4 µg	2 µg
N/P 10	20 µg	10 µg	5 µg	2,5 µg
N/P 20	40 µg	20 µg	10 µg	5 µg
N/P 30	60 µg	30 µg	15 µg	7,5 µg

L929 hücreleri, %10 ısı-inaktif fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin(pen-strept) içeren DMEM F-12 kültür ortamında 37°C’de, %5 CO₂ içeren ortamda çoğaltılmıştır. Hücreler öncelikle T-25’lik flaskta büyütölmüş, sonrasında ise T-75’lik flaskta aktararak çoğaltımı yapılmıştır. Hücreler % 80 konfluense ulaştığında 1X Tripsin EDTA (%0,05) (TE) çözeltisi ile flasktan kaldırılarak pasajlanmıştır. Canlılık analizinde kullanılacak hücre sayısını tespit etmek için hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı tripan mavisi yöntemine göre, ölü hücrelerin boyanmasını takiben mikroskop altında toma lamı ile sayılarak belirlenmiştir. Hücre sayımı sonucunda belirlenen miktarlarda alınan kültür ortamı içerisindeki hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu plaklara 15000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 50 µL hacimde ekilmiştir.

Misel/gen komplekslerinin hücresel ortama uyum sağlayabilmeleri göz önünde bulundurularak HEPES tamponu içerisinde hazırlandığından (10 mM, pH 7,4), tampon çözeltinin hücresel biyouyumluluk üzerindeki etkisini tayin etmek amacıyla komplekslerin dilüsyonları yine bu tampon ile yapılmıştır. Ayrıca hazırlanan komplekslerin serum içermeyen hücre kültür ortamı ile dilüsyonları da yapılarak PPP30 ve PPP60 misel formölasyonlarının her biri için kompleks oluşturduğu jel reterdasyon ve partiköl boyut analizlerine göre daha önce belirtildiğı üzere, 4 farklı N/P oranı çalışılmıştır. Her bir N/P oranı için gerekli polimer konsantrasyonu üzerinden 1:2, 1:4 ve 1:8 oranında hazırlanan 50 µL hacmindeki dilüsyonları, 50 µL kültür ortamı içerisindeki hücreler üzerine uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak formölasyonların hazırlandığı ve aynı hacimde dilüe edildiğı HEPES tamponu ve serum içermeyen kültür ortamı (formölasyon uygulanmamış hücreler) da kuyucuklara uygulanmıştır.

24 ve 48 saat inkübasyon süreleri sonunda plakalar içindeki ortam uzaklaştırılmadan her bir kuyucuğa 25 µl MTT eklenerek 4 saat süre ile 37°C’de inkübe edilmiştir. 4 saat sonunda, hücrelerde oluşan formazan kristalleri SDS (%23) ve N,N-dimetil formamid (DMF) (%45) içeren 80 µl lizis tamponu ile 37°C’de gece boyunca inkübe edilerek kristaller çözülmüştür. Hücre canlılığı, 570 nm dalga boyunda otomatik mikropilaka okuyucuda hücrelerin OD değerine göre aşağıda verilen formül üzerinden tayin edilmiştir. Deneyler üç kez tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilmiştir($n=3$, $\bar{x} \pm SS$).

Hücre canlılığı (%): (Formülasyon uygulanmış kuyucukların OD değeri/Kontrol grubu hücrelerin OD değeri) $\times 100$

2.2.9.1.2. Boş Miseller ve pEGFP-BikDD Yüklü Misellerin MCF-7 ve MDA-MB-468 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin DRAQ-7™ Yöntemi ile Analizi

Belirlenen 4 farklı N/P oranındaki pEGFP-BikDD yüklü miseller ve kontrol grubu olarak aynı N/P oranlarında hazırlanan boş misellerin (gen içermeyen) MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücreleri üzerindeki 48 saatlik canlılık analizi yeni bir hücre canlılık boyası olan DRAQ-7 ile flow sitometre analizine göre tayin edilmiştir. %10 FBS içeren DMEM ortamında çoğaltılan MCF-7 ve MDA-MB-468 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 750 µL hacimde ekilmiş ve bir gece 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür ortamı, eşit hacimde, taze, serum içermeyen ortam ile değiştirilmiştir. Serum içermeyen kültür ortamı içerisinde 50 µL hacimde hazırlanan 4 µg pEGFP-BikDD gen yüklü miseller ve gen içermeyen boş misel formülasyonları her bir kuyucuğa eklenmiş ve 4 saat süre ile 37°C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında transfeksiyon prosedürünün hücre canlılığı üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için her bir kuyucuğa toplam hacmin %10’u FBS, %1’i penstrept ve %0,5 L-glutamin eklenerek 44 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, hücreler tripsinize edilmiş ve 70 µm çapındaki hücre membran filtreleri (Fisher Scientific, USA) ile filtrelenmiştir. Hücre süspansiyonu 5 dakika 1800 rpm’de 4 °C santrifüjlendikten sonra, süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet PBS içerisinde süspande edilmiştir. Sonrasında hücre süspansiyonu 1 µL DRAQ-7 hücre canlılık boyası ile karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Süspansiyon, flow sitometre (633 nm eksitasyon, 660 nm emisyon) ile analiz edilmiştir (FACS Aria II, Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Her örnek için 1×10^4 hücre analiz edilmiş olup, formülasyon uygulanmamış sadece hücre kültür ortamı ile inkübe edilmiş DRAQ-7 negatif hücreler canlı hücrelerin yüzdesini tayin

etmek için kullanılmıştır. Her deney grubunda, hücre kaynaklı otofloresan, DRAQ-7 uygulanmamış hücreler kullanılarak düzeltilmiştir. Tüm analizler üç tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçlar üç tekrarın ortalaması $\pm$ standart sapması şeklinde ifade edilmiştir.

2.2.9.2. Misel/pEGFP-BikDD Gen Komplekslerinin MCF-7 ve MDA-MB-468 Hücrelerine *in vitro* Transfeksiyonu

Terapötik BikDD geni taşıyan pEGFP-BikDD plazmidin MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarına *in vitro* transfeksiyonu her iki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin 4 farklı N/P oranlarındaki etkinlikleri flow sitometre analizi ile tayin edilmiştir. Sitotoksikite çalışmaları sonucunda toksik olmayan minimum misel konsantrasyonu ve formülasyonların dilüe edildiği ortam (HEPES ya da hücre kültür ortamı) belirlenerek, transfeksiyon çalışmaları bu kriterlere göre optimize edilmiştir.

Ayrıca serumun *in vitro* transfeksiyon etkinliği üzerine etkisini tayin etmek amacıyla transfeksiyon çalışmaları serum içeren ve içermeyen olmak üzere iki farklı kültür ortamında inkübe edilen hücreler ile gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda, MCF-7 ve MDA-MB-468 hücreleri her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakalara %10 FBS içeren 750 μ L hücre kültür ortamı içerisinde ekilmiş ve 37 °C’de %5 CO₂ içeren ortamda gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün, hücre kültür ortamı, iki ayrı deney grubu olarak %10 serum içermeyen 750 μ L taze kültür ortamı ve %10 serum içeren 750 μ L taze kültür ortamı ile değiştirilmiştir. Farklı N/P oranlarında hazırlanan pEGFP-BikDD içeren PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin transfeksiyon etkinliği, aynı oranlarda hazırlanan gen taşımayan boş pEGFP-C3 plazmit içeren misel/DNA kompleksleri ile transfeksiyon etkinlikleri açısından karşılaştırılmıştır. Bunun için, 50 μ L hacimde 4 μ g pEGFP-C3 plazmit DNA ve pEGFP-BikDD içerecek şekilde 4 farklı N/P oranında hazırlanan PPP 30 ve PPP 60 misel/plazmit DNA-BikDD gen kompleksleri, %10 serum içeren ve serum içermeyen olmak üzere iki farklı kültür ortamında inkübe edilen hücrelere uygulanmış ve 4 saat süre ile 37°C’de inkübe edilmiştir. Serum içermeyen hücrelere 4 saat sonunda hacimce %10 FBS, %1 Penstrept ve %0,5 L-glutamin eklenmiş ve 44 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. Serum ortamındaki hücreler ise doğrudan 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler daha önce açıklandığı şekilde, 1X TE ile kaldırılmış, filtrelenmiş ve PBS içerisinde süspande edilmiştir. Sonrasında hücre süspansiyonuna 1 μ L DRAQ-7 hücre canlılık boyası ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. Süspansiyon, flow sitometre cihazında GFP ekspresyonu ve DRAQ-7’nin tayini için

sırasıyla FITC ve APC kanalı açık olacak şekilde, GFP'nin 488 nm eksitasyon ve 525 nm emisyonunda, 1×10^4 hücre sayılarak analiz edilmiştir (BD FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). Analiz sonuçları GFP'nin reporter gen özelliğinden faydalanarak, popülasyondaki floresan ışıma yapan hücrelerin yüzdesi (GFP+) ve medyan floresan yoğunluğu (MFI) ölçülerek GFP ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ile değerlendirilmiştir. Miseller ile kompleks oluşturmamış çıplak pEGFP-C3 plazmit DNA, pEGFP-BikDD geni ve formülasyon uygulanmamış hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

2.2.9.3. Flow Sitometre Analizi ile Geç Apoptozise Bağlı Ölümün Değerlendirilmesi

DRAQ-7™ canlı (hücre bütünlüğü bozulmamış), hücre geçirgenliği olmayan hücrelerin yeni bir canlılık tayin boyasıdır. Bu görevini, canlılığını kaybetmiş hücrelerin membran geçirgenliğinden yararlanarak, nükleusa ulaşması ve DNA'yı işaretlemesi ile gerçekleştirmektedir. Bu nedenle hücre membran permeabilizasyonu, apoptoz ve nekroz çalışmalarında ölü hücrelerin belirteci olarak işlev görmektedir. Tez çalışmamızda, DRAQ-7'in bu özelliği BikDD geninin transfeksiyonu sonucu, geç apoptoza bağlı hücre ölümünün tayin edilmesi için kullanılmış olup, PPP30 ve PPP60 misel/gen kompleksleri ile muamele edilen hücrelerin apoptotik ölüm oranındaki artışa bağlı olarak formülasyonların başarısı ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bunun için pEGFP-BikDD ile kompleks miseller, Bölüm 2.2.9.2 transfeksiyon çalışmalarında belirtildiği üzere MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerine uygulanmış ve transfeksiyon sonunda flow sitometre ile analiz edilmiştir. Analiz sırasında sadece GFP eksprese eden (GFP+) hücreler içerisinde DRAQ-7 pozitif hücrelerin yüzdesi, P10 alanın çizilmesi ile belirlenmiştir. Bu alan içerisinde kalan hücreler geç apoptozise bağlı ölümün meydana geldiği hücreleri ifade etmektedir. BikDD geninin apoptozise bağlı ölüm etkinliğini, pEGFP-C3 plazmit DNA ile hazırlanan kompleks misellerin etkinliğinin karşılaştırılması ile ortaya konulmuştur.

2.2.9.4. Floresan Mikroskop Yöntemi ile *in vitro* GFP Ekspresyonunun Tayin Edilmesi

GFP ekspresyonu, miseller ile pEGFP-BikDD geninin hücrelere aktarımı sonrası doğrudan floresan ışıma yapan hücrelerin Leica DMIL (Leica Microsystems) inverted floresan mikroskop ile görüntülenmesi sonucu tayin edilmiştir. Bunun için MCF-7 ve MDA-MB-468 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 750 μ L serum içeren kültür ortamı içinde ekilmiş ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, kültür ortamı serum içermeyen taze kültür ortamı ile değiştirilmiştir. *In vitro* transfeksiyon analiz sonuçlarına göre maksimum transfeksiyon etkinliği gösteren N/P 20 ve N/P 30 oranlarındaki serum içermeyen kültür ortamında hazırlanan 50 μ L

hacimde 4 µg pEGFP-BikDD içeren PPP60 misel/gen formülasyonları ile hücreler 4 saat boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyuya gerekli miktarlarda serum ve antibiyotik eklenmiş ve tekrar 44 saat boyunca inkübe edilmiştir. Tüm işlemler sonunda hücre kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücre çekirdeği DAPI ile aşağıdaki protokole göre boyanarak hücrelerin fikse edilmesi sağlanmış ve ışığa yapan GFP pozitif (GFP+) hücreler inverted mikroskop altında görüntülenmiştir. Formülasyon uygulanmamış, yalnızca aynı konsantrasyonda pEGFP-BikDD ile muamele edilmiş hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca, elde edilen bulgular Ulusal Sağlık Enstitüsü NIH, ABD tarafından geliştirilen Image J yazılımı kullanılarak kantitatif analiz sonuçları ile desteklenmiştir.

DAPI protokolü

-Kültür ortamı uzaklaştırılmış hücrelerin üzerine 750 µL PBS eklenerek yıkama yapılmıştır. Bu işlem iki kez gerçekleştirilmiştir.

-Hücrelerin üzerine 750 µL %4'lük formaldehit çözeltisi eklenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

-Formaldehit çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra, 750 µL %0,1'lik Triton X-100 çözeltisi eklenmiş ve 5 dakikadan daha az bir süre inkübe edilmiştir.

-Triton X-100'ün uzaklaştırılmasını takiben 2 kez 5'er dakikalık sürelerde PBS ile yıkama yapılmış ve hücreler 600 µL DAPI solüsyonu (1:400 PBS ile seyreltilen) ile 20–30 dakika boyunca muamele edilmiştir.

-DAPI'nin uzaklaştırılmasını takiben 3 kez PBS ile yıkama yapılmış ve hücre yüzeyini kaplayacak kadar gliserol eklenerek hücrelerin fiksasyonu tamamlanarak inverted floresan mikroskopunda görüntüleme yapılmıştır. İşlem sırasında hücrelerin plakalardan kalkmasını önlemek adına, her bir adımda kullanılan çözelti ve kimyasalların hücreler üzerine damla damla eklenmesine dikkat edilmiştir.

2.3. İstatistiksel Analizler ve Jel analizleri

Veriler, üç bağımsız deneyin ortalamasının ortalama $\pm$ standart sapması (SS) şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel analizler tek/iki yönlü ANOVA analizi ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak GraphPad Prizma 6 (GraphPad Software Inc., CA, USA) ile değerlendirilmiş ve * $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca tez çalışmaları sırasındaki jel elektroforez ve floresan görüntülerinin kantitatif analizleri, Image J (NIH, ABD) programı ile değerlendirilmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Genetik Materyalin Elde Edilmesine Yönelik Sonuçlar

3.1.1. pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD Plazmitlerinin Safılık ve Konsantrasyonu

Kanamisin direnç geni taşıyan pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD plazmitleri başarılı bir şekilde kanamisin içeren besiyerinde büyütülen *E.coli* DH5α bakterisine transforme edilmiş ve izolasyon için tek koloniler belirlenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. pEGFP-BikDD ile transforme edilmiş *E.coli* DH5α bakteri hücrelerine ait tek koloni görüntüleri

Şekilde görüldüğü üzere kanamisin antibiyotik içeren besiyerinde sadece transgen taşıyan bakteriler tek koloni halinde çoğalabilmiş ve başarılı bir şekilde koloni tespit edilmiştir. Tek kolonilerden Bölüm 2.2.1.2.4’de verilen üretici protokolüne göre, plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD plazmit DNA’ların miktar tayinleri ve saflıkları nanodrop cihazı (Nanodrop 2000, Thermo scientific) ile ölçülmüş ve ölçüm sonuçlarına ait bulgular Çizelge 3.1’de verilmiştir.

DNA üzerindeki aromatik bazlar 260 nm dalga boyundaki ışığı absorbe edebildiğinden DNA konsantrasyonu bu absorbansa dayalı olarak ölçülmektedir. Optik dansite (OD) olarak da ifade edilen bu değer çift zincirli bir DNA molekülü için 50 µg/mL’de 1 OD’ye denk gelmektedir. Buna göre nükleik asit konsantrasyonu DNA (µg/mL)=A₂₆₀ x seyreltme oranı x 50 formülü ile hesaplanmaktadır [193].

Çizelge 3. 1. pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD plazmitlerine ait saflık ve konsantrasyonlar

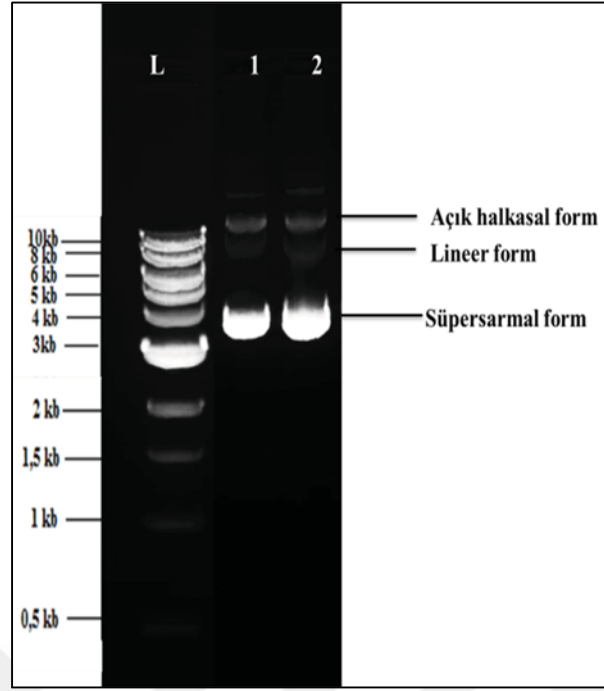
Plazmit	Nükleik asit konsantrasyonu (ng / μ L)	A260	A280	260/280
pEGFP-C3	1968,4	39,368	20,904	1,88
pEGFP-C3	1898,3	37,966	20,143	1,88
pEGFP-C3	1909,9	38,197	20,405	1,87
pEGFP-BikDD	2007,2	40,144	21,080	1,90
pEGFP-BikDD	2104,6	42,092	22,353	1,88
pEGFP-BikDD	1426,3	28,525	15,122	1,89

Çizelge 3.1’de görüldüğü üzere, nükleik asitlerin konsantrasyonları en düşük 1426 ng/ μ L en yüksek 2104 ng/ μ L olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar, vektörlerin bakterideki çoğaltımı ile yüksek konsantrasyonda DNA elde edildiğini ortaya koymuştur.

DNA miktarı 260 nm’de ölçülen absorbans üzerinden, proteinler ve RNA için ise 280 nm’de ölçülen absorbans üzerinden hesaplanmaktadır. Bu nedenle izole edilen DNA’nın protein ve RNA ile kontamine olmadığını ve saflığını belirlemek amacıyla A_{260}/A_{280} nm’deki absorbans değeri tayin edilmelidir. Saf bir DNA molekülü için A_{260}/A_{280} oranının 1,8’in üzerinde olması gerekmektedir [193]. Tablo 3.1’de görüldüğü üzere pEGFP-BikDD plazmidi için A_{260}/A_{280} oranı, 1,88–1,90 arasında, pEGFP-C3 plazmidi için bu oran 1,87–1,88 olarak tespit edilmiş ve literatür bulguları ile uyumluluk göstermiştir. Elde edilen sonuçlar her iki pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD plazmit DNA’nın yüksek saflıkta olduğunu ve RNA ya da protein kontaminasyonu olmadığını göstermektedir.

3.1.2. pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD Plazmitlerinin Boyutlarına İlişkin Sonuçlar

pEGFP-C3 plazmidi 4,7 kb, BikDD geni sokulmuş pEGFP plazmidi ise 5,2 kb büyüklüğünde olup *E.coli* hücrelerinde çoğaltıldıktan sonra izolasyonu takiben plazmitleri doğrulamak amacıyla agaroz jel elektroforezinde DNA standardı ile birlikte yürütülmüştür. DNA standardı, referans olarak değerlendirilerek izole edilen pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD plazmit DNA bantlarının boyutları tespit edilmiş ve elektroforez görüntüsü Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3. 2. %1 agaroz jelde 100 V'da yürütülen 1 µg plazmit DNA'lara ait agaroz jel görüntüsü (L: Standart DNA, 1 numaralı kuyucuk pEGFP-BikDD, 2 numaralı kuyucuk pEGFP-C3 plazmidini temsil etmektedir)

Jel görüntüsünde, 2 numaralı kuyuda bulunan pEGFP-C3 plazmidi jel üzerinde az bir miktar önde yürümüş ve DNA standardı ile kıyaslanarak yaklaşık 4,7 kb olduğu doğrulanmıştır. pEGFP-C3 plazmidine sokulan BikDD 481 baz çifti (bç) olup toplam 5,2 kb boyutu ile pEGFP-BikDD plazmidinin DNA standardı üzerinden yapılan hesaplar ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, *E.coli* DH5α bakterisinde genin başarılı bir şekilde çoğaltıldığını ve izole edildiğini ortaya koymuştur. Jel görüntüsünde görüldüğü üzere plazmidin süper sarmal formu, açık halkasal forma göre yüksek bant parlaklığı gösterdiğinden daha fazla oranda bulunmaktadır. Bu bulgu literatürdeki, bakteri hücrelerinde plazmidin doğal yapıda süper sarmal formun çok daha fazla olduğu bilgisini doğrulamaktadır [194]. Araştırmacılar, süper sarmal formun fazla bulunması ile daha düşük partikül boyutunda taşıyıcı sistem hazırlanabildiğini ve bu form ile hazırlanan taşıyıcı sistemlerin gen aktarımında yüksek etkinlik elde edildiğini belirtmişlerdir [195]. Bu durum, tez çalışmamızda taşıyıcı sistemin yüksek gen aktarım etkinliği gösterebileceğini desteklemektedir. DNA'nın jel üzerindeki yürüme hızı DNA'nın boyutu ve konformasyonuna bağlıdır. Süpersarmal formdaki DNA katlanma miktarının fazla olmasından dolayı düşük boyut sergilediğinden, diğer formlara göre daha hızlı hareket etmektedir [194]. Şekil 3,2'deki jel görüntüsünde, aynı büyüklükte ancak 3 farklı konformasyonda plazmit DNA bant profili görüntülenmiş olup, en hızlı yürüyen bant,

plazmidin süper sarmal formunu, orta derecede olan lineer formunu ve en geride olan ise açık halkasal DNA formunu ifade etmektedir. Bant modellerinde gözlenen lineer form plazmit DNA'nın asıl boyutunu ifade etmektedir. Ayrıca, plazmidlerin bakteride çoğaltımı sırasında prosedürden kaynaklı bazı multimer DNA yapıları gözlenmiş ve yüksek boyutundan dolayı jelin gerisinde görüntülenmiştir.

3.2. PEtOx-*b*-PCL ve PEtOx-*ko*-PEI-*b*-PCL Blok Kopolimerlerinin Sentez Çalışmalarına Ait Sonuçlar

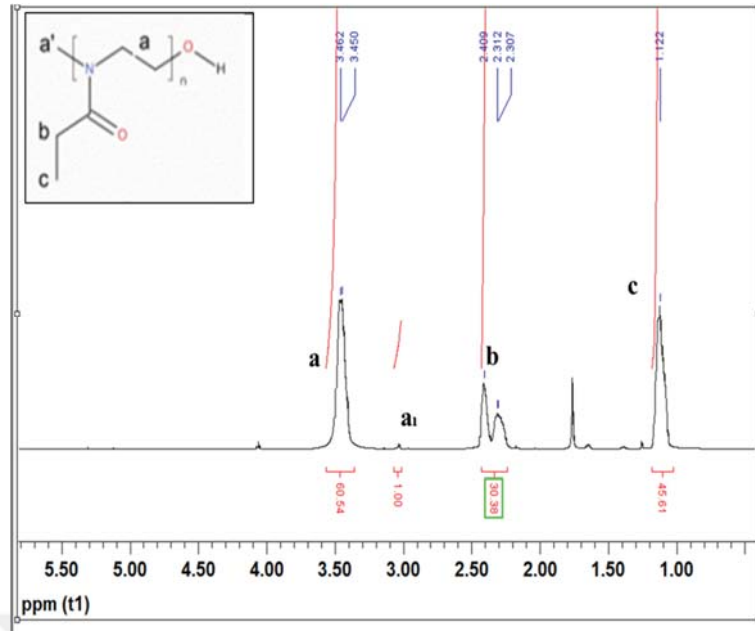
3.2.1. PEtOx-*b*-PCL Blok Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Tez çalışmamızda, daha önce belirtildiği üzere TÜBİTAK-MAM Malzeme Enstitüsü ekibi tarafından farklı moleküler ağırlık ve blok uzunluklarında PEtOx-*b*-PCL blok kopolimerleri sentezlenmiş ve misel oluşumu için ideal özelliklere sahip blok kopolimer seçilerek, bu polimerin sentezi çeşitli karakterizasyon yöntemleri ile doğrulanmıştır.

Bölüm 2.2.2'de belirtildiği üzere 8 farklı hidrofilik:hidrofobik oranda sentezlenen blok kopolimerler arasından en uygun partikül boyutuna sahip boş misel formülasyonu PEtOx₍₁₀₇₀₀₎₍₁₁₃₀₀₎-*b*-PCL₂₁₀₀ blok kopolimeri ile elde edildiğinden dolayı sonraki çalışmalarda bu polimer ile devam edilmesine karar verilmiştir. Aşağıda bu blok kopolimere ait karakterizasyon bilgileri verilmiştir. İleriki bölümlerde uygun blok kopolimerin seçimi için belirtilen farklı hidrofilik:hidrofobik blok kopolimerler ile hazırlanan misellerin partikül boyutu analizlerine ait sonuçlar tartışılacaktır.

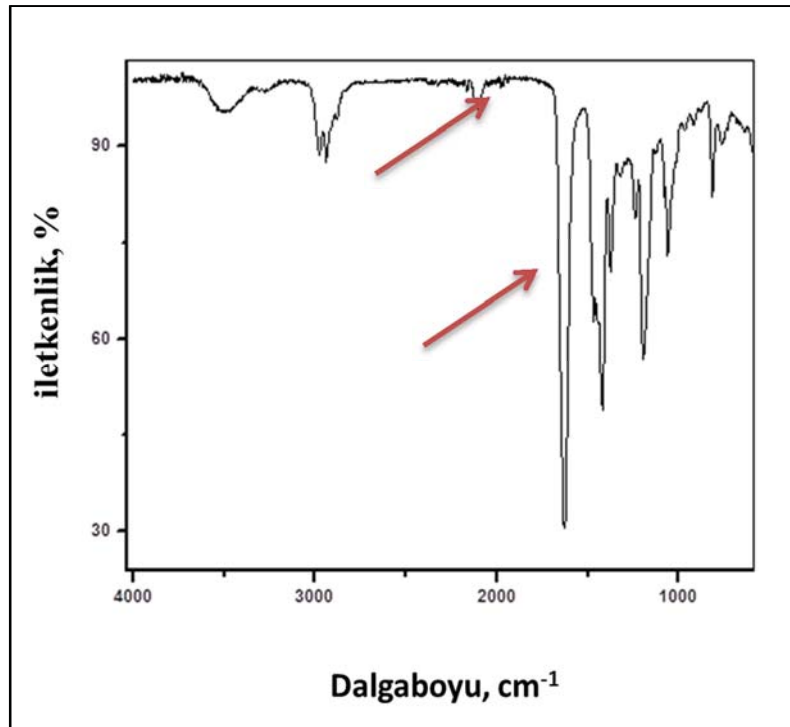
PEtOx-*b*-PCL blok kopolimeri birkaç reaksiyon basamağında sentezlenmiştir. Öncelikle metil p-toluen-sülfonat (MeTos)'ın başlatıcılığında 2-etil-2-oksazolin (EtOx) monomerlerinin canlı halka açma polimerizasyonu ile PEtOx sentezi yapılmış ve reaksiyon sodyum azid ile sonlandırılarak azid uçlu PEtOx-N₃ üretilmiştir. 2-etil-2-oksazolinin canlı halka açma reaksiyonu ile sentezlenen PEtOx-N₃ için GPC, ¹H-NMR ve FTIR sonuçları aşağıdaki gibi elde edilmiştir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).

M_n, GPC = 10700 Da; M_w, GPC = 12200 Da; polidispersite indeksi (PDI) = 1.14. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 3.5–3.3 (4H, –N–CH₂–CH₂–), 3.0–2.9 (3H, CH₃–N–CH₂–CH₂–N–), 2.4–2.2 (2H, –N–CO–CH₂–CH₃), 1.1–0.9 (3H, –N–CO–CH₂–CH₃). FT-IR (ATR): ν [cm⁻¹] 2100 (azid) ve 1630 (karbonil).



Şekil 3. 3. PEtOx polimerine ait ¹H-NMR spektrumu

¹H-NMR spektrumunda görülen 1.1 ppm, 2.3-2.4 ve 3.4 ppm'deki pikler metil ($\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--C=O--}$), metilen ($\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--C=O--}$) ve ($\text{--N--CH}_2\text{--CH}_2\text{--N--}$) tekrar eden ünitelerin protonlarını gösterirken, 3.0 ppm'deki pik, başlatıcının metil protonlarını göstermektedir bu sonuçlar benzer yapıda bir polimer ile çalışan Lee ve arkadaşlarının [159,195] bulgularını destekler niteliktedir.

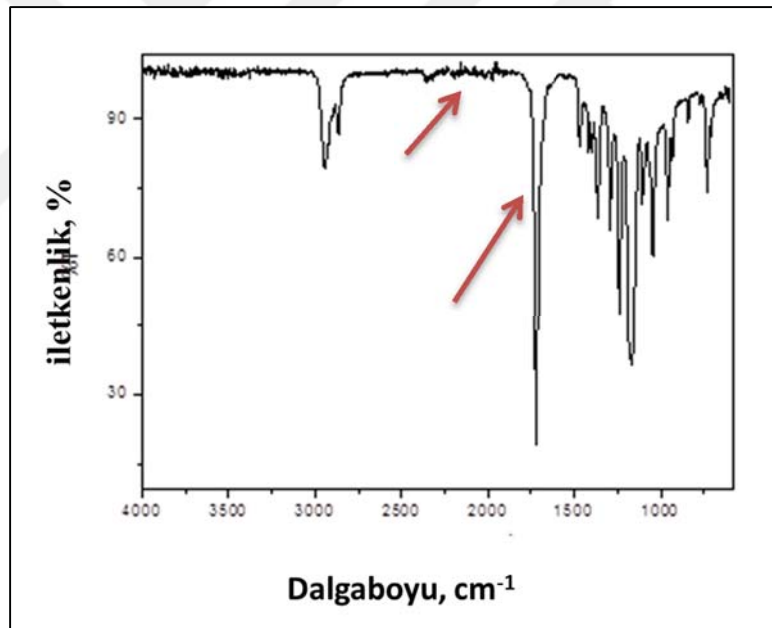


Şekil 3. 4. PEtOx₁₀₇₀₀ polimerine ait FT-IR spektrumu

Şekil 3.4'deki FT-IR spektrumunda görüldüğü üzere, 1630 cm^{-1} 'de ana pik, PEtOx'un yapısında bulunan karbonil pikini ($\text{C}=\text{O}$) ifade etmektedir. Ayrıca 2100 cm^{-1} 'de görülen pik ise PEtOx- N_3 'deki azid grubuna ait piki ifade etmektedir. $^1\text{H-NMR}$, FT-IR ve GPC sonuçları, PEtOx- N_3 'ün düşük bir polidispersite indeksi ile başarılı bir şekilde sentezlendiğini ortaya koymaktadır.

Sonrasında proparjil alkolün başlatıcılığında ϵ -kaprolakton monomerinin canlı halka açma reaksiyonu ile PCL-alkin sentezlenmiş ve elde edilen polimerin yapısı FT-IR, $^1\text{HNMR}$ ve GPC analizleri ile aydınlatılmıştır (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).

$M_n, \text{GPC} = 2100\text{ Da}$; $M_w, \text{GPC} = 2800\text{ Da}$; polidispersite indeksi (PDI) = 1.35. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 4.66 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 4.00 (m, CH_2O on PCL), 3.65 (t, 2H, CH_2OH), 2.50 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 2.35–2.27 (m, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ on PCL), 1.67–1.57 (m, CH_2 on PCL), 1.40–1.38 (m, CH_2 on PCL). FT-IR (ATR): ν [cm^{-1}] 3265, 2945, 2865, 1730, 1460, 1410, 1390, 1365, 1295, 1245, 1165, 1105, 1045, 1005, 960, 730 [197].



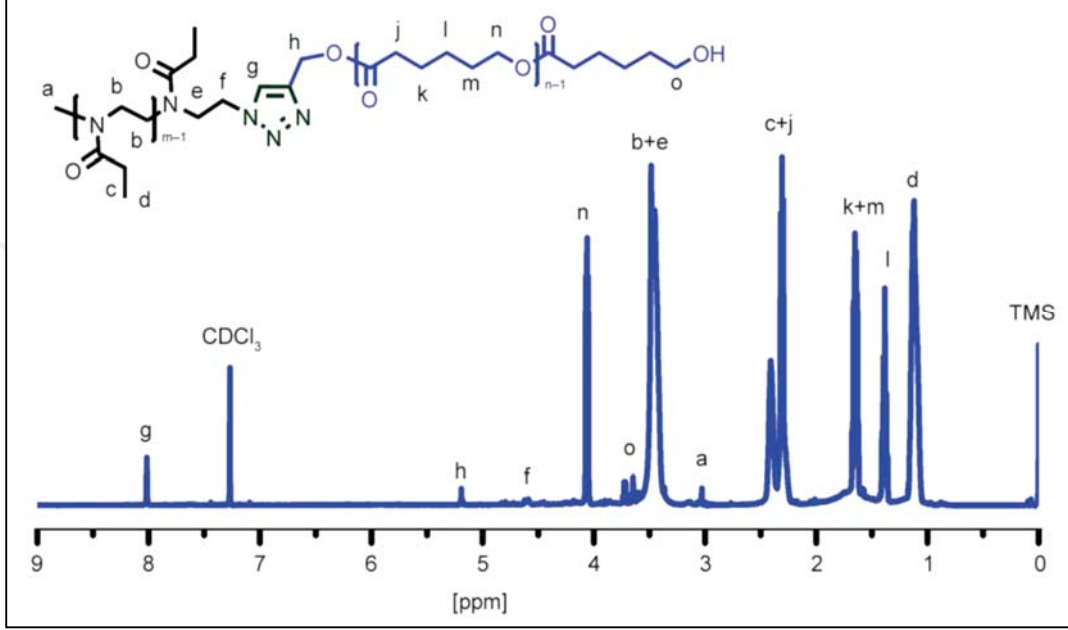
Şekil 3. 5. PCL₂₁₀₀-alkin polimerine ait FT-IR spektrumu

Şekil 3.5'de PCL-alkin polimerine ait pikler görülmektedir. Bu piklerden 1730 cm^{-1} 'deki $\text{C}=\text{O}$ ester (karbonil) grubuna ait piki ve 2100 cm^{-1} 'deki bant ise $\text{C}\equiv\text{C}$ alkin pikini ortaya koymuştur.

Sentezlenen PEtOx- N_3 ve PCL-alkin polimerleri bakır sülfat katalizörlüğünde azid-alkin klink reaksiyonu (CuAAC) ile birbirine bloklanmış ve elde edilen PEtOx-*b*-PCL blok

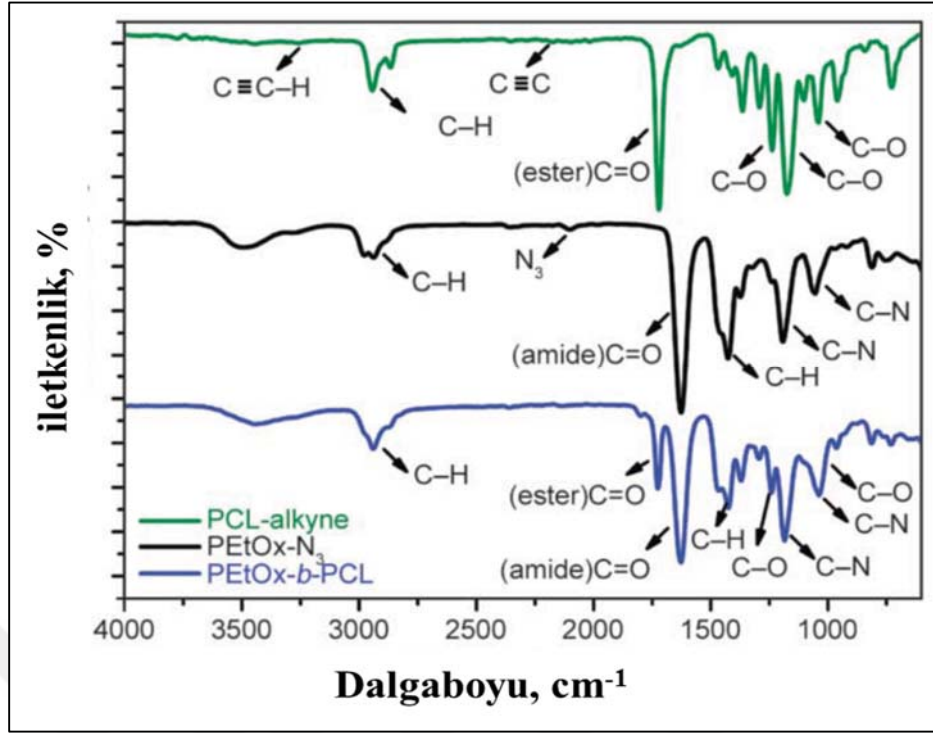
kopolimerinin oluşumuna ait ^1H -NMR ve FT-IR analizleri yapılmıştır (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7) [182, 197, 198].

^1H -NMR (600MHz, CDCl_3 , δ): 1.12 (3H, $-\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$), 1.38 (2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 1.65 (4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}$), 2.41-2.31 (2H, $-\text{NCOCH}_2-$), 3.45-3.49 (4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.06 (2H, $-\text{COOCH}_2-$), 4.6 (2H, triazol $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 5.19 (2H, $-\text{OCH}_2\text{-triazol}$), 8.02 (1H, $-\text{CHCHN}$).



Şekil 3. 6. PEOx-*b*-PCL blok kopolimerine ait ^1H -NMR spektrumu [183]

Şekil 3.6'deki ^1H -NMR spektrumunda, 1,3-1,4, 1,5-1,7 ve 3,9-4,0 ppm civarında elde edilen pikler tekrarlayan PCL polimerin birimlere ait metilen protonlarını ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$) göstermektedir. 3,5 ppm'deki pik PCL'nin uç grubundaki metilen (CH_2OH) protonlarını ifade etmektedir. 4,6 ve 2,3 ppm'deki pikler propargil alkole ait metilen ($\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$) ve metin ($\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$) protonlarını göstermektedir [183].



Şekil 3. 7. PEOx-*b*-PCL blok kopolimerine ait FT-IR spektrumu [183].

PEOx-*b*-PCL blok kopolimerinin tanımlanması ve yapısının aydınlatılması için ^1H -NMR ve FTIR analizleri yapılmıştır. Şekil 3.6 ve 3.7 bloklanmış PEOx-*b*-PCL polimerine ait ^1H -NMR ve FT-IR analiz spektrumlarını göstermektedir. Şekil 3.6'deki ^1H -NMR analizinde, konjugasyon sonrası g piki ile tespit edilen triazol halkasının gözlenmesi azid-alkin bağlanması ile blok kopolimer oluşumunu net bir şekilde ortaya koymuştur. Ayrıca PEOx için karakteristik olan (d piki) metil protonları korunmuş olup literatür ile uyumluluk göstermiştir [179], PCL için karakteristik olan metilen protonlarının (n) blok kopolimerde tespit edilmesi PEOx-*b*-PCL blok kopolimerinin oluşumunu doğrulamıştır [159, 184, 195]. FTIR analizi ile blok kopolimer yapısında PCL polimerine ait spesifik pikler tayin edilmiştir. Şekil 3.7'deki FT-IR analizine göre, PEOx'a ait C=O bağına ait pik 1700 cm^{-1} 'de korunmakta iken, PEOx- N_3 polimerindeki N_3 grubuna ait 2100 cm^{-1} pikine mavi renkli spektrumda bloklamadan kaynaklı olarak rastlanmamıştır. Yine Şekil 3.7'deki FT-IR analizine göre PEOx-*b*-PCL blok kopolimerin oluşumu 2100 cm^{-1} 'deki PCL polimerindeki alkin bağına ($\text{C}\equiv\text{C}$) ait pikin kaybolması ile doğrulanmıştır. Ayrıca PCL polimeri için spesifik olan 1730 cm^{-1} 'deki C=O ester pikinin, PEOx'un 1630 cm^{-1} deki C=O amit piki ile çakışması sonucu şiddetinde artış beklenmektedir. FT-IR analizi bu beklentiyi doğrular niteliktedir ve bu bulgu literatür ile örtüşmektedir [200]. Elde edilen

¹H-NMR ve FT-IR sonuçları, PEtOx polimerinin CuAAC klik reaksiyonu ile PCL bloğu ile başarılı bir şekilde konjuge edildiğini ortaya koymuştur [183].

3.2.2. PEtOx-ko-PEI-b-PCL Blok Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

PEI, yapısında taşıdığı her 3 azot atomunun protonlanabilme özelliğinden dolayı, yüksek katyonik yüke sahiptir ve bu nedenle hücrelerde büyük ölçüde toksisiteye yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca gen taşıma çalışmalarında kullanılan geleneksel polietilenin yüksek molekül ağırlığında olup aynı şekilde bu durum yüksek toksisite ile ilişkilidir. Literatür verileri, PEtOx'un kısmi hidrolizi ile sentezlenen PEI'nin, geleneksel PEI'ye göre hücresel sitotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur [87, 92, 93, 158]. Bu nedenle tez çalışmamız kapsamında, PEI kaynaklı toksisiteyi azaltmak ve düşük molekül ağırlığında sentezlenen PEI'nin gen transfeksiyonundaki başarısını ortaya koymak amacıyla PEtOx'un kısmi hidrolizi ile iki farklı hidroliz derecesinde (%30 ve %60) lineer PEI taşıyan blok kopolimerin sentezlenmesi amaçlanmıştır.

Optimum özellikte olduğu belirlenen PEtOx₁₁₃₀₀₍₁₀₇₀₀₎-N₃ polimerinin kısmi hidrolizi ile 3 farklı hidroliz derecesinde (%30, %60 ve %70) lineer PEI içeren kopolimerler sentezlenmiş ve sonrasında PCL ile azid-alkin klik kimyası (CuAAC) reaksiyonu ile bloklanmıştır. Sentezlenen 3 farklı blok kopolimerlerden hazırlanan misel formülasyonlarının partikül boyutları karakterize edilmiş ve optimum özellikte olduğu belirlenen %30 ve %60 hidrolize blok kopolimerler ile tez çalışmasına devam edilmiştir. Aşağıda bu blok kopolimere ait karakterizasyon bilgileri verilmiştir. İleriki bölümlerde belirtilen farklı hidroliz derecelerinde sentezlenen blok kopolimerler ile hazırlanan misellerin partikül boyutu analizlerine ait sonuçlar tartışılacaktır.

Hidroliz derecesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [201].

$$\text{Çevirme (\%)} = \frac{\text{PEI omurgası}}{\text{PEI omurgası} + \text{PEtOx omurgası}} * 100$$

Formül 3.1. Hidroliz derecesinin hesaplanma formülü

Hidroliz reaksiyonu farklı sürelerde, belirli oranda (11,96 M) HCl varlığında 100°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Hidroliz süresinin hidroliz derecesi üzerindeki etkisine dair bulgular Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Blok kopolimerlerin hidroliz koşulları ve karakterizasyonları [184]

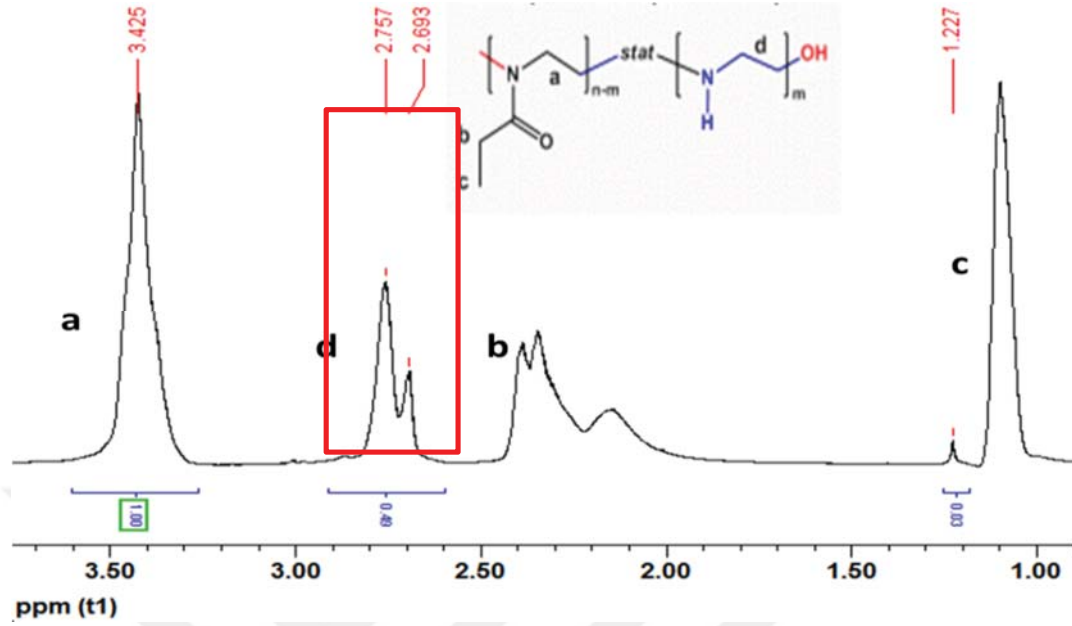
Kod	PEtOx				PDI	Blok kopolimerdeki PEI segmenti	Blok kopolimerdeki PCL segmenti	PDI
	Mn(Da)	Mn(Da)	Hidroliz yüzdesi(%)	Hidroliz süresi(s)		Mn (Da)	Mn (Da)	
	(Hidroliz öncesi)	(Hidroliz sonrası)			(Hidroliz sonrası)			
PPP30	10700	7500	30	8,5	1,14	1400	2100	1,35
PPP60	10700	4300	60	17	1,14	2800	2100	1,35

Çizelge 3.2’de görüldüğü üzere, başlangıç materyali olarak kullanılan 10700 Da ağırlığındaki PEtOx’un sabit miktarda HCl asit ile 100°C sıcaklık muamelesi sonucunda hidroliz süresindeki değişime bağlı olarak hidroliz oranında farklılıklar meydana gelmiştir. 8,5 saat süre ile hidrolize maruz bırakılan PEtOx₁₀₇₀₀ polimeri %30 hidrolize uğrarken, 17 saatlik hidroliz süresi sonunda polimerin hidroliz oranı %60’a yükselmiştir. %30 hidroliz sonrası PEtOx polimerinin molekül ağırlığı GPC ile 7500 Da, %60 hidroliz sonrası ise 4300 Da olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar hidroliz derecesinin çok büyük bir ölçüde hidroliz süresine bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgular, literatür verileri ile oldukça uyumludur. Fernandes ve arkadaşları [15], PEtOx’un kısmi hidrolizi ile sentezledikleri düz PEI’nin 3, 5 ve 7 saatlik farklı hidroliz süreleri ile 10000 Da molekül ağırlığındaki PEtOx’un 3 farklı hidroliz oranında PEI sentezlediğini ortaya koymuş olup, hidroliz süresi ile hidroliz derecesi arasındaki ilişki net bir şekilde gösterilmiştir. Ayrıca Jeong ve arkadaşları [50], Shah ve arkadaşları [88] ve Lin arkadaşları [93] çalışmalarında benzer bir ilişki ile hidroliz süresinin hidroliz derecesi üzerine etkisini incelemiş ve araştırmacıların bulguları tez çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz verileri desteklemiştir. Hidroliz sonucu sentezlenen PEI polimerinin blok kopolimer omurgasındaki molekül ağırlığı da hidroliz derecesine göre farklılık göstermiştir. Sonuç olarak, polimerlere ait moleküler ağırlık verileri hidroliz süresi ve hidroliz derecesini doğrular nitelikte olup, başarılı bir hidroliz gerçekleştiğini ortaya koymuştur.

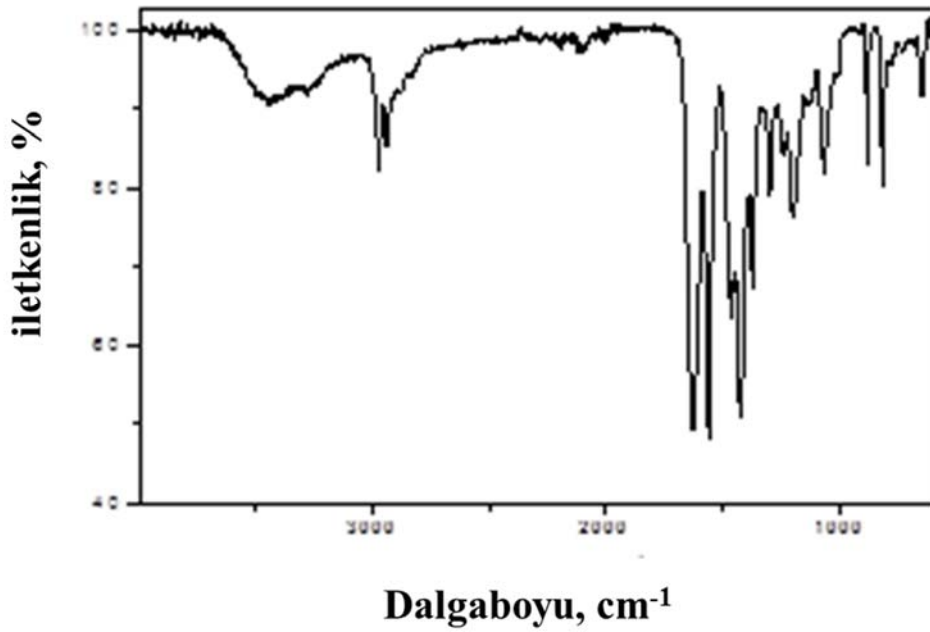
PEtOx₁₀₇₀₀-N₃ polimerinin lineer PEI’ye belirli yüzdelerde (%30 ve %60) kısmi hidrolizine ait ¹H-NMR ve FTIR analiz sonuçları Şekil 3.8-11’de gösterilmiştir.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ3.80–3.28 (4H, –CH₂–CH₂–N–), 3.00–2.65 (4H, –NH–CH₂–CH₂–), 2.45–2.13 (2H; –NCOCH₂–CH₃), 2.20– 2.00 (2H, CH₃CH₂COOH), 1.20–

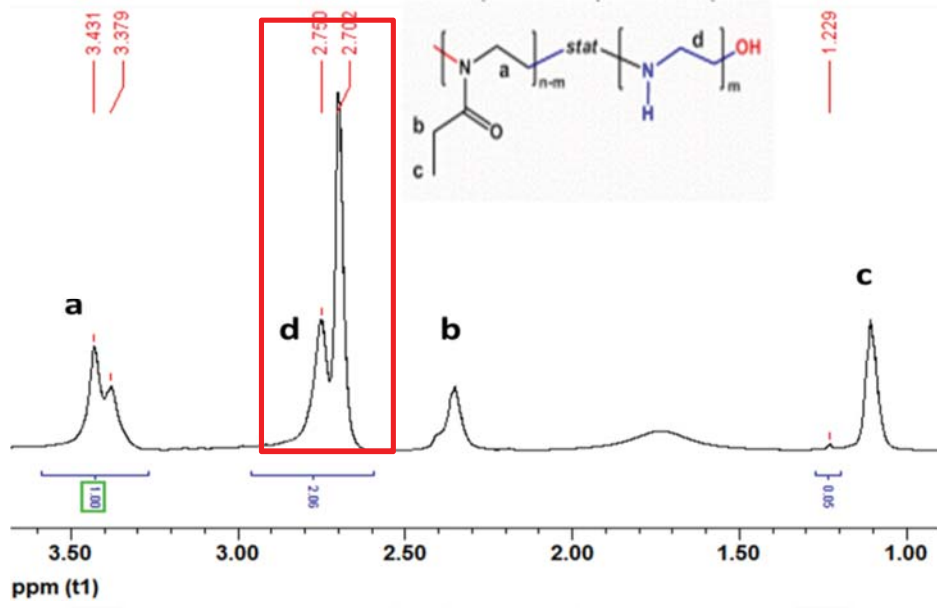
0.85 (3H, $-NCOCH_2CH_3$, 3H, CH_3CH_2COOH). FT-IR (ATR): ν [cm^{-1}] 2100 (azid), 1630 (karbonil) ve 1580 (N-H).



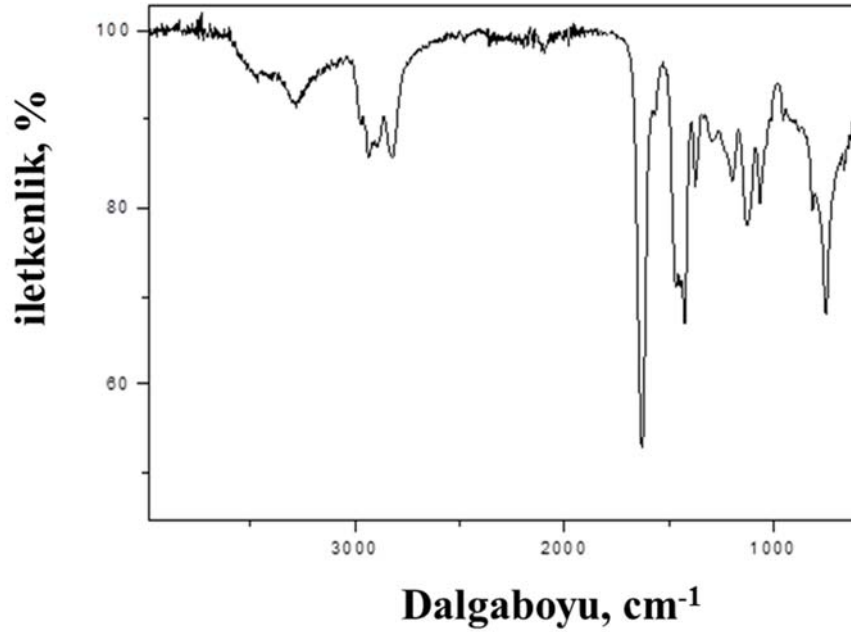
Şekil 3. 8. Azid uçlu PETox₁₀₇₀₀ polimerinin % 30 oranında hidrolizine ait ¹H-NMR spektrumu [184]



Şekil 3. 9. Azid uçlu PETox₁₀₇₀₀ polimerinin % 30 oranında hidrolizine ait FTIR spektrumu [184]



Şekil 3. 10. Azid uçlu PEtOx₁₀₇₀₀ polimerinin % 60 oranında hidrolizine ait ¹H-NMR spektrumu [184]

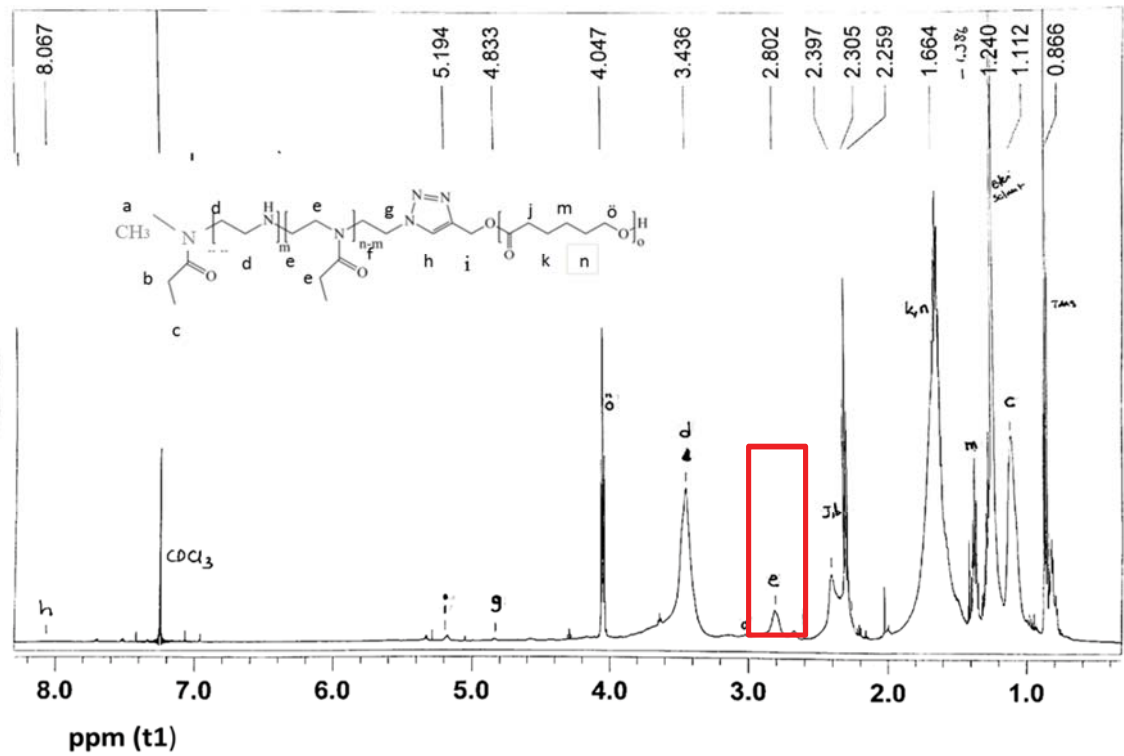


Şekil 3. 11. Azid uçlu PEtOx₁₀₇₀₀ polimerinin % 60 oranında hidrolizine ait FTIR spektrumu [184]

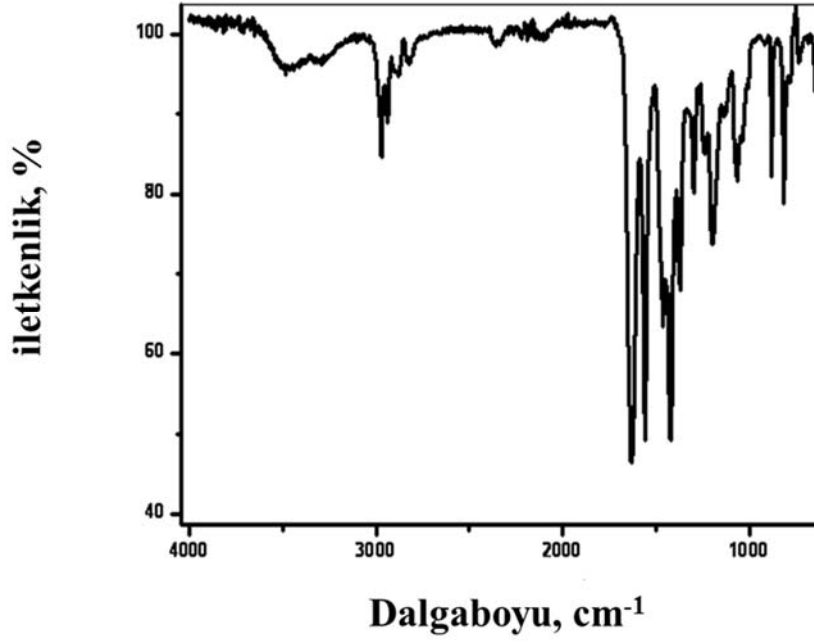
Şekil 3.8 ve Şekil 3.10'daki ¹H-NMR sonuçları incelendiğinde, PEtOx'un kısmi hidrolizi ile %60 oranında sentezlenen PEI polimerindeki N-H yapısının ortaya çıkmasına bağlı olarak bu yapıya ait 2.7 ppm civarındaki (NH-CH₂)'ye ait (d) pikinin şiddetinde artış gözlenmiştir. %30 hidrolize blok kopolimerin (d) pikinin şiddeti ise hidroliz derecesinin düşük olması nedeniyle azalmış ve hidroliz derecelerine göre değişen pik şiddetleri PEtOx'un başarılı bir şekilde hidroliz edildiğini göstermiştir. Ayrıca 3.4 ppm civarında

gözlenen PEtOx'a ait karakteristik ($-CH_2-CH_2-N-$) (a) pikinin şiddeti %30 hidrolize uğramış polimerde oldukça yüksek gözlenir iken, PEtOx'un hidrolizindeki artışa bağlı olarak %60 hidrolize polimerdeki (a) pik şiddetinde ise azalma meydana gelmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Shah ve arkadaşlarının araştırma sonuçlarını destekler nitelikte olup, PEtOx'un farklı hidroliz sürelerine bağlı olarak sentezlenen farklı oranlardaki PEI içeren blok kopolimerlerdeki etilenimin ünitelerine ait piklerdeki değişim ile benzer olduğu ortaya konulmuştur [88]. Ayrıca, Şekil 3.9 ve Şekil 3.11'deki FT-IR analizleri 1580 cm^{-1} bandındaki N-H (amin) yapısına ait piki göstermekte olup hidroliz artışı ile birlikte %60 hidrolize blok kopolimere ait pikin şiddetinde de artış meydana gelmiştir. Bu sonuçlar PEtOx polimerinin PEI'e kısmi hidrolizinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymuştur [184].

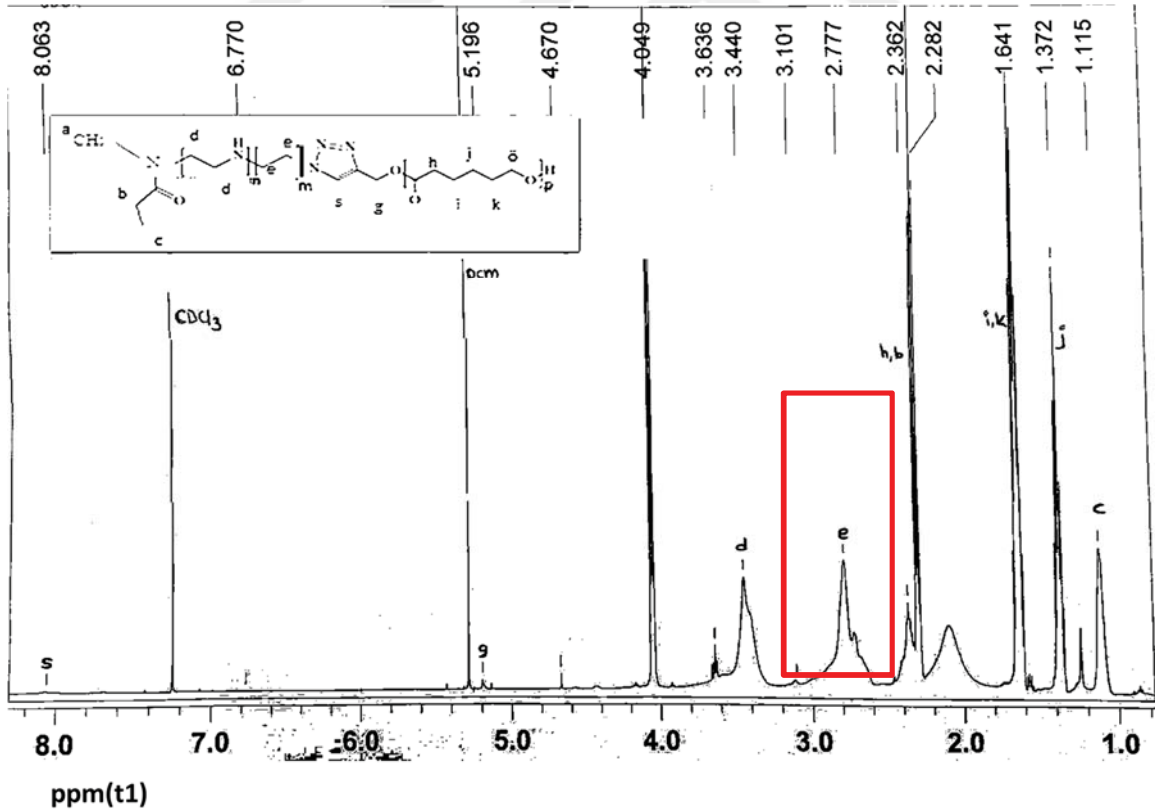
Hidroliz sonrası analizi yapılan iki farklı hidroliz derecesindeki PEtOx-ko-PEI kopolimerleri alkin uçlu PCL polimer ile klik reaksiyonu ile bloklanmış ve $^1\text{H-NMR}$ ve FT-IR analizleri yapılmıştır (Şekil 3.12-15).



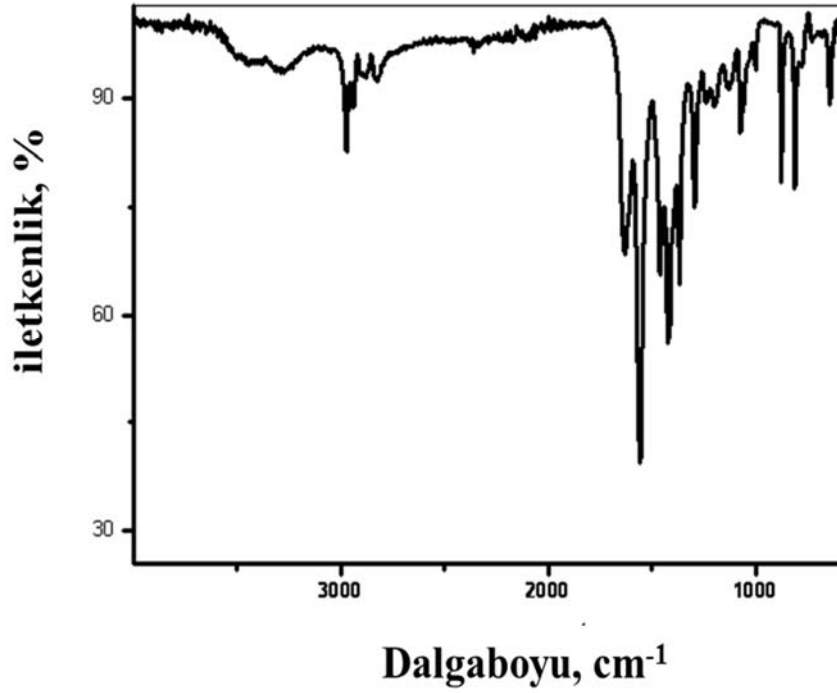
Şekil 3. 12. %30 hidrolize PEtOx₇₅₀₀-ko-PEI_{(30%)1400}-b- PCL₂₁₀₀ Blok kopolimerine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 3. 13. %30 hidrolize PEtOx_{7500} - ko - $\text{PEI}_{(\%30)1400}$ - b - PCL_{2100} blok kopolimerine ait FTIR spektrumu



Şekil 3. 14. %60 hidrolize PEtOx_{4300} - ko - $\text{PEI}_{(\%60)2800}$ - b - PCL_{2100} blok kopolimerine ait ^1H -NMR spektrumu



Şekil 3. 15. %60 hidrolize PEOx₄₃₀₀ –*ko*-PEI(%60)₂₈₀₀-*b*- PCL₂₁₀₀ blok kopolimerine ait FTIR spektrumu

Şekil 3.12 ve Şekil 3.14’de PCL polimeri ile konjuge edilen %30 ve %60 hidroliz derecelerindeki PEOx-*ko*-PEI kopolimerlerine ait ¹H-NMR analizlerine göre, 8,0 ppm’de ortaya çıkan (g) piki triazol halkası olup, azid uçlu PEOx-*ko*-PEI polimerinin alkin uçlu PCL polimeri ile bağlanması sonucu ortaya çıkan bir yapıdır. Ayrıca her iki hidroliz derecesine ait ¹H-NMR spektrumları kıyaslandığında PEI yapısındaki N-H bağına ait (e) piklerinin şiddetinde hidroliz artışına bağlı olarak artış gözlenmiştir. % 60 hidrolize blok kopolimerin H-NMR spektrumundaki (e) pikinin şiddeti, %30 hidrolize blok kopolimere göre oldukça yüksek bulunmuştur. PEOx’un kısmi hidrolizi ile sentezlenen nihai blok kopolimerin her sentez aşamasındaki karakterizasyonları yukarıda ifade edildiği üzere ¹H-NMR ve FT-IR analizleri ile değerlendirilmiştir. Tüm bu sonuçlar PEOx’un başarılı bir şekilde farklı hidroliz derecelerindeki lineer PEI’ye hidroliz edildiğini ve PCL kopolimer ile konjugasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Bu yapıdaki bir blok kopolimerin klik (çıtçıt) kimyası ile sentezine ilişkin literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısı ile bu çalışma tez çalışmamızın özgün kısmını oluşturmakta olan basamaklardan olup, literatüre yeni bir yöntem kazandırabileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca, tez çalışmamız kapsamında çıtçıt kimyası ile söz konusu polimerizasyonun gerçekleştirilmesi, sentez sonucu yüksek verimlilikte ve saflıkta ürün elde edilmesine de katkı sağlamıştır.

3.3. Misel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonlarına Ait Sonuçlar

3.3.1. PEtOx-*b*-PCL Blok Kopolimerleri ile Hazırlanan Boş Misellerin Partikül Boyut, Zeta Potansiyel ve Polidispersite İndeks Analizleri

Tez çalışmamız kapsamında öncelikle hidroliz edilecek uygun blok kopolimeri belirlemek amacıyla hidroliz edilmemiş farklı hidrofilik:hidrofobik oranlarda PEtOx-*b*-PCL blok kopolimerler ile boş miseller hazırlanarak ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Hidroliz edilmemiş farklı hidrofilik:hidrofobik blok uzunluklarında sentezlenen blok kopolimerler ile 3 farklı yöntemle göre boş misel formülasyonları hazırlanmış ve boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeks analizleri, DLS yöntemi ile değerlendirilmiştir. Hidrofilik:hidrofobik blok uzunluğu misel oluşumunda önemli bir kriter olduğundan, öncelikle uygun blok oranına sahip blok kopolimerin tayini amaçlanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda farklı hazırlama yöntemlerinin ve blok uzunluklarının optimum boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeksine (PDI) etkisi belirlenmiş ve ideal özelliklere sahip misellerin elde edilmesinde kullanılan blok kopolimer tayin edilmiştir. Optimum özellikteki blok kopolimerin ileri karakterizasyon analizleri, kritik misel konsantrasyonu ve TEM analizleri ile doğrulanmıştır.

Ön çalışmalarımız sırasında yapılan analizlerden biri ve öncelikli olanı blok kopolimerin saflaştırılmasının misel boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeline etkisini incelemektir. Bu nedenle TÜBİTAK-MAM ekibi tarafından sentezlenen blok kopolimerler arasından seçilen birkaç polimer, üretim aşamaları sırasında ortamda kalabilme ihtimali bulunan safsızlıkların giderilmesi amacıyla 6 gün süre ile diyaliz yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma öncesi ve sonrası bu blok kopolimerler ile hazırlanan boş misellerin boyut özellikleri karakterize edilmiştir. Çizelge 3.3’de blok kopolimerlerin saflaştırma öncesi ve sonrası hazırlanan boş misellere ait boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeks değerleri verilmiştir.

Çizelge 3. 3. Boş misellerin boyutları, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyel değerleri (S.Ö: Saflaştırma öncesi, S.S: Saflaştırma sonrası) (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Polimer kodu	Partikül boyutu(nm)		Zeta potansiyel(mV)		Polidispersite indeks(PDI)	
	S.Ö	S.S	S.Ö	S.S	S.Ö	S.S
PEtOx ₄₅₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₂₅₀	134,6±32,9	53,8±1,4	7,6±1,85	-2,3± 0,2	0,2±0,0	0,3 ± 0,0
PetOx ₉₂₀₀ - <i>b</i> -PCL ₅₁₀₀	124±8,1	116±1,2	-16,3±0,9	-14,3±0,3	0,3±0,0	0,4±0,0
PEtOx ₁₀₇₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀	72,3±0,9	35,8±1,4	-10,8±0,1	-8,5±1,8	0,5±0,0	0,3±0,0

Çizelge 3.3’de görüldüğü üzere farklı blok uzunluklarından seçilen birkaç blok kopolimerin 6 günlük diyalizi sonucunda hazırlanan misellerin partikül boyutları, diyaliz öncesinde elde edilen boyutlarına göre oldukça düşük bulunmuştur. Özellikle PEO₁₀₇₀₀-b-PCL₂₁₀₀ blok kopolimeri ile hazırlanan boş misellerin partikül boyutu 72,3 nm’den 35,8 nm’ye, polidispersite indeksi ise 0,5’ten 0,3’e düşmüştür. Polimer üretimi sırasında yapılan dietil eter ile çöktürme işlemi sadece reaksiyon sırasında ortamda bulunan başlatıcı ve diğer moleküllerin kısmi olarak ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlamaktadır ancak diyaliz yöntemi ile yapılan uzun ve kapsamlı ikinci bir saflaştırma işlemi bu blok kopolimerler ile hazırlanan misellerin molekül büyüklüğü dağılımını ve boyutunu önemli ölçüde küçülttüğünü ortaya koymuştur. Ayrıca bu saflaştırma işleminin reaksiyona girmemiş monomerleri, tuz kalıntılarını ve tüm yan ürünlerden kaynaklı safsızlıkları da ortamdaki uzaklaştırılmasını kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında kullanılan blok kopolimerlerin diyaliz yöntemi ile saflaştırılarak sonraki çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir. Sentez polimer olmasına rağmen saflaştırma sonucu düşük partikül boyutunda misellerin elde edilebilmiş olması, ileriki çalışmalar için umut verici sonuçlar vermiştir.

Bölüm 2.2.3.1’de belirtildiği üzere, boş misel formülasyonları 3 farklı yöntem ile hazırlanmış olup, optimum partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksine sahip misellerin elde edilmesinde görev alan ideal yöntem analiz sonuçlarına göre belirlenmiştir. Çizelge 3.4’te farklı yöntemler ile hazırlanan misellere ait partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi sonuçları verilmiştir.

İdeal bir misel taşıyıcı sistemin hazırlanmasında dikkate alınması gereken husus, uygun hidrofilik:hidrofobik blok uzunluğunun belirlenmesidir. Çünkü hidrofilik:hidrofobik blok uzunluğu misellerin kritik misel konsantrasyonu ve buna bağlı olarak termodinamik ve kinetik stabilitesinin belirlenmesindeki en önemli faktörlerden biridir [15, 104]. Ayrıca çalışılan blok kopolimerler amfifilik bir yapıda olduğundan dolayı farklı hidrofilik:hidrofobik blok uzunlukları sferik (küresel), silindirik ve veziküler olmak üzere çeşitli morfolojilerde misellerin oluşuma neden olmaktadır. Bu nedenle tez çalışmamızda küresel miseller hazırlayabilmek ve uygun blok oranını belirleyebilmek adına, farklı literatürler taranarak küresel misel oluşturabilen oranlar yaklaşık olarak belirlenmiştir. Park ve arkadaşları [202], PCL polimerinin blok kopolimer içerisinde ağırlıkça %14 oranında bulunan blok kopolimer ile hazırlanan misellerin 26 nm gibi düşük partikül boyut sergilediğini ortaya koymuştur. Bu ağırlıkça oran, PEO’un PCL polimerine göre 5 kat

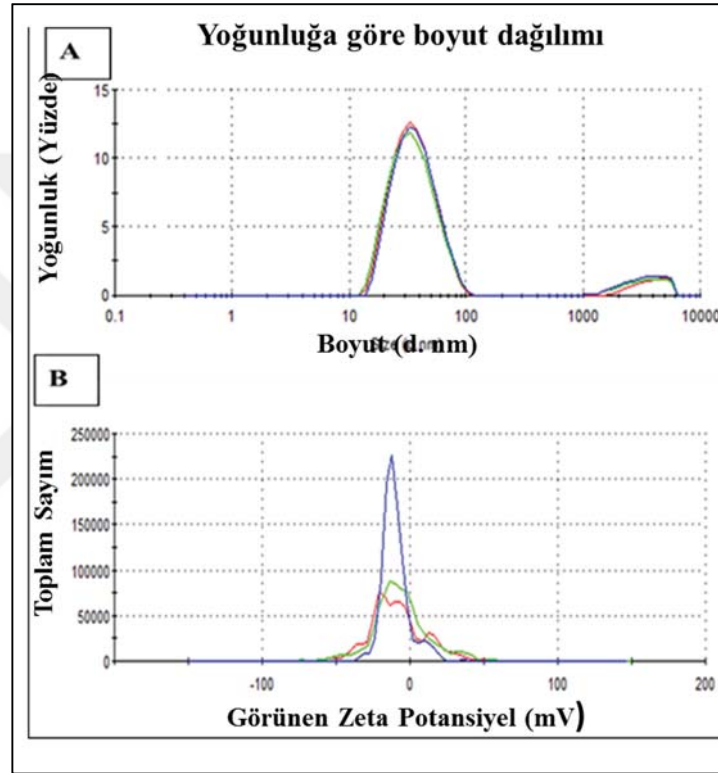
fazla molekül ağırlığına denk gelmektedir. Kısaca 5:1 hidrofilik:hidrofobik molekül ağırlık oranının ideal yapıda misellerin oluşumuna neden olduğunu ifade etmişlerdir. Başka bir çalışmada Kim ve arkadaşları [185], PCL polimerinin blok kopolimer içerisinde ağırlıkça %25 oranında, diğer bir ifade ile hidrofilik:hidrofobik ağırlık oranı 3:1 olduğunda ideal misel yapılarına ulaştığını ortaya koymuştur. Lee ve arkadaşları [159, 181], PCL polimerinin blok kopolimer içerisinde ağırlıkça %35 oranında, diğer bir ifade ile hidrofilik:hidrofobik ağırlık oranı (2:1) (1,5:1) olduğunda ideal misel yapılarına ulaştığını ortaya koymuştur. Literatür taramalarında dikkat çekici olan ortak nokta blok kopolimerlerin molekül ağırlıkları farklı olmasına rağmen misel oluşumu için hidrofilik bloğun hidrofobik bloktan ağırlıkça yüksek olduğudur. Bu bilgilerden yola çıkılarak, literatür verilerinde belirtilen oranlarda blok uzunluklarına sahip Çizelge 3.4'te belirtilen farklı hidrofilik:hidrofobik blok oranı ve molekül ağırlığındaki PEtOx-*b*-PCL blok kopolimerler ile boş miseller hazırlanmış ve miseller partikül boyutu, zeta potansiyel ve polidispersite indeksleri açısından karakterize edilmiştir. Çizelge 3.4'te görüldüğü üzere, farklı yöntemler ile hazırlanan boş miseller arasından ince film hidrasyon yöntemi ile hemen hemen tüm formülasyonlar için daha düşük partikül boyutu ve polidispersite indeksi elde edilmiştir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda kullanılacak misellerin bu yöntem ile hazırlanmasına karar verilmiştir. Literatürde, bu yöntemin kolay, pratik ve basit olması, hızlı bir şekilde küçük ve uniform partiküllerin elde edilmesine olanak sağlaması nedeniyle sıklıkla kullanılmakta olduğu belirtilmiş ve elde ettiğimiz sonuçların, literatür bilgisini destekler nitelikte olduğu ortaya konulmuştur [185, 188, 202, 203].

Çizelge 3. 4. Farklı blok uzunluklarındaki PEtOx-*b*-PCL blok kopolimerleri ile hazırlanan misellerin diyaliz, çözücü buharlaştırma ve ince film hidrasyon yöntemi ile elde edilen partikül boyutu, zeta potansiyeli (mV) ve polidispersite indeksine ait bulgular (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Polimer kodu	Yöntem-Organik Çözücü	Boyut	PDI	Zeta Potansiyel
PEtOx ₃₈₀₀ - <i>b</i> -PCL ₁₉₀₀	Diyaliz-THF	494,6 ± 38,9	0,5 ± 0,0	-23,6 ± 0,4
	Çözücü buharlaştırma-THF	342,5±7,4	0,3±0,0	-1,5±0,2
PEtOx ₄₅₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₂₅₀	Diyaliz-THF	53,8±1,4	0,4 ± 0,0	-2,4 ± 0,3
	Çözücü buharlaştırma-THF	246,1±7,1	0,3±0,0	-11,6±0,4
	İnce film-THF	71,2±0,2	0,2±0,0	-1,3±0,9
PEtOx ₉₂₀₀ - <i>b</i> -PCL ₅₁₀₀	Diyaliz-THF	93,7±0,7	0,6±0,0	-8,4±0,6
	Çözücü buharlaştırma-THF	116±1,2	0,4±0,0	-14,3±0,3
	İnce film-THF	84,4±2,4	0,4±0,0	-5,0±0,6
PEtOx ₇₅₁₆ - <i>b</i> -PCL ₄₀₄₇	Diyaliz-THF	70,5± 1	0,5 ± 0,0	12,6 ± 0,8
	Çözücü buharlaştırma-THF	103,1 ± 0,6	0,4 ± 0,0	-14,2 ± 0,5
	İnce film-THF	38,2±0,7	0,2±0,0	-7,5±1,5
PEtOx ₇₄₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₆₀₀	Diyaliz-THF	132,5±8,5	0,6±0,1	-14,3±2,4
	Çözücü buharlaştırma-THF	97,9± 3,4	0,3±0,0	-9,6±0,7
	İnce film-THF	178,7±0,4	0,5±0,1	-1,2± 0,1
PEtOx ₇₄₀₀ - <i>b</i> -PCL ₁₅₀₀	Diyaliz-THF	101,1±2,5	0,6±0,0	-8,2±0,9
	Çözücü buharlaştırma-THF	106,3 ±1,2	0,5±0,0	-14,3± 0,6
	İnce film-THF	85,5±1,2	0,5±0,0	-7,2± 0,3
PEtOx ₆₄₀₀ - <i>b</i> -PCL ₁₅₀₀	Diyaliz-THF	119,4±3,5	0,6±0,1	-14,4±1,6
	Çözücü buharlaştırma-THF	89,6±2,1	0,4±0,0	-9,0± 0,5
	İnce film-THF	107,8±1,9	0,3±0,0	-7,7 ±0,3
PEtOx ₁₀₇₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀	İnce film-THF	35,8±1,4	0,3±0,0	-8,5±1,8

Farklı hidrofilik:hidrofobik orana sahip blok kopolimerler arasından hidrofilik:hidrofobik moleküler ağırlık oranı 5:1 olan PEtOx₁₀₇₀₀-*b*-PCL₂₁₀₀ blok kopolimeri ile hazırlanan

misellerin 35,8 nm gibi düşük bir partikül boyutu, negatif zeta potansiyel ve ideal polidispersite indeksine (0,3) sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.16). Misel yapısını oluşturan blok kopolimerin hidrofilik fraksiyonu misel boyut ve morfolojisinde etkilidir. Elde edilen bu bulguların literatür verileri ile örtüşmekte olduğu ve PEtOx tabanlı misellerin genellikle 100 nm altında bir boyut sergilediği benzer çalışmalarda ortaya konulmuştur [159, 169, 195, 201, 202]. Bu nedenle tez çalışmasının bundan sonraki aşamalarında PEtOx₁₀₇₀₀-*b*-PCL₂₁₀₀ blok kopolimerin kısmi hidrolizi ile farklı hidroliz derecelerinde PEI içeren blok kopolimerlerin sentezlenmesine karar verilmiştir.



Şekil 3. 16. PEtOx₁₀₇₀₀-*b*-PCL₂₁₀₀ blok kopolimeri ile hazırlanan misellere ait a) partikül boyut ve b) zeta potansiyel grafikleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Optimum özellikte boş misel formülasyonlarının elde edilmesini sağlayan yöntem ve blok kopolimerin belirlenmesini takiben, bu blok kopolimerin kısmi hidrolizi ile 3 farklı hidroliz derecesinde PEI içeren blok kopolimerler sentezlenmiş, miseller hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır.

3.3.2. Farklı Hidroliz Derecelerindeki PEtOx-*ko*-PEI-*b*-PCL Blok Kopolimerleri ile Hazırlanan Boş Misellerin Partikül Boyut, Zeta Potansiyel ve Polidispersite İndeks Analizleri

Partikül boyutu, zeta potansiyel ve PDI değerleri polimerik misellerin hücre içine alımı için önemli faktörlerdir [205]. Çalışmamızda, farklı hidroliz derecelerindeki boş misellerin partikül boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeksine bağlı fizikokimyasal

karakterizasyonları dinamik ışık saçılım yöntemi ile tayin edilmiştir. PEO_x₁₀₇₀₀ blok kopolimerinin kısmi hidrolizi ile üç farklı hidroliz derecelerinde (%30, %60 ve %70) sentezlenen PEO_x-*ko*-PEI-*b*-PCL blok kopolimerlerinden hazırlanan boş misel formülasyonlarına ait partikül boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeksine ait bulgular Çizelge 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3. 5. Farklı hidroliz derecelerinde PEO_x-*ko*-PEI-*b*-PCL blok kopolimerleri ile hazırlanan boş misel formülasyonlarının (ultra saf su içerisinde) boyut (nm), polidispersite indeks (PDI) ve zeta potansiyel(mV) değerleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Misel formülasyonları (Boş)	Boyut	PDI	Zeta Potansiyel
PEO _{x7500} - <i>ko</i> -PEI(%30) ₁₄₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀ (PPP30)	81,6±0,5	0,2±0,0	21,8±0,2
PEO _{x4300} - <i>ko</i> -PEI(%60) ₂₈₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀ (PPP60)	118,6±1,0	0,2±0,0	36±1,2
PEO _{x2750} - <i>ko</i> -PEI(%70) ₃₆₀₀ - <i>b</i> -PCL ₂₁₀₀ (PPP70)	139,3±3,5	0,2±0,0	48,8±0,8

Hidroliz sonucu elde edilen PEO_x-*ko*-PEI(%30,%60,%70)-*b*-PCL blok kopolimerlerinden hazırlanan boş misel formülasyonları arasından uygun partikül boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeksine sahip 2 farklı hidroliz derecesindeki blok kopolimerler seçilerek boş miseller hazırlanmış, kritik misel konsantrasyonu ve TEM analizlerini takiben terapötik gen ile kompleksleştirme yapılmak üzere tez çalışmalarına devam edilmiştir. Bir önceki bölümde, ideal boyutta misel hazırlanması için elverişli bir yöntem olduğu tayin edilen ince film hidratasyonu, hidrolize polimerler ile misellerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Hidroliz sonucu yapıya katılan PEI, blok kopolimerin THF içerisindeki çözünürlüğünü azalttığından dolayı, çözücü olarak blok kopolimerleri daha iyi çözdüğü belirlenen DCM/Metanol karışımı kullanılmıştır.

Çizelge 3.5’de farklı hidroliz derecelerindeki blok kopolimerler ile hazırlanan boş misel formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel sonuçları değerlendirilmiş ve bunlar arasında %30 hidroliz yüzdesine sahip PPP30 misellerin 81,6±0,5 nm düşük partikül boyutu ve 21,8±0,2 mV pozitif yükü, %60 hidroliz yüzdesine sahip PPP60 misellerin ise 118,6±1,0 nm nispeten düşük boyutu ve 36±1,2 mV zeta potansiyel değerinde olduğu tespit edilmiştir. PPP70 miseller ise, 139,3±3,5 nm ile yüksek partikül boyutu sergilemiştir. Yine çizelge 3.5’te görüldüğü üzere, tüm misel formülasyonlarının polidispersite indeksinin 0,2 olarak ideal bir dağılım sergilediği ortaya konulmuştur. Yüksek pozitif yük (48,8 mV), miselleri oluşturan polimer omurgası üzerindeki uzun PEI bloğu ve buna bağlı olarak moleküler ağırlığının yüksek oluşu nedeniyle, *in vitro* hücre

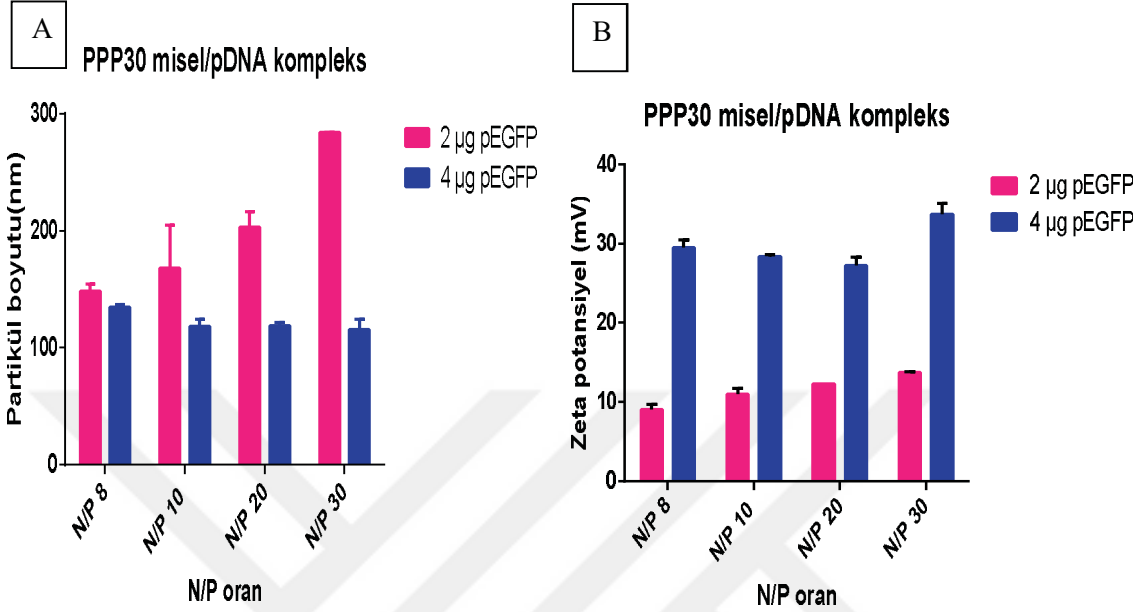
kültürü çalışmaları için yüksek toksisite göstereceği göz önünde bulundurulduğundan [206], tez çalışmamıza PPP70 blok kopolimer ile devam edilmemesine karar verilmiştir. Bunun yerine ideal özellikleri nedeniyle PPP30 ve PPP60 misel formülasyonları, tez çalışmasının sonraki aşamalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Hidroliz derecesinin, misellerin fizikokimyasal özelliklerine, hücreler üzerindeki transfeksiyon etkinliklerine ve apoptoz kaynaklı ölüme olan etkilerini karşılaştırmak amacıyla tüm çalışmalar bu iki PPP30 ve PPP60 misel formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar daha önceki literatürler ile uyumlu olup, artan hidroliz derecesine bağlı olarak polimer omurgasındaki PEI bloğunun artışı, boş misellerin partikül boyutunun artmasına ve pozitif yük ile yüklenerken zeta potansiyelinin yükselmesine neden olmuştur [92, 102]. Tüm hidroliz derecelerindeki misel formülasyonları ise oldukça dar bir aralıkta dağılım (PDI) sergilemiştir. Kısacası sonuçlar, her iki hidroliz derecesindeki amfifilik PEO-*ko*-PEI-*b*-PCL blok kopolimerlerin, çekirdek-kabuk yapısı ile kendiliğinden polimerik misellere düzenlenebildiğini ve katyonik yüzey yüküne sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, katyonik polimerik misellerin plazmit DNA/terapötik gen ile kolaylıkla kompleksleşmesine ve kanser hücrelerinin yüksek transfeksiyonuna katkıda bulunacağını ortaya koymaktadır [14, 79, 81].

3.3.3. %30 ve %60 Hidrolize PEO-*ko*-PEI-*b*-PCL Blok Kopolimeri ile Hazırlanan Misel/Gen Komplekslerinin Partikül Boyut, Zeta Potansiyel ve Polidispersite İndeks Analizleri

Optimum özellikte olduğu karakterize edilen iki ayrı hidroliz derecesindeki PPP30 ve PPP60 boş miseller ile misel/gen kompleksleri hazırlanmıştır. Komplekslerin hazırlanmasında öncelikle ön çalışmalar için terapötik gen taşımayan pEGFP-C3 ile misel/DNA kompleksleri oluşturulmuş, karakterizasyonları yapılmış ve sonrasında pEGFP-BikDD terapötik gen ile misel/gen kompleksleri hazırlanmıştır. Çalışmamızda plazmit DNA/gen miktarı sabit tutularak blok kopolimerin farklı konsantrasyonları ile farklı amin/fosfat (N/P) (0,5'ten 30'a) oranlarında kompleksler hazırlanmıştır. Kompleks oluşumu katyonik polimerdeki amin grubu ile DNA'daki negatif yüklü fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşime dayalı olarak gerçekleşmiştir. Öncelikle, boş miseller ile kompleksleştirilecek DNA miktarını belirlemek amacıyla ön çalışmalarda kullanılması planlanan pEGFP-C3 plazmit DNA ile çalışılmıştır. Jel retardasyon analizleri ile misel/DNA kompleksleri için N/P 8'den N/P 30 oranında kompleks oluşumu belirlendiğinden ön çalışmalar için bu oranlarda ultra saf su içerisinde PPP30 misel/pEGFP kompleksleri hazırlanmıştır. Kompleksteki DNA miktarının partikül boyutu, zeta

potansiyel ve polidispersite indeksine etkisini incelemek amacıyla 2 µg ve 4 µg plazmit DNA içeren PPP30 misel/pEGFP plazmit DNA kompleksleri hazırlanmış ve dinamik ışık saçılım yöntemi ile optimum partikül boyutu tayin edilerek komplekslere yüklenmesi ideal olan DNA miktarı belirlenmiştir (Şekil 3.17).

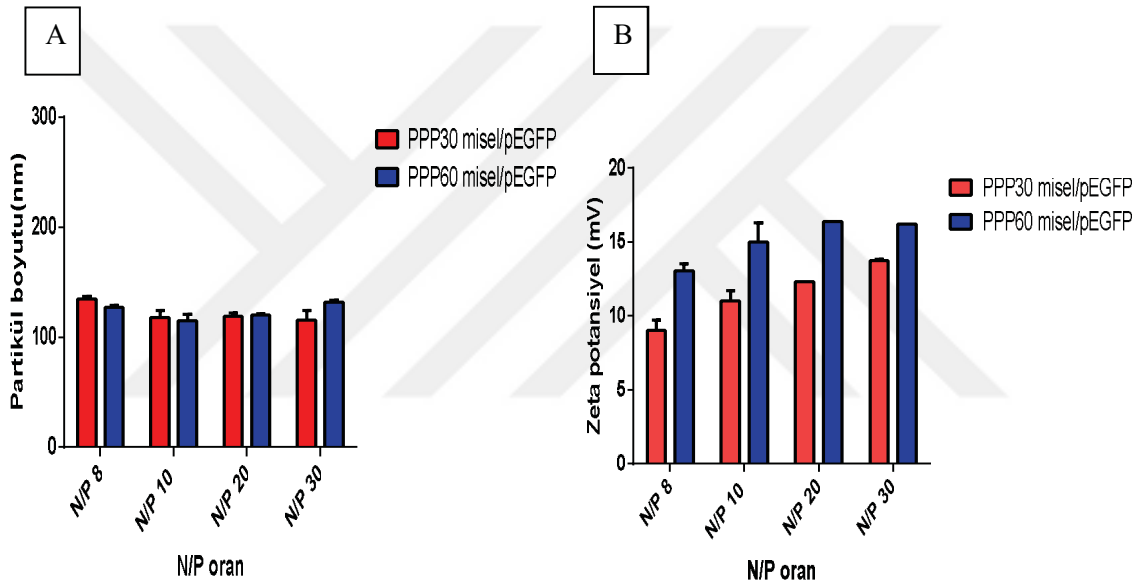


Şekil 3. 17. 2 µg ve 4 µg pDNA yüklü PPP30 misel/pDNA kompleksinin farklı N/P oranlarındaki a) Partikül boyut (nm) b) Zeta potansiyel analiz sonuçları (mV) (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.17’de görüldüğü üzere, en düşük partikül boyutu N/P 30 oranında, 115,6 nm ile 4 µg DNA yüklü miseller ile elde edilmiştir. Aynı N/P oranında 2 µg DNA yüklü misellerin partikül boyutu 284 nm ile oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca 4 µg DNA yüklü misellerin yüzey yükü 33 mV olup, 2 µg DNA yüklü miseller ile 13 mV olarak düşük pozitif yük gözlenmiştir. Sonuçlar, farklı N/P oranlarında hazırlanan komplekslerin 4 µg DNA ile her bir N/P oranında daha yüksek pozitif yük ile sıkı kompleksler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Düşük miktardaki DNA ile misellerin sıkı bir şekilde paketlenemediği ve hala çözeltide komplekse katılmamış serbest DNA varlığı gösterilmiştir. DNA çözelti içerisinde serbest halde bulunduğundan dolayı negatif yükü tam olarak baskılanamamış ve 2 µg DNA yüklü misel komplekslerin zeta potansiyel değeri, 4 µg içeren misel/gen komplekslerine göre düşük bulunmuştur. Bu bulgular ışığında, sonraki çalışmalarda nihai PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin hazırlanması için 4 µg terapötik genin kullanımına karar verilmiştir. Ayrıca, literatür bulguları, 4 µg DNA ile yapılan transfeksiyon çalışmalarında yüksek transfeksiyon etkinliği elde edildiğini ortaya koymuştur, çalışmamızda partikül boyut analizi ile 4 µg gen kullanarak elde ettiğimiz ideal

misel boyutları hem düşük boyutu nedeniyle hücresel alımının, hem de transfeksiyon etkinliğinin yüksek olacağını düşündürmüştür [15, 92, 172].

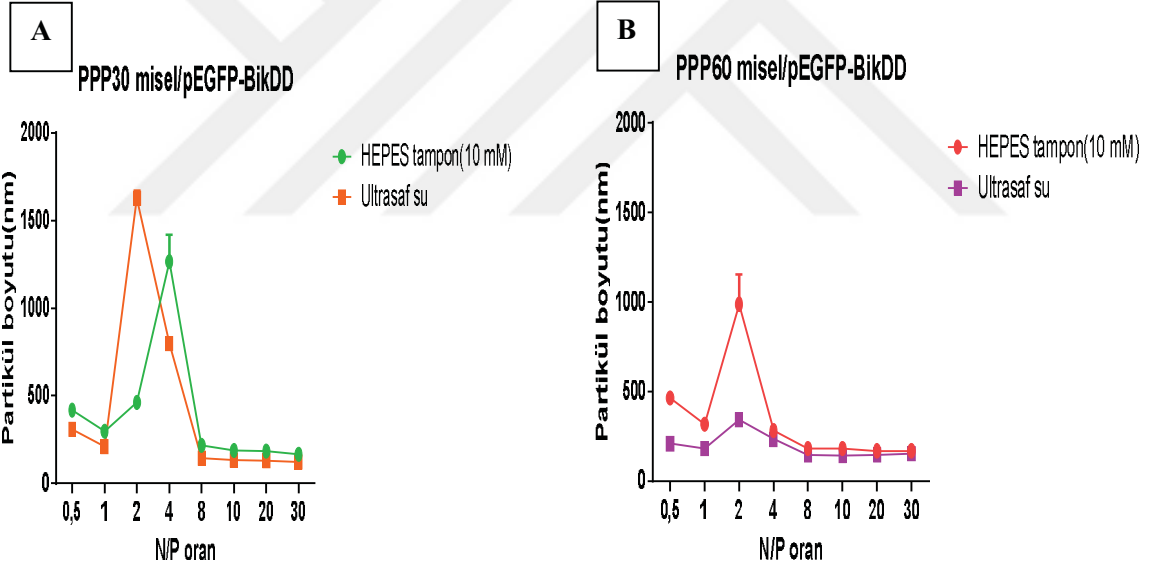
Tez çalışmamız kapsamında, PEO tabanlı miseller taşıyıcı sistem ile kompleksleştirilen terapötik BikDD genin aktarım etkinliği ve apoptotik ölümün başarısı, kontrol grubu olarak terapötik gen içermeyen çıplak plazmit DNA (pEGFP-C3) yüklü miseller ile kıyaslanarak tayin edilmiştir. Bu amaçla ön denemeler için, N/P 8'den 30'a kadar 4 µg pEGFP-C3 plazmidi ile ultra saf su içerisinde hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel komplekslerinin partikül boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri DLS yöntemi ile analiz edilmiştir. pEGFP-C3 ile ön çalışması yapılan misel/DNA komplekslerinin partikül boyut ve zeta potansiyel sonuçları Şekil 3.18'de verilmiştir.



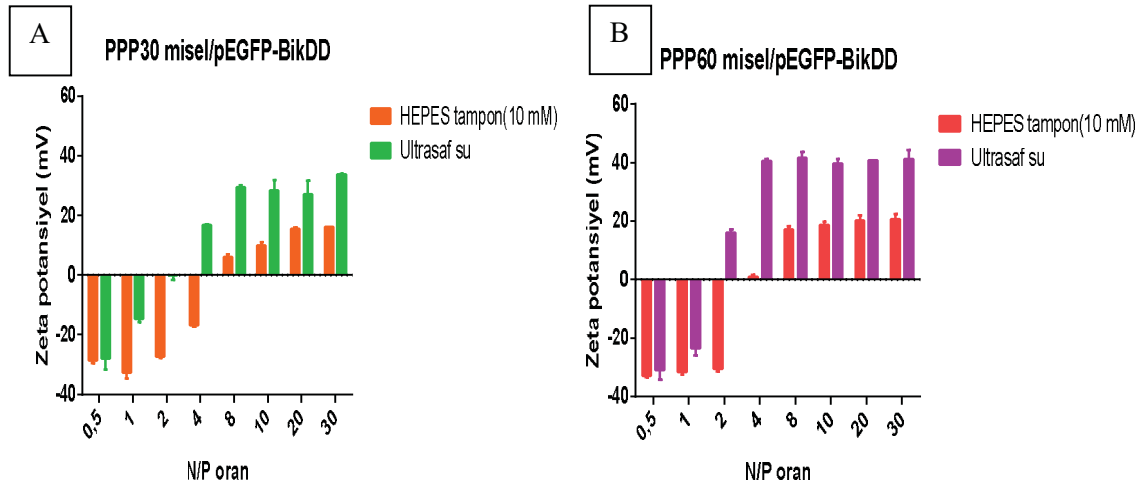
Şekil 3. 18. pEGFP-C3 yüklü PPP30 misel ve PPP60 misel kompleksinin farklı N/P oranlarındaki a) Partikül boyut(nm) b) Zeta potansiyel analiz sonuçları (mV) (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.18'de görüldüğü üzere ön denemeleri pEGFP-C3 plazmidi ile yapılan misel/DNA komplekslerinin N/P 8, 10, 20 ve 30 oranlarındaki boyutları, PPP30 kompleksleri için sırasıyla, 134,4, 118, 119 ve 115 nm olarak elde edilmiştir. PPP60 misel/DNA kompleksleri için ise sırasıyla, 127, 115, 120 ve 132 nm olarak elde edilmiştir. Sonuçlar, polimer omurgasında yüksek hidroliz derecesine bağlı yüksek oranda bulunan PEI bloğunun misellerin boyutunda artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. PPP30 ve PPP60 misel/DNA komplekslerinin zeta potansiyel değerleri kıyaslandığında, PPP60 miselleri yapısında bulunan yüksek hidroliz derecesindeki PEI nedeniyle daha yüksek katyonik yükten kaynaklı yüksek zeta potansiyele sahiptir [15, 87].

Ön çalışmaları pEGFP-C3 plazmidi ile tamamlanan miseller sonrasında nihai formülasyonun elde edilebilmesi amacıyla terapötik BikDD geni ile aynı koşullarda kompleksleştirilmiştir. Çalışmalar sırasında dikkat çeken nokta, jel reterdasyon analizlerinde daha düşük N/P oranlarında dahi kompleksleşme oluştuğunun gözlenmesidir. Bu nedenle, nihai PPP30 ve PPP60 misel/gen kompleksleri için sadece ön denemelerde çalışılan N/P8 ve üzerindeki oranlarda değil daha düşük N/P oranlarında da partikül boyut analizleri yapılmıştır. N/P 0,5 1, 2, 4, 8 10, 20 ve 30 olmak üzere 8 farklı oranda misel/gen kompleksleri hazırlanmış, farklı hidroliz derecelerinin ve N/P oranlarının misel/gen kompleks boyutu ve fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi DLS yöntemi ile analiz edilmiştir. Ayrıca, hazırlama ortamının iyonik gücünün misel/gen komplekslerinin partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, ve stabilitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için kompleksler steril HEPES tamponu (10 mM, pH 7,4) ve ultra saf su olmak üzere iki farklı ortamda hazırlanmıştır. Çeşitli N/P oranlarındaki komplekslerin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyel değerlerine ait sonuçlar Şekil 3.19 ve Şekil 3.20’de verilmiştir.



Şekil 3. 19. a) PPP30 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5’ten 30’a) partikül boyut(nm) analizi b) PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5’ten 30’a) partikül boyut (nm) analizi (n=3, $\bar{x} \pm SS$)



Şekil 3. 20. a) PPP30 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5'ten 30'a) zeta potansiyel (mV) analizi b) PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5'ten 30'a) zeta potansiyel(mV) analizi (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.19a'da görüldüğü üzere 10 mM steril HEPES tamponu içerisinde hazırlanan PPP30 misel/gen komplekslerinin partikül boyutu N/P 0,5'ten N/P 30'a sırasıyla 419 nm ve 165 nm olarak ölçülmüştür. Aynı N/P oranlarında ultra saf su içerisinde hazırlanan formülasyonlar için ise boyutlar 309 nm ve 123 nm olarak belirlenmiştir. Şekil 3.19b'de ise N/P 0,5'ten N/P30'a hazırlanan PPP60 misel/gen kompleksleri için partikül boyutu 10 mM steril HEPES tamponu içerisinde 463,7 nm'den 169,1 nm'ye değişmiş olup, ultra saf su içerisinde hazırlanan kompleksler için bu boyut 209,5 nm'de 151,7 nm'ye düşmüştür. Partikül boyut sonuçları benzer yapıda miseller sistemler ile çalışan Gaspar ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumludur. Araştırmacılar, PEO-PLA-g-PEI polimerler ile hazırladıkları mcDNA ve Doksurubisin yüklü miselplekslerin 190 nm boyut ve 0,3 PDI'ye sahip olduğunu belirtmiştir [179]. PPP60 kopolimeri yapısında daha fazla PEI blok içerdiğinden dolayı, bu blok kopolimer ile hazırlanan misel/gen komplekslerinin partikül boyutları, PPP30 misel/gen komplekslerine göre N/P 8'den N/P 20'ye değişen oranlar arasında daha düşük bulunmuştur. N/P 30 oranında ise her iki PPP30 ve PPP60 komplekslerin boyutları birbirine yakındır. Sonuçlar her iki misel formülasyonunun terapötik BikDD genini etkin bir şekilde kondanse edebildiğini ve en yüksek N/P oranlarında (N/P 30), 165 nm civarında en düşük partikül boyutu ile sıkı kompleksler oluşturabildiğini ortaya koymuştur. Bu sonuçlar N/P oranındaki artışa bağlı olarak misel/gen komplekslerinin partikül büyüklüklerinde kademeli olarak azalma meydana geldiğini göstermiş olup literatür ile uyumlu bulunmuştur. Literatürde, yüksek N/P oranında DNA'nın daha sıkı kondanse edilmesine bağlı olarak düşük partikül boyutunda

komplekslerin elde edildiği işaret edilmektedir. Literatür verilerine göre, artan N/P oranına bağlı olarak katyonik polimer miktarındaki artışın DNA'nın kondensasyonunu arttırdığı belirtilmiştir [15, 50, 92, 206]. En yüksek partikül boyutu HEPES tamponu içerisinde hazırlanan PPP30 misel/gen kompleksleri için N/P 4 oranında, PPP60 misel/gen kompleksleri için ise N/P 2 oranında elde edilmiştir. Bunun nedeni, belirtilen N/P oranlarında kompleksleşmenin meydana gelmeye başlamasıdır. Bu oranlar üzerinde tam bir misel/gen kompleks oluşumu meydana gelirken, bu oran altında henüz bir kompleks oluşumu gözlenmemektedir. Bu N/P oranı üzerinde misel formülasyonları terapötik geni sıkı bir şekilde paketlediği ve partikül boyutunda ciddi bir düşüş meydana getirdiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar, zeta potansiyel ve jel retardasyon analiz sonuçları ile doğrulanmıştır.

Ayrıca ultra saf su ve HEPES olmak üzere iki farklı hazırlama ortamının komplekslerin partikül büyüklüğüne etkisi değerlendirildiğinde, HEPES tamponu içerisinde hazırlanan misel/gen komplekslerinin partikül büyüklükleri, ultra saf su içerisinde hazırlanan formülasyonlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar Jafari ve arkadaşları [192] ve Hao ve arkadaşlarının [208] çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Araştırmacılar, hazırlama ortamının partikül büyüklüğü ve yükü üzerine etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. Analiz için hazırlanan katyonik polimer/siRNA komplekslerinin, çalışmamız ile benzer şekilde suda daha düşük (70 nm), HEPES tamponunda ise 155 nm ile yüksek partikül boyutunda olduğunu göstermişlerdir. İki ayrı ortam içerisinde gözlenen partikül boyut farklılığının nedeni iyonik güçten kaynaklıdır. HEPES tamponu düşük iyonik gücü nedeniyle misel ve gen arasındaki etkileşimi azaltarak misellerin pozitif yükünü düşürür. Böylelikle miseller arasındaki itme kuvvetini azaltarak daha yüksek boyutta partiküllerin oluşmasına neden olur. Ultra saf su içerisinde pozitif yük ile yüklenen partiküller yüksek itme kuvvetinden kaynaklı olarak birbirinden uzaklaşarak düşük partikül boyutunda komplekslerin oluşumuna neden olur [191, 208].

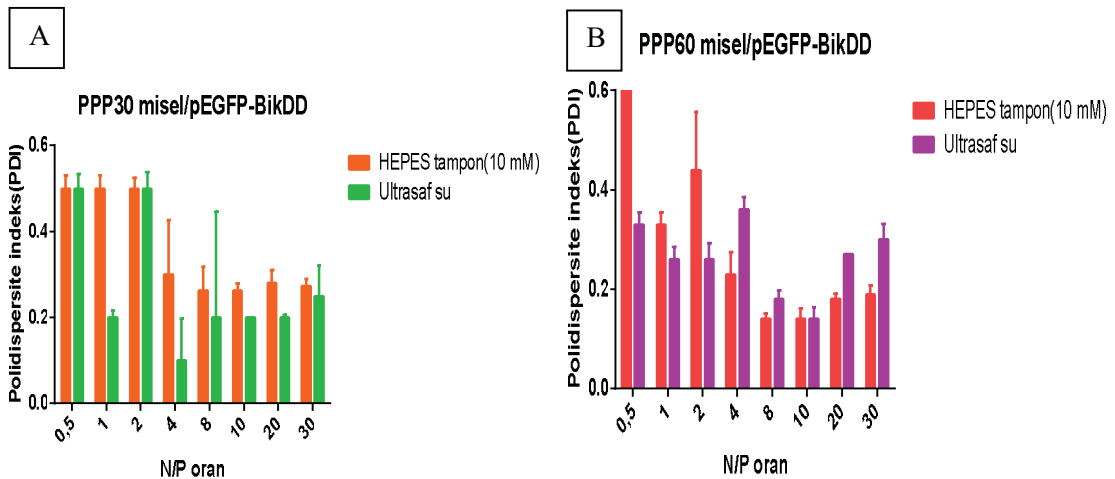
Ön çalışmalar ve nihai formülasyon çalışmaları karşılaştırıldığında, pEGFP-C3 plazmidini ile hazırlanan komplekslerin terapötik gen (BikDD) içeren komplekslere göre daha düşük boyut sergilediği ortaya konulmuştur. Bunun nedeni çıplak pEGFP-C3 plazmidinin baz çifti sayısının daha düşük olması nedeniyle daha sıkı kompleksler oluşturacak şekilde paketlenmesinden kaynaklı olabilir. Ayrıca *in vitro* transfeksiyon çalışmalarında düşük boyutu nedeniyle plazmit DNA yüklü komplekslerinin transfeksiyon etkinliğinin, terapötik gen yüklü komplekslere göre daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

Nanotaşıyıcıların yüzey yükünün, partikül boyutu, stabilite, hücresel alım, sitotoksinite ve biyodağılım üzerine önemli ölçüde etkisi bulunmaktadır [191, 208, 209]. Bu nedenle komplekslerin farklı N/P oranlarına ait zeta potansiyelleri, ultrasaf su ve HEPES tamponu içerisinde değerlendirilmiştir. Şekil 3.20a'da görüldüğü üzere, steril HEPES tamponunda hazırlanan PPP30 misel/gen komplekslerinin zeta potansiyel değerleri N/P 0,5 ile 4 arasında negatif olup, N/P 4 üzerinde oran kademeli olarak +6,2 mV'dan +16,1 mV'ye yükselmiştir. Ayrıca Şekil 3.20b'de görüldüğü üzere, PPP60 misel/gen komplekslerinin zeta potansiyel değerleri ise HEPES tamponu içerisinde N/P 0,5 ile 2 arasında negatif olup, N/P 4 oranında nötr yükte tayin edilmiştir. N/P oranı 4 ve üzerine çıktığında miseller pozitif yük ile yüklenmiş ve en yüksek N/P 30 oranında +20,1 mV olarak kaydedilmiştir. Misel/gen komplekslerinin en yüksek N/P oranındaki (N/P 30) zeta potansiyel değerlerine ait sonuçlar ± 30 mV olarak kabul edilen kolloidal stabilite için gerekli değer aralığı ile son derecede uyumlu bulunmuştur. Negatif zeta potansiyel değerleri misellerin terapötik geni etkin bir şekilde kondanse edemediğini göstermiş olup sonuçlar partikül büyüklüğü ve jel retardasyon analizlerini doğrulamıştır [210]. Nötr yüzey yüküne sahip N/P oranındaki formülasyonların yüzey yükü ile partikül boyutu sonuçları arasında anlamlı bir ilişki bulunduğu ortaya konulmuştur. Nötr yüzey yükü, partiküller arasındaki itme kuvvetini azaltarak misel/gen komplekslerinin agregasyonuna yol açmış ve böylelikle büyük partiküllerin oluşmasına neden olmuştur. Bu bulgu, Jeong ve arkadaşlarının çalışmalarında elde ettikleri sonuçlar ile doğrulanmıştır [50].

Ultra saf su içerisinde hazırlanan her iki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin tüm N/P oranlarının yüzey yük sonuçları değerlendirildiğinde, HEPES ortamında elde edilen sonuçlar ile benzer bir şekilde, N/P oranındaki artışa bağlı olarak zeta potansiyel değerlerinde artış gözlenmiştir. PPP30 misel/gen ve PPP60 misel/gen kompleksleri en yüksek N/P oranında (N/P 30) sırasıyla 33,7 mV ve 41,3 mV olarak yüksek pozitiflikte tayin edilmiştir. Sonuçlar, N/P oranında meydana gelen artışa bağlı olarak zeta potansiyelin kademeli olarak arttığını göstermiş ve elde edilen bu sonuçların partikül boyutu bulgularını son derece desteklemiş olduğu ortaya konulmuştur. Ultra saf su içerisinde yüksek pozitif yük ile yüklenen misellerin itme kuvvetindeki artış, partiküllerin agregasyonunu engelleyerek düşük partikül boyutunda kompleks oluşumuna neden olmuştur. Hao ve arkadaşları [208], hazırlama ortamının katyonik polimer-DNA kompleksinin boyut ve yük üzerine etkisini incelemiştir. Araştırmacılar, komplekslerin suda ve %5 glikoz çözeltisi içerisinde yüksek zeta potansiyel ve düşük partikül boyutuna

sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bunun aksine PBS, DMEM ve tuz çözeltisi içerisinde zeta potansiyelin düşmesine bağlı olarak partiküllerin agregasyona uğradığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar bizim bulgularımız ile uyumludur ve ortamdaki iyonların komplekslerin boyutunu ve yükünü değiştirebileceğini göstermiştir.

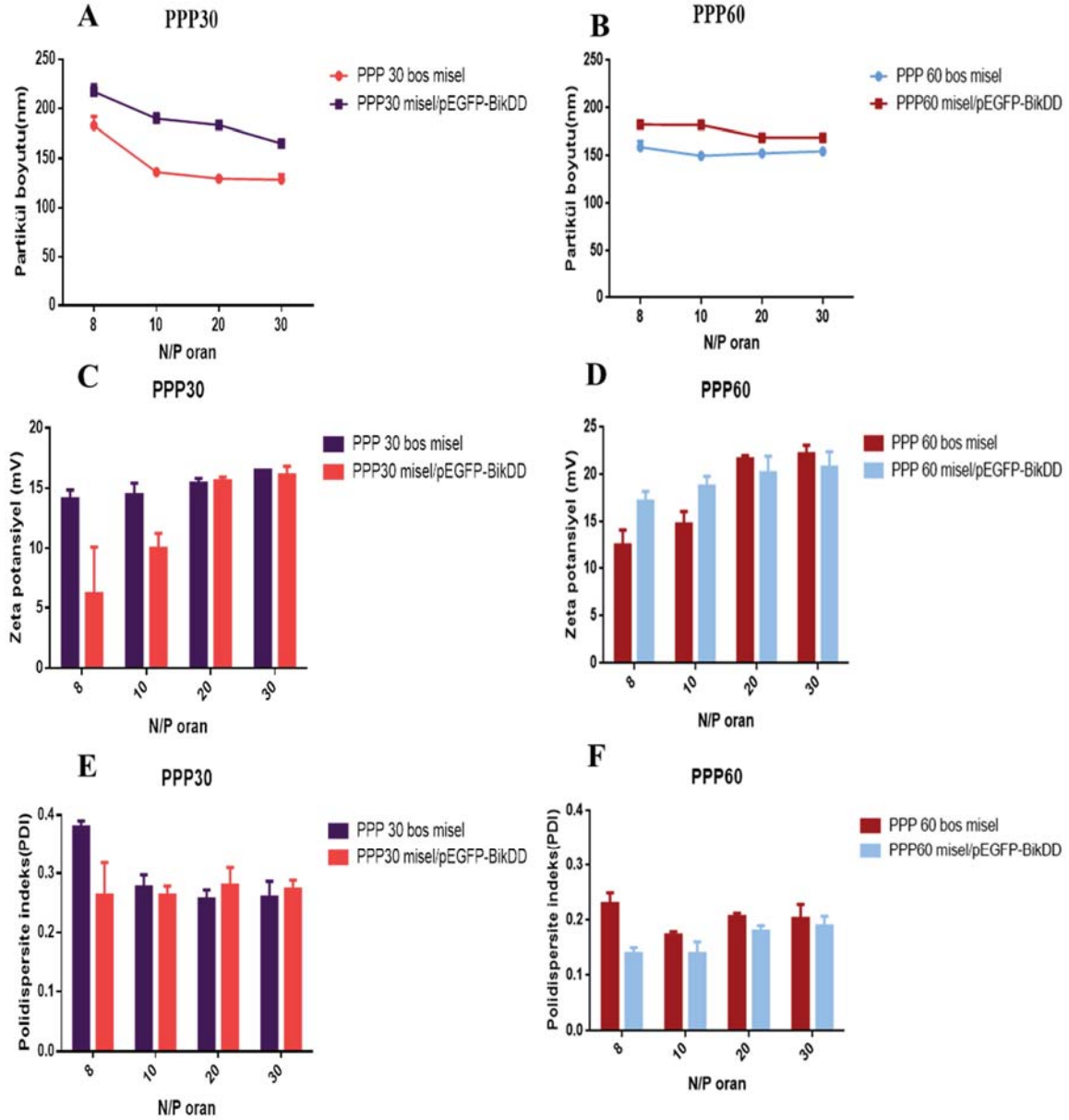
Ultra saf su içerisinde hazırlanan misel/gen komplekslerinin partikül boyutu nispeten düşük olmasına rağmen, komplekslerin çok yüksek pozitif yük taşıması yüksek hücresel toksisiteye sebebiyet vereceğinden ve partiküllerin kolloidal stabilite için gerekli zeta potansiyel değerleri aralığında olmamalarından dolayı kompleksler ultra saf su içerisinde hazırlanmamıştır. Ayrıca genlerin su içerisindeki stabilitesi uzun vadede düşüktür bu nedenle hücre kültür çalışmalarında komplekslerin stabilitesini koruyabilmesi adına HEPES tamponu içerisinde hazırlanmasına karar verilmiştir. HEPES tamponu hücre kültür çalışmaları için uygun bir ortam ve fizyolojik pH (pH 7,4) sağlaması nedeniyle yaygın kullanılan bir tampon çözeltidir ve misel/gen kompleksleri hücresel çalışmalarda kullanıma uygun duruma getirmektedir [49, 208, 210]. BikDD genlerinin stabilitesi ve formülasyonların hücresel biyouyumluluğu da göz önünde bulundurularak, tez çalışmamız kapsamında misel/gen komplekslerinin steril HEPES tamponu (10 mM, pH 7,4) içerisinde hazırlanmasına karar verilmiştir. Bu nedenle tez çalışmasının sonraki tüm aşamalarında kullanılmak üzere hazırlanan formülasyonlarda steril HEPES tamponu kullanılmıştır. Misel/gen komplekslerinin polidispersite indeksi fizikokimyasal karakterizasyon başlığı altında değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 3.21’de verilmiştir.



Şekil 3. 21. a) PPP30 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5’ten 30’a) polidispersite indeks (PDI) analizi b) PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin ultra saf su ve HEPES tamponundaki (pH 7,4, 10 mM) çeşitli N/P oranlarında (0,5’ten 30’a) polidispersite indeks (PDI) analizi (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Polidispersite indeksi çözelti içerisindeki partiküllerin stabilitesi ve homojen dağılımını gösteren bir ölçüttür. Tez çalışmamızda misellerin sulu çözeltiler içerisinde agregasyona uğramadan stabil bir şekilde kalabildiği polidispersite indeks analizi ile tayin edilmiştir. Şekil 3.21a, PPP30 misel/BikDD gen komplekslerinin polidispersite indeks değerlerine ait sonuçları göstermektedir. Ultra saf su içerisinde hazırlanan farklı N/P oranlarındaki misel komplekslerinin polidispersite indeksi, N/P 4 oranı altında 0,5 civarında iken, N/P 4 ve üzerindeki oranlarda 0,2 civarında seyretmiştir. Steril HEPES tamponu içerisinde ise bu oranın 0,3 ile 0,2 arasında değiştiği belirlenmiştir. Şekil 3.21b’de gözlemlendiği üzere, HEPES tamponu içerisinde hazırlanan PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin polidispersite indeksleri N/P 8 ve üzerindeki oranlarda 0,1- 0,2 olup, PPP30 komplekslerine göre düşük bulunmuştur. Tüm sonuçlar, N/P oranının partikül boyutu, zeta potansiyel ve PDI üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermiştir. Hazırlama ortamına göre polidispersite indeks değerlerinde değişiklikler gözlenmekle birlikte, genellikle komplekslerin oluştuğu N/P oranı üzerinde misel/gen formülasyonlarının homojen bir dağılım sergilediği ve agregasyona uğramadan stabil şekilde kalabildiği ortaya konulmuş olup taşıyıcı sistemin başarısını göz önüne sermiştir.

Tez çalışmamız kapsamında, BikDD yüklü miseller ile birlikte boş misellerin de *in vitro* sitotoksitesi değerlendirildiğinden, partikül boyutu, zeta potansiyel ve polidispersite indeks sonuçları önem taşımaktadır. Bu doğrultuda, BikDD geni yüklenmemiş boş PPP30 ve PPP60 misellerinin kompleks oluşturduğu belirlenen N/P oranları arasından seçilen 4 farklı N/P oranındaki formülasyonları, BikDD gen yüklü formülasyonları ile fizikokimyasal özellikleri bakımından kıyaslanmış ve sonuçlar Şekil 3.22’de verilmiştir.



Şekil 3. 22. Farklı N/P oranlarında hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen kompleksleri ile boş misel formülasyonlarına ait fizikokimyasal analiz sonuçları (a ve b) Boş ve BikDD yüklü PPP30 ve PPP60 misellerinin partikül boyutu (nm), (c ve d) Boş ve BikDD yüklü PPP30 ve PPP60 misellerinin zeta potansiyeli (mV), (e ve f) Boş ve BikDD yüklü PPP30 ve PPP60 misellerinin polidispersite indeksi (PDI) (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.22a ve b’de görüldüğü üzere, farklı N/P oranlarındaki her iki PPP30 ve PPP60 misel/gen kompleksleri, BikDD geni yüklenmemiş boş formülasyonları ile kıyaslandığında partikül boyutları yüksek bulunmuştur. PPP30 misel/BikDD gen komplekslerinin en yüksek N/P 30 oranındaki partikül boyutu 165 nm iken, PPP30 boş misellerin boyutu 128 nm, PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin N/P 30 oranındaki partikül boyutu 169 nm iken, PPP60 boş misellerin boyutu ise 154 nm olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar, yapıya

terapotik genin yüklenmesi ile misellerin partikül boyutunun bir miktar arttığını ortaya koymuştur. Ancak gen yüklü misel formülasyonlarında, N/P oranının artışına bağlı olarak partikül boyutunda azalma tayin edilmiştir. Bunun nedeni, daha önce belirtildiği gibi, miselleri oluşturan blok kopolimer yapısında bulunan katyonik PEI polimerinin artan N/P oranına bağlı olarak formülasyondaki miktarının artışı ile terapötik gen ile daha sıkı kompleks oluşturması ve böylece partikül boyutunun düşmesinden kaynaklıdır. Şekil 3.22c ve d’de görüldüğü üzere, zeta potansiyel değerleri analiz edilen gen yüklü komplekslerin tüm N/P oranlarında pozitif olup, artan N/P oranına bağlı olarak komplekslerin yüzey yükü kademeli olarak artmıştır. Ancak boş misellerin zeta potansiyel değerleri BikDD yüklü misellere göre daha yüksek tespit edilmiştir. Bunun nedeninin, katyonik polimerden kaynaklı pozitif yükün, negatif yüklü BikDD geni ile kondanse edilmesine bağlı olarak belli oranda yükünün nötrlenmesinden dolayı olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca yüksek hidroliz derecesinde ve artan N/P oranında misel/gen komplekslerinin zeta potansiyelinde meydana gelen artış, polimer omurgasında bulunan PEI kaynaklı pozitif yükün BikDD geni ile tam kompleksleşmesi sonrasında dahi yapıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. DLS sonuçlarına göre boş misel ve misel/gen komplekslerinin polidispersite indeksleri birbirine yakın bulunmuştur. Yapıya terapötik genin eklenmesi komplekslerin homojen dağılımlarını etkilememiştir. Böylece boş misellere yüklenen genlerin formülasyonda herhangi bir agregasyona yol açmadığı ortaya konulmuştur.

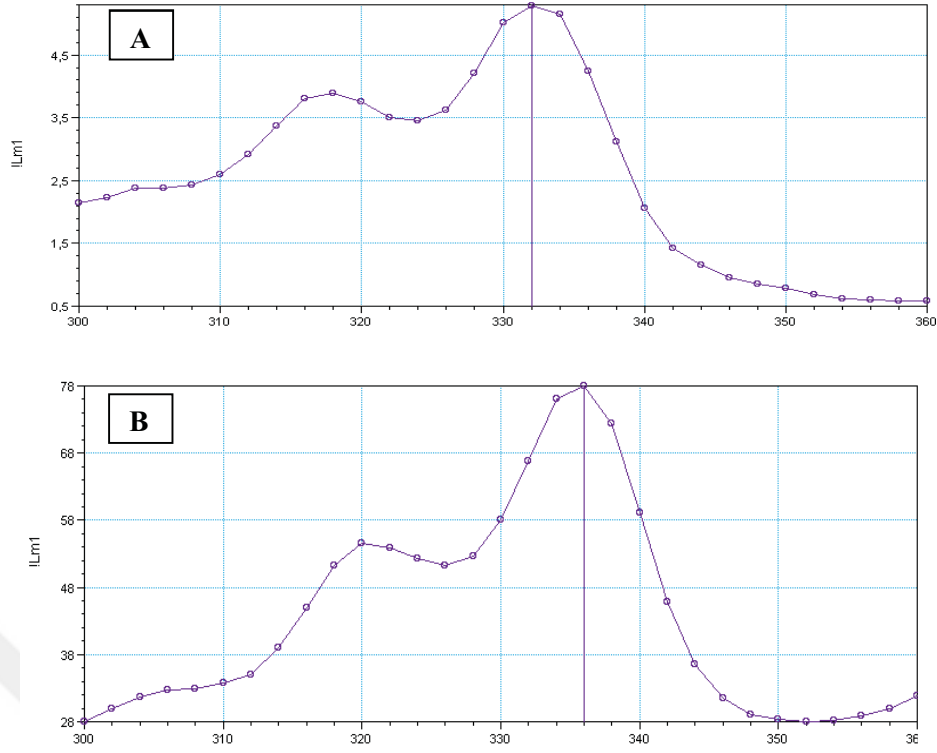
Misel boyutu hücre içerisine gen ve ilaç aktarımında önemli bir parametredir. Genel olarak 200 nm’den düşük boyutlu misellerin retiküloendotelyal sistem tarafından düşük alımı, yüksek renal atılımı ve EPR etkisi ile pasif tümör hedeflendirmeye uygun olduğu ifade edilmektedir [132, 178]. Bu özellikteki miseller uzun süreli kan dolaşımı ve ilgilenilen bölgeyi hedeflemek açısından oldukça yeteneklidir.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan tüm misellerinin boyutları sonuçlardan da görülebileceği üzere, biyolojik uygulamalar için arzu edilen bir boyuta sahip olup, 200 nm’nin altındadır. Bu düşük boyut özellikle misel/gen komplekslerinin *in vivo*’da EPR etkisi ile pasif hedeflenebileceğini ve PEO tabanlı yapısı ile kan dolaşımında kalış süresinin uzatılabileceği fikrini desteklemektedir. Ayrıca sonuçlar blok kopolimerin kendiliğinden miseller yapıya düzenlenebildiğini, pozitif yüke sahip olduğunu ve terapötik genin polimerik miseller ile başarılı bir şekilde kondanse olabileceğini ortaya koymuştur. Pozitif yükü nedeniyle PEO tabanlı polimerik miseller negatif yüklü membranlar ile etkileşimi kolaylaştırarak hücresel alımı önemli ölçüde arttıracaklarını düşündürmektedir.

3.3.4. Kritik Misel Konsantrasyonu (KMK) ile Misel Oluşumunun Belirlenmesi

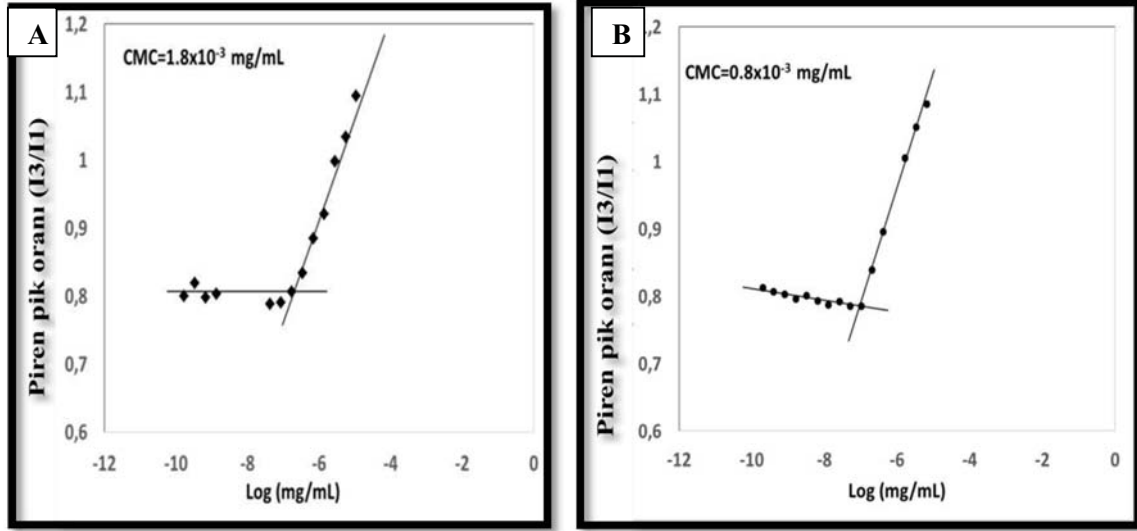
Farklı hidroliz derecelerindeki amfifilik blok kopolimerlerin misel oluşturma yetenekleri kritik misel konsantrasyonu analizi ile belirlenmiştir. Kritik misel konsantrasyonu blok kopolimerin misel oluşturabildiği minimum konsantrasyon olarak ifade edilmektedir [188]. Tez çalışmamız kapsamında kritik misel konsantrasyonu, hidrofobik bir prob olan pirenin kullanımına dayalı standart floresan bir yöntem ile tayin edilmiştir. Piren molekülü misel oluşumuna bağlı olarak hidrofobik çekirdek içerisine hapsolmakta ve floresan şiddetinde değişiklikler meydana gelmektedir. Bu floresan değişiminden yararlanarak misellerin KMK'sı belirlenmektedir.

Tez çalışmamızda, öncelikle hidroliz edilmemiş 8 farklı blok uzunluğundaki PEO-*b*-PCL blok kopolimeri ile hazırlanan miseller arasından uygun partikül boyutu, zeta potansiyel ve PDI değerine sahip olan misellerin hazırlanmasında kullanılan PEO₁₀₇₀₀-*b*-PCL₂₁₀₀ blok kopolimerinin KMK'sı tayin edilmiştir. Sonrasında bu blok kopolimerin hidrolizi ile sentezlenen optimum özellikte olduğu belirlenen PPP30 ve PPP60 blok kopolimerlerin misel oluşturma yetenekleri tayin edilmiştir. Bölüm 2.2.5.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan konsantrasyon aralığında çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Öncelikle pirenin su ve organik THF çözücüsü içerisinde 300–360 nm dalga aralığındaki maksimum eksitasyon dalga boyu belirlenmeye çalışılmıştır. Literatür verilerine göre piren için maksimum eksitasyon suda (I1) 334 nm olup organik çözücü içerisinde ise bu değer (I3) 337 nm'ye kaymaktadır [188]. Bizim çalışmamızda da bu değerlere yakın olmak üzere I1, 332 nm ve I3, 336 nm olarak tayin edilmiş ve Şekil 3.23'te sonuçlar verilmiştir. Sudaki pirenin floresan eksitasyonun maksimum piki 332 nm'de kaydedilmiş olup, organik çözücü ortamında bu pikin 336 nm'ye kaydığı görülmüştür. Misel oluşumuna bağlı olarak pirenin sudaki floresan şiddetinde meydana gelen ani düşüş noktası KMK olarak tayin edilmiştir. Bu noktadaki absorbansa karşılık gelen konsantrasyon KMK olarak belirlenmiş ve piren molekülünün sulu çözeltiden miseller çekirdeğe hapsediğini ve dolayısıyla misel oluştuğunu ortaya koymuştur.



Şekil 3. 23. a) Ultra saf su içerisindeki pirenin 332 nm’deki eksitasyonu b) Organik çözücü içerisindeki pirenin 336 nm’deki eksitasyonu

Eksitasyon verilerine göre I1 (332 nm) ve I3 (336 nm)’de elde edilen I3/I1 piklerinin oranlanmasıyla, konsantrasyon grafikleri çizilmiş ve floresan şiddetindeki ani düşmenin gözlemlendiği derişim ya da başka bir ifade ile I3/I1 oranındaki ani artışın meydana geldiği konsantrasyon KMK olarak belirlenmiştir. Misel oluşumu sırasında çekirdeğe hapsolan pirenin eksitasyon ve emisyon piklerinde azalma, I3/I1 değerinde artış meydana gelir. Hidroliz edilmemiş blok kopolimer için bu konsantrasyon $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-7}$ mg/mL aralığında elde edilmiş olup, hidrolize PPP30 blok kopolimer için kritik misel konsantrasyonu $1,8 \times 10^{-3}$ mg/mL, PPP60 blok kopolimer için ise bu değer $0,8 \times 10^{-3}$ mg/mL olarak tayin edilmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3. 24. a) PPP30 blok kopolimerine ait kritik misel konsantrasyon grafiği, b) PPP60 blok kopolimerine ait kritik misel konsantrasyon grafiği

Elde edilen sonuçlar iki farklı hidroliz derecesindeki blok kopolimerin düşük konsantrasyonlarda dahi etkili bir şekilde miseller yapıya kendiliğinden düzenlenebildiğini ortaya koymuştur. Böylelikle kopolimer sulu çözeltide çözüldüğünde, hidrofobik PCL polimeri kendiliğinden moleküler etkileşimler ile hidrofobik bölgeyi oluştururken, hidrofilik PEtOx zincirleri misel kabuğunu oluşturmaktadır. PPP60 misellerin PPP30 misellere daha düşük KMK sergilemesinin nedeni, daha yüksek oranda PEI üniteleri içermesinden dolayı blok kopolimerin hidrofobisitesinde meydana gelen artışa bağlı olarak daha düşük konsantrasyonda misel oluşturması ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [188]. Zira bu sonuçlar Lee ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarını doğrular nitelikte olup, araştırmacılar hidrofobik blok uzunluğunda meydana gelen artışın partikül boyutunda artışa neden olduğunu ancak kritik misel konsantrasyonunda düşüşe neden olduğunu ortaya koymuştur [196].

Ayrıca elde edilen bu düşük KMK değeri, düşük moleküler ağırlığa sahip geleneksel bir yüzey aktif madde olan SDS ile kıyaslandığında çok daha düşük bulunmuştur. SDS için bu değerin 2,3 g/L olduğu düşünüldüğünde, PEtOx-*ko*-PEI-*b*-PCL blok kopolimerlerine ait KMK değerleri 1000 kat daha düşüktür [188].

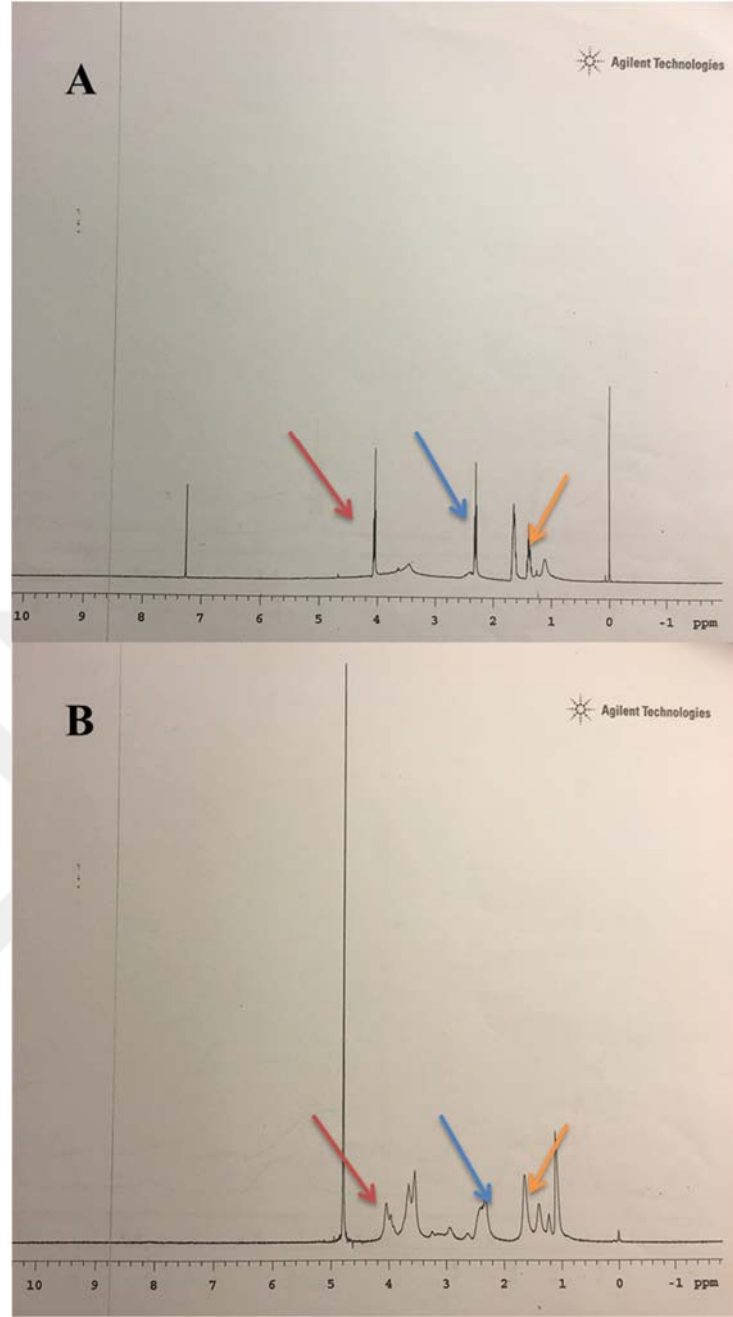
Bu blok kopolimerler yeni bir sentez ürünü olduklarından dolayı literatürde bire bir yapıyı temsil eden bir polimere rastlanmamaktadır ancak Gaspar ve arkadaşları tarafından çalışılan benzer yapıdaki bir PEtOx-PLA-g-PEI polimeri için bu değer 1.63×10^{-2} mg/mL ve PEtOx-PLA-g-PEI-SS polimeri için ise 6.35×10^{-3} mg/mL olarak tayin edilmiştir. Bu

bulgular ile kıyaslandığında çalışmada kullanılan blok kopolimerlerin KMK değerleri çok daha düşük bulunmuş ve sonuçlar sistemin başarısını ortaya koymuştur [178, 179].

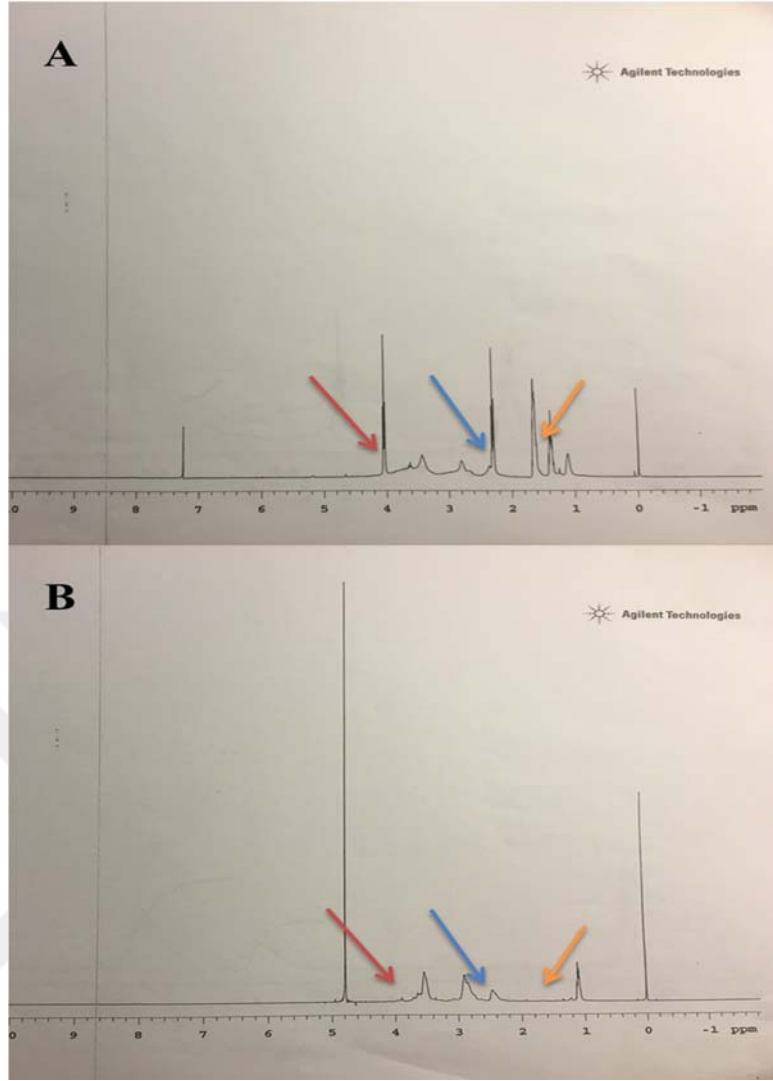
Miseller, kan dolaşımında yüksek oranda dilüsyona uğradığından, bu formülasyonların en büyük problemi stabilitedir. Bu nedenle sistemin kolloidal ve termodinamik stabiliteleri kritik misel konsantrasyonlarına göre değerlendirilmektedir. KMK misellerin kan dolaşımındaki stabilitesinin bir göstergesidir. Çünkü intravenöz olarak uygulanan her formülasyon kanda 25 ile 40 kat arasında yüksek bir seyrelmeye uğramaktadır. KMK analizi sonucu blok kopolimerlerden elde edilen düşük KMK değerleri, misel formülasyonlarının kan dolaşımına uygulandıktan sonra seyrelmeye karşı dayanıklı kalarak stabilitelerini koruyacaklarını göstermektedir [212]. Bu sayede PEtOx tabanlı misellerin kan dolaşımında uzun süre kalarak taşıdığı genetik materyali hedef bölgeye ulaştırabilecek verimli ve ideal bir gen taşıyıcı sistem olabileceği ortaya konulmuştur.

3.3.5. ¹H-NMR Analizi ile Misel Oluşumunun Doğrulanması

¹H-NMR organik bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan H protonun tayinine dayalı bir analiz yöntemi olup, bileşiğin uç gruplarında gerçekleşen kimyasal dönüşüm hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu özelliği nedeniyle ¹H-NMR spektrumları misellerin oluşumuna dair sağlam kanıtlar vermektedir. Bu yöntem ile misel oluşumunun tayinine ilişkin literatürler mevcuttur [189, 212]. Bu nedenle, tez çalışmamızda seçilen iki farklı hidroliz derecesindeki PPP30 ve PPP60 blok kopolimerlerinin misel oluşturma yetenekleri ¹H-NMR analizi ile doğrulanmıştır. Geliştirilen misellerin ¹H-NMR analizi öncesinde, stabilitelerini arttırmak amacıyla liyofilizasyonu gerçekleştirmiştir. Blok kopolimerler döterlenmiş kloroform (CDCl₃) ve aynı blok kopolimerler ile hazırlanan liyofilize miseller döteryumlu su (D₂O) içerisinde redisperse edilmiş ve ¹H-NMR spektrumları karşılaştırılarak spesifik piklerdeki değişikliklerin analizi ile misel oluşumu doğrulanmıştır (Şekil 3.25 ve Şekil 3.26).



Şekil 3. 25. a) PPP30 blok kopolimerine ait ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃ içerisinde) b) PPP30 blok kopolimeri ile hazırlanan misel formülasyonuna ait ¹H-NMR spektrumu (D₂O içerisinde) (Kırmızı ok, PCL ait CH₂-O piki, mavi ok, CH₂C=O piki ve sarı ok, CH₂-O piki ifade etmektedir).



Şekil 3. 26. a) PPP60 blok kopolimerine ait ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3 içerisinde) b) PPP60 blok kopolimeri ile hazırlanan misel formülasyonuna ait ^1H -NMR spektrumu (D_2O içerisinde) (Kırmızı ok, PCL ait $\text{CH}_2\text{-O}$ piki, mavi ok, $\text{CH}_2\text{C=O}$ piki ve sarı ok, $\text{CH}_2\text{-O}$ piki ifade etmektedir).

Misel oluşumunun en büyük kanıtı hidrofobik PCL polimerine ait ^1H -NMR piklerinin, su içerisinde çekilen ^1H -NMR spektrumunda kaybolması ve şiddetinin azalmasıdır. Misel formülasyonlarının, ^1H -NMR analizi sırasında tüm protonlarının tayin edilebilmesi için, formülasyonlar için iyi bir çözücü olan D_2O içerisinde dispersiyonları hazırlanmıştır. Blok kopolimerler ise CDCl_3 içerisinde çözülmüştür. Çünkü D_2O , blok kopolimer için zayıf bir çözücüdür. CDCl_3 içerisinde çözülen iki farklı hidroliz derecelerindeki $\text{PEtOx-ko-PEI-b-PCL}$ blok kopolimerlerine ait karakteristik pikler net bir şekilde Şekil 3.25a ve 3.26a'da gözlenmiştir. Böylece blok kopolimerin moleküler düzeydeki tüm yapıları karakteristik pikler ile analiz edilebilmiştir. Şekil 3.25a ve 3.26a'da verilen blok kopolimerlere ait ^1H -NMR spektrumlarında kırmızı ok ile işaret edilen 4,0 ppm'deki ($\text{CH}_2\text{-O}$), mavi ok ile gösterilen 2,2-2,3 ppm'deki C=O ile bağlantılı metilen piki ($\text{CH}_2\text{C=O}$), sarı ok ile

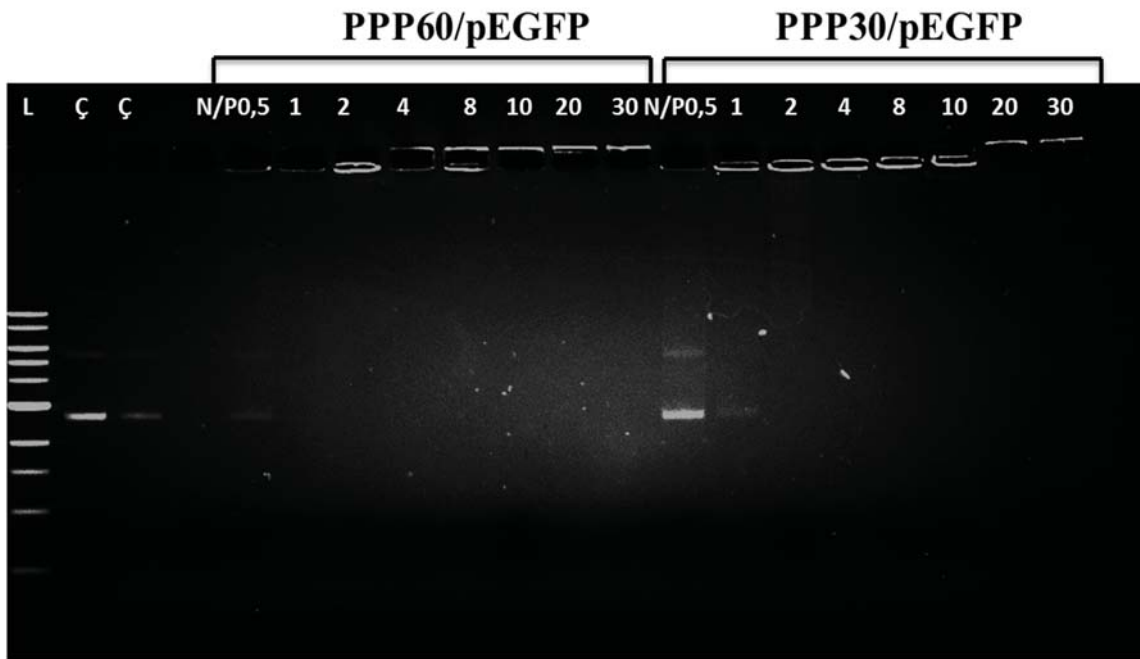
gösterilen 1,3-1,4 ppm arasındaki ve 1,6-1,7 ppm arasındaki (CH_2) pikler PCL polimerindeki karakteristik proton rezonanslarına aittir. D_2O 'da disperse edilen misellere ait 3.25b ve 3.26b'deki ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde, hidrofobik blok olan PCL polimerine ait karakteristik 4,0 ppm'deki pikin kaybolduğu veya şiddetinin azaldığı ve sadece PEtOx'a ait piklerin korunduğu tayin edilmiştir. Bu sonuçlar su içerisinde misel oluşumuna bağlı olarak, hidrofobik PCL bloğun misel çekirdeği içerisine konumlandığını ve bu nedenle D_2O 'da PCL'nin spesifik piklerine rastlanmadığını ortaya koymuştur. PEtOx polimeri misel kabuğunu oluşturmuş ve hidrofilik yapısından dolayı döterlenmiş su içerisinde spesifik pikleri tayin edilmiştir. Elde edilen bu bulgular misel oluşumunu başarılı bir şekilde kanıtlamış ve literatür verileri ile doğrulanmıştır. Chen ve arkadaşları [213], hidrofilik poli(N-isopropilakrilamit) (PNIPAAm) blok ve 3 hidrofobik poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) ile sentezledikleri yıldız şekilli blok kopolimerin misel oluşturma yeteneğini ^1H -NMR analizi ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, PCL bloğunun misellerin çekirdeğini oluşturmak üzere iç kısımda konumlanması sonucu spesifik proton piklerinin kaybolması ile misel oluşumunu doğrulamışlardır. Li ve arkadaşları da benzer yapıdaki bir blok kopolimer ile misel oluşumunu PCL bloğunun ^1H -NMR analizi ile ortaya koymuştur [190].

3.3.6. Misel/Gen Kompleks Oluşumunun Jel Retardasyon Analizi ile Değerlendirilmesi

Gen taşıyıcı sistemin, terapötik geni etkili ve stabil bir şekilde hedef bölgeye aktarabilme başarısı, geni sıkıca paketleyerek kompleks oluşturabilme yeteneğine bağlıdır [67]. Başarılı bir kompleksleşme, gen transfeksiyon ve hücre alım çalışmaları için önemli bir adımdır. Bu nedenle tez çalışmamızda plazmit DNA (pDNA) ve terapötik genin, miseller ile kompleks oluşturma yetenekleri agaroz jel elektroforezine bağlı jel retardasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Miseller ile pDNA'nın elektrostatik olarak kompleksleşmesi için, polimerik miselleri oluşturan blok kopolimer zincirinde pozitif yük taşıması önemli bir kriterdir. PEI, pDNA'yı kondanse ederek nanoboyutta kompleksler oluşturmada yaygın olarak kullanılan yüksek katyonik yüklü bir polimerdir [214]. Ancak yüksek katyonik yükü nedeniyle hücre toksisitesinin de yüksek olduğu bildirilmiştir [93]. Bu nedenle PEI'nin hücre sitotoksitesini azaltmak ve transfeksiyon etkinliğini arttırmak için çalışmamızda PEtOx'un kısmi hidrolizi ile iki farklı oranda (%30 ve %60) lineer PEI içeren blok kopolimerler sentezlenmiş ve miseller hazırlanmıştır. Farklı moleküler ağırlıkta PEI içeren blok kopolimerler ile hazırlanan misellerin pDNA ve terapötik gen ile kompleks oluşturma yetenekleri, hidroliz dereceleri açısından karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Bu amaçla PPP30 ve PPP60 polimerik misellerin pDNA ve terapötik BikDD geni ile kompleks oluşturma yetenekleri 8 farklı N/P oranlarında hazırlanan kompleksler ile jel retardasyon analizi sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. N/P oranları, PEI üzerindeki pozitif yüklü amin (N) gruplarının, plazmit DNA üzerindeki negatif yüklü fosfat (P) gruplarının sayısına oranı ile hesaplanmıştır. Blok kopolimerin amin içeriği, plazmit DNA ile etkileşim için çok önemli bir faktördür. Katyonik polimerler yapılarındaki amin grupları ile pDNA'nın fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşime dayalı olarak kompleksleşmekte ve pDNA'nın negatif yükü, pozitif yüklü polimer ile nötralize edilmektedir [86, 214].

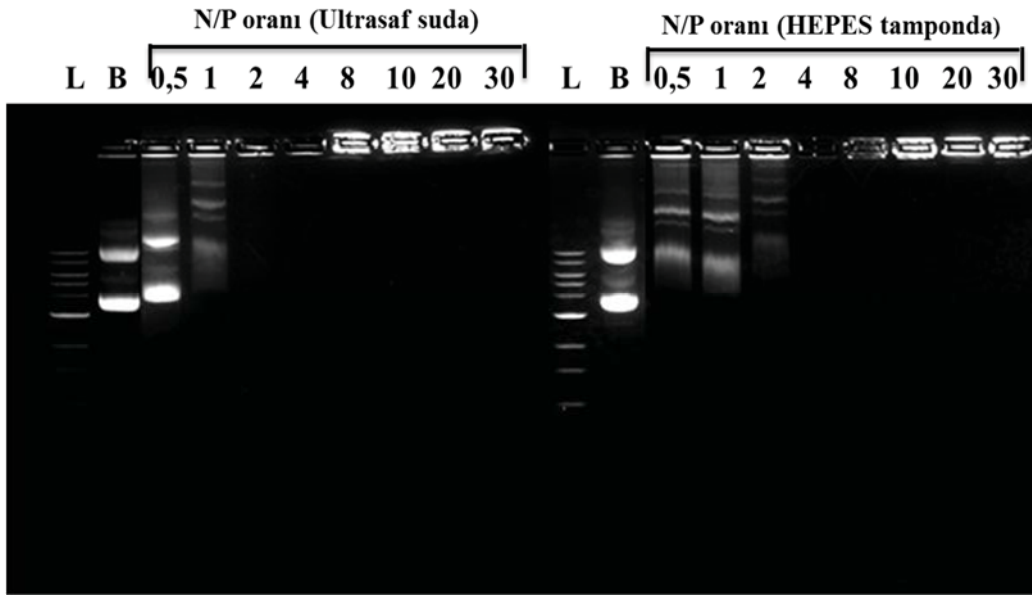
Terapötik gen ile kompleks oluşumu değerlendirilmeden önce, plazmit DNA (pEGFP-C3) ile misellerin kompleks oluşumunu belirlemek üzere ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Bölüm 2.2.3.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kompleksler %0,8 agaroz jelde yürütülmüş ve görüntüleme sonrası analiz edilmiştir (Şekil 3.27). Kompleksleşmenin hangi N/P oranında meydana geldiği, jel üzerinde serbest DNA'ya ait bir bant profili tespit edilmediği oranın belirlenmesi ile tayin edilmiştir. Tam bir kompleksleşme, katyonik yapıdaki misellerin negatif yüklü pDNA'yı tam kondanse etmesine bağlı olarak jel üzerindeki hareketini engellemesi ile meydana gelmektedir. Böylece, kompleksleşmenin meydana geldiği N/P oranında jel üzerinde DNA'ya ait bant profilinin gözlenmemesi beklenmektedir.



Şekil 3. 27. pEGFP-C3 ile hazırlanan misel/DNA komplekslerinin jel elektroforez görüntüsü (L: Standart DNA (1 kb), Ç: pEGFP-C3)

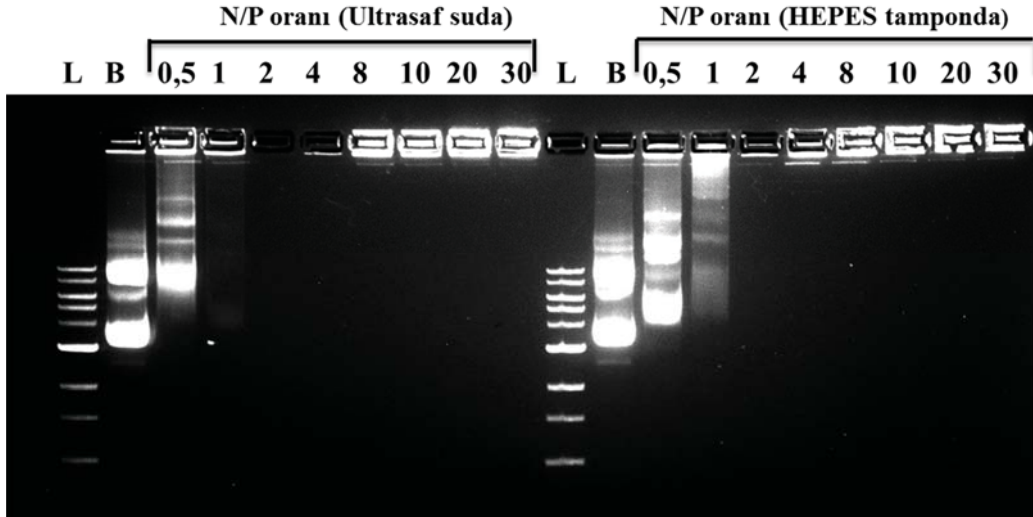
0,5'ten 30'a 8 farklı N/P oranında ultra saf su içerisinde hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/DNA kompleksleri ile yapılan ön denemeler ile elde edilen sonuçlar PPP30/pEGFP komplekslerinin N/P 2 oranında, PPP60 misel/pEGFP komplekslerinin ise N/P 1 oranında oluştuğunu göstermektedir. Bu N/P oranları üzerinde, jel üzerinde serbest pDNA tespit edilememiştir. Ön denemeler ile kompleks oluşumu için gerekli N/P oranı belirlendikten sonra terapötik BikDD geni ile iki farklı ortamda hazırlanan misel/gen komplekslerinin jel retardasyon analizi yapılmıştır. Misel/gen komplekslerinin partikül büyüklüğü HEPES tamponu ve ultra saf su olmak üzere iki farklı ortamda değerlendirildiğinden dolayı, kompleks oluşum yetenekleri de iki ayrı ortam için jel reterdasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

HEPES tamponu ve ultra saf su içerisinde hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerine ait jel görüntüleri Şekil 3.28 ve şekil 3.29'da verilmiştir.



Şekil 3. 28. Steril HEPES tamponu (10 mM, pH 7,4) ve ultra saf su içerisinde çeşitli N/P oranlarında hazırlanan PPP30 misel/gen komplekslerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. L: Standart DNA (1 kb), B: Serbest pEGFP-BikDD geni (1 µg)

Şekil 3.28'deki PPP30 misel/gen kompleks oluşumuna dair jel görüntüsü incelendiğinde, ultra saf su içerisinde hazırlanan misellerin daha düşük bir N/P oranında pDNA ile kompleksleştiğini ortaya koymuştur. Ultra saf su içerisinde hazırlanan kompleksler N/P 2 oranında, HEPES tamponunda hazırlanan miseller ise N/P 4 oranından itibaren tam bir kompleks oluşumu sergilemiştir.



Şekil 3. 29. Steril HEPES tamponu (10 mM, pH 7,4) ve ultra saf su içerisinde çeşitli N/P oranlarında hazırlanan PPP60 misel/gen komplekslerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. L: Standart DNA (1 kb), B: Serbest pEGFP-BikDD (1 µg)

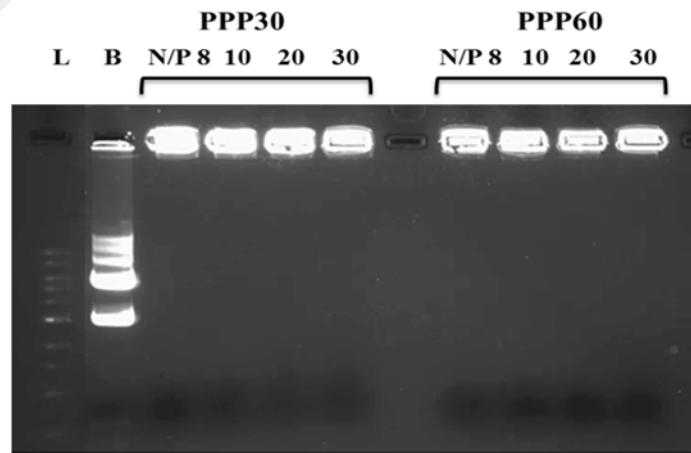
PPP60 misel/gen kompleks oluşumuna dair jel görüntüsü incelendiğinde, N/P 1'den itibaren ultra saf suda, N/P 2 oranından itibaren ise HEPES tamponunda tam bir kompleksleşmenin meydana geldiği ortaya konulmuştur. Kompleksleşmenin gerçekleşmediği oranlarda jel üzerinde net bir şekilde gene ait serbest bant profillerine rastlanmıştır.

Elde edilen tüm sonuçlar blok kopolimerdeki PEI oranının ve kompleks hazırlama ortamının kompleks oluşumu üzerinde etkisi olduğunu göstermiştir. HEPES tamponunda hazırlanan misellerin daha yüksek N/P oranında terapötik gen ile kompleks oluşturduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni, kompleks oluşumu sırasında HEPES tamponundan kaynaklı iyonik yüklerin misel ve DNA arasına yerleşerek, misellerin pozitif yükünü azaltmasından dolayı, pDNA ile daha geç etkileşim sergilemekte olduğunu, ancak ultra saf su içerisinde hazırlanan misellerin, su içerisindeki hidrojen iyonu yoğunluğundan kaynaklı olarak daha yüksek pozitif yük ile yüklendiğinden dolayı, pDNA'yı düşük oranlarda dahi kondanse edebildiği sonucu ile ilişkilendirilmiştir [191, 208]. pEGFP ve pEGFP-BikDD genleri ile hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerin, ultra saf su içerisinde hazırlanan formülasyonları ile aynı N/P oranında kompleksleşmenin meydana geldiği ortaya konulmuştur. Bunun nedeni pEGFP-C3 ile BikDD geni sokulmuş pEGFP-BikDD'nin büyüklüklerinin oldukça yakın olmasından kaynaklı olarak negatif yüklerinin aynı oranda miseller ile nötrlenebilmesinden dolayıdır.

Farklı hidroliz derecelerinde PEI içeren blok kopolimerlerden hazırlanan misellerin terapötik gen ile kompleksleşme oranı farklılık göstermiştir. Sonuçlar her iki PPP30 ve

PPP60 misellerin artan N/P oranlarında kademeli olarak pDNA ve geni bağladığını ve buna bağlı olarak jel üzerindeki hareketinin polimerik miseller tarafından engellenerek kuyucuk içerisinde kaldığını ortaya koymuştur. Ancak jel görüntülerinde de görüldüğü üzere PPP60 miseller, PPP30 misellere göre geni daha düşük N/P oranında kondanse etmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar pek çok literatür bulgularını doğrular niteliktedir [15, 92, 190, 191, 214]. PEtOx'un hidroliz derecesindeki artışa bağlı olarak polimer zincirinde bulunan katyonik PEI miktarında meydana gelen artış, etilenimin ünitelerinin ve buna bağlı olarak serbest amin gruplarının artmasına yol açmaktadır. Böylelikle serbest amin grubu sayısı fazla olan PPP60 miseller geni daha düşük N/P oranında kondanse etmiş ve gene ait fosfat gruplarının daha fazla nötralizasyonuna neden olmuştur [216]. Jel retardasyon analizi ile elde edilen kompleks oluşumlarına ait bulgular partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel sonuçlarını net bir şekilde doğrulamıştır.

Formülasyonların hücre kültürüne uygulamaları sırasında DMEM ortamı ile dilüsyonları yapıldığından dolayı, yapılarında herhangi bir değişiklik olup olmadığını belirlemek için kültür ortamı içerisinde hazırlanan misel/gen komplekslerinin jel üzerinde analizleri yapılmış ve sonuçlar Şekil 3.30'da verilmiştir.



Şekil 3. 30. Farklı N/P oranlarında PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin hücre kültür ortamı içerisindeki 24 saatlik stabilitesine ait jel görüntüleri (L: Standart DNA 1kb, B: pEGFP-BikDD)

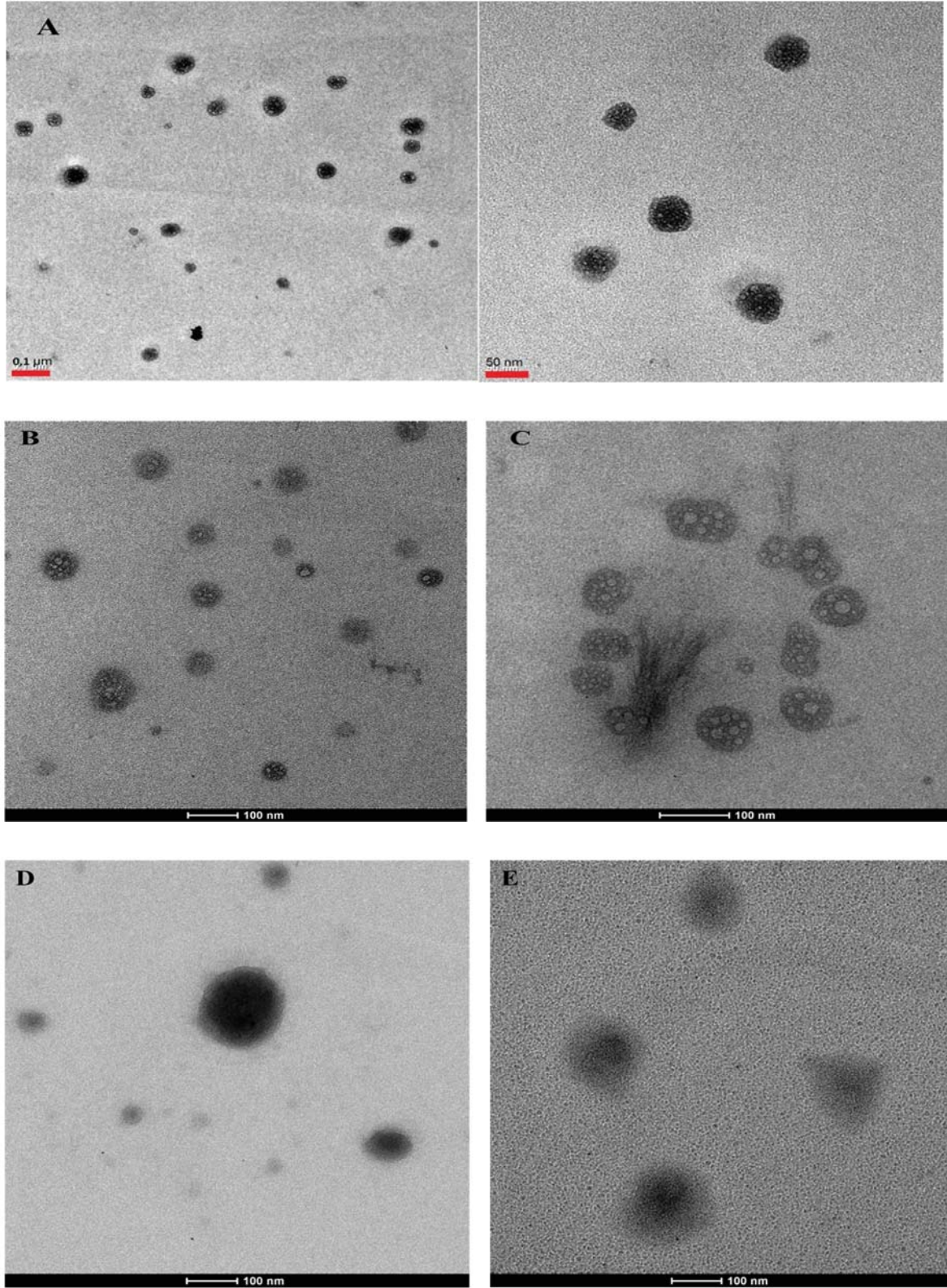
PPP30 ve PPP60 misellere kondanse edilen BikDD geninin 24 saatlik stabilitesi agaroz jel elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Kompleks oluşturduğu belirlenen N/P oranlarında (8, 10, 20 ve 30) hazırlanan formülasyonlara 1 µg kondanse edilmiş BikDD geninin 24 saat sonunda hücre kültür ortamında herhangi bir degradasyona maruz kalmadığı tespit edilmiştir. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında kullanılan N/P oranlarında hücre kültür ortamı içerisinde dilüe edilen misel/gen formülasyonlarının jel görüntü

sonuçları, komplekslerin hücre kültür ortamında yapısını ve stabilitesini koruduğunu ve miselden BikDD geninin ayrılmadığını göstermiştir.

3.3.7. Boş Miseller ve Misel/Gen Komplekslerinin Morfolojik Karakterizasyonları

Hidroliz edilmemiş boş misel formülasyonları, %30 ve %60 oranında hidroliz edilmiş boş misel formülasyonları ve seçilen N/P 30 oranındaki BikDD yüklü misel/gen formülasyonlarının morfolojik karakterizasyonları TEM analizi ile değerlendirilmiş ve görüntüler Şekil 3.31’de verilmiştir.

Şekil 3.31 a’da verilen, hidroliz edilmemiş $\text{PEtOx}_{10700}\text{-}b\text{-PCL}_{2100}$ blok kopolimerleri ile hazırlanan boş misel formülasyonlarına ait TEM görüntülerine göre miseller düzgün, tek düze ve küresel şekilleri ile yaklaşık olarak 50 nm ortalama partikül boyutundadır. %30 ve %60 hidrolize blok kopolimerler ile hazırlanan PPP30 ve PPP60 boş misellerin ve seçilen N/P 30 oranındaki BikDD geni yüklü PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin TEM görüntü sonuçları, misellerin yaklaşık 100 nm ortalama partikül boyutunda olduğunu göstermiştir. Blok kopolimer yapısına dâhil olan PEI’nin misel boyutunu arttırdığı tespit edilmiş olup, DLS analizi ile elde edilen sonuçları doğrulamıştır. Analiz sonuçlarına göre, tüm misel formülasyonlarının küresel formda ve düzgün şekilli olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni, doğru olarak seçilen hidrofilik:hidrofobik blok kopolimer oranı ile ilişkilidir. Misel morfolojisi blok kopolimerin hidrofilik: hidrofobik oranına göre değişiklik göstermektedir, hidrofilik hacim fraksiyonu, f değeri, %45 üzerinde olan blok kopolimerlerin sulu çözeltilerde küresel formda olduğunu ortaya konulmuştur [123]. Kabanov ve Alakhov [217], çalışmalarında %30 oranında hidrofilik blok taşıyan kopolimerlerin küresel miseller oluşturduğunu ifade etmiştir. Çalışmamızda PPP30 blok kopolimerler % 68, PPP60 blok kopolimerler ise %47 oranında hidrofilik blok ile bu literatür bulgularını doğrular niteliktedir.



Şekil 3. 31. TEM görüntüleri a) Hidroliz edilmemiş $\text{PEtOx}_{10700}\text{-}b\text{-PCL}_{2100}$ blok kopolimeri ile hazırlanan boş miseller b) %30 hidrolize PPP30 blok kopolimeri ile hazırlanan boş miseller c) %60 hidrolize PPP60 blok kopolimeri ile hazırlanan boş miseller d) N/P 30 oranındaki PPP30 misel/BikDD geni kompleks miseller e) N/P 30 oranındaki PPP60 misel/BikDD geni kompleks miseller

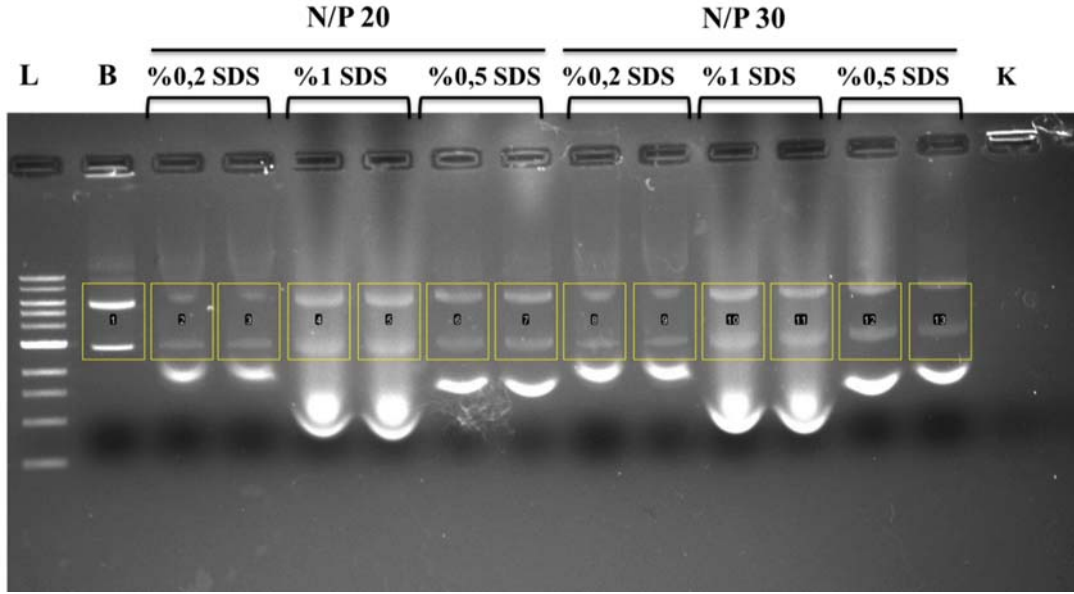
BikDD geni ile kompleks misellerin, gen yüklemesinden kaynaklı olarak misel boyut ve şekillerinde herhangi bir olumsuz değişiklik tespit edilmemiş ve terapötik genin formülasyonda agregasyona yol açmadığı ortaya konulmuştur. Ayrıca PPP30 ve PPP60 misel/gen kompleksleri, gen içermeyen boş formülasyonları ile kıyaslandığında TEM sonuçlarında büyük farklılıklar gözlenmemiştir. Bunun nedeni, yüksek bir N/P oranında genin miseller ile sıkı bir şekilde paketlenmesinden kaynaklı olarak düzgün şeklini ve boyutunu koruyabilmesinden kaynaklıdır. Aynı zamanda TEM analizi ile elde edilen tüm sonuçlar, misellerin dinamik ışık saçılımı ile elde edilen partikül boyut sonuçlarını net bir şekilde doğruladığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, TEM analizleri, terapötik genin misel formülasyonlarına başarılı bir şekilde yüklendiği ve misellerin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmediğini göstermiştir.

3.3.8. Misel/Gen Komplekslerinin Stabilite Çalışmaları

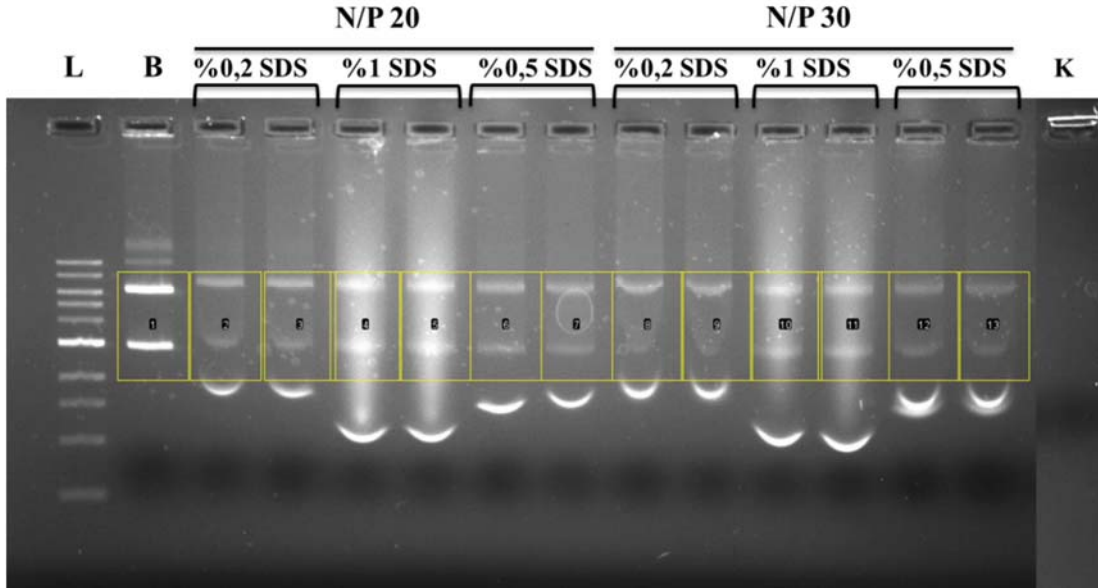
PPP30 ve PPP60 misellerin farklı N/P oranlarındaki formülasyonlarına ait partikül boyut karakterizasyon çalışmaları ve jel retardasyon analizleri ile elde edilen bulgular doğrultusunda, optimum özellikte olduğu belirlenen ve kompleks oluşturduğu tayin edilen iki N/P oranı (20 ve 30) ile stabilite çalışmalarına devam edilmiştir.

3.3.8.1. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Salım Çalışması

Misel/gen komplekslerinin daha sonra gerçekleştirilecek olan DNaz-I stabilite analizinde, genin kompleksten serbest bırakılarak, hasara uğrayıp uğramadığını jel üzerinde tayin etmek amacıyla SDS salım çalışması yapılmış ve genin salımı için gerekli SDS konsantrasyonu tayin edilmiştir. Bölüm 2.2.7.1’de belirtildiği üzere kompleksler toplam hacim içerisinde 3 farklı konsantrasyonda (%0,2, %1 ve %0,5) SDS ile inkübasyona bırakılmıştır. SDS salım çalışmasına ait sonuçlar önce jel elektroforezinde değerlendirilmiş, sonrasında ise jel üzerindeki DNA bantlarının bağıl yoğunlukları Image J programı ile hesaplanarak formülasyondan BikDD geninin % salımı belirlenmiştir. N/P 20 ve N/P 30 oranında hazırlanan komplekslerin SDS salımına ait agaroz jel görüntüleri şekil 3.32 ve 3.33’de verilmiştir.



Şekil 3. 32. N/P 20 ve N/P 30 oranlarında hazırlanan PPP30 misel/gen komplekslerinin SDS salımına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (L: Standart DNA (1 kb), B: pEGFP-BikDD (1µg), K: Kontrol, SDS uygulanmamış misel/gen kompleks)



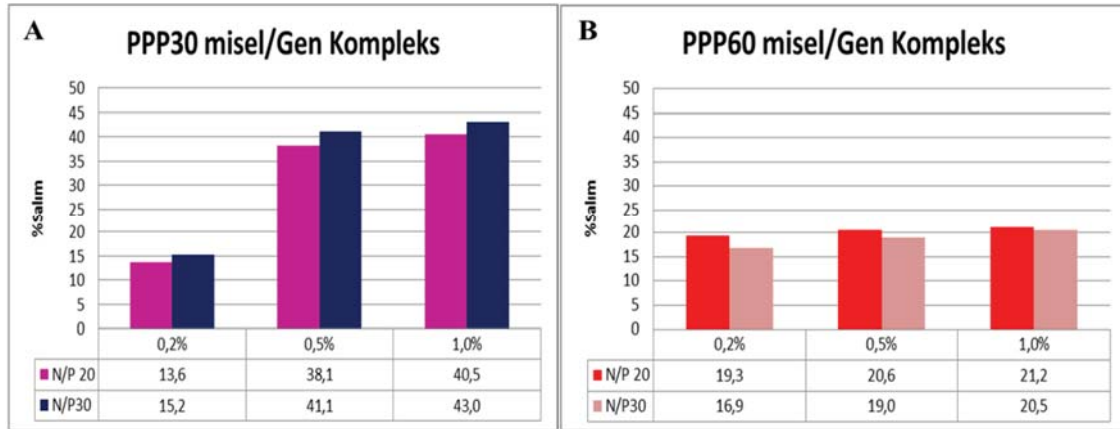
Şekil 3. 33. N/P 20 ve N/P 30 oranlarında hazırlanan PPP60 misel/gen komplekslerinin SDS salımına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (L: Standart DNA (1 kb), B: SDS pEGFP-BikDD (1µg), K: Kontrol, SDS uygulanmamış misel/gen kompleks)

SDS, yüksek anyonik yapısı gereği katyonik yapılara bağlanma eğilimi gösteren bir ajandır. Misel/gen kompleksleşmesi gerçekleştirildikten sonra komplekslere SDS uygulandığında, SDS, gen ile yer değiştirerek katyonik misellere bağlanmakta ve genin kompleksten salımını sağlamaktadır [218]. SDS salım deneyi için belirlenen konsantrasyon aralıkları literatür verilerine göre belirlenmiş ve SDS'in gen üzerinde olumsuz etkiye yol

açabilme düşüncesinden dolayı %1 konsantrasyonun üzerine çıkılması uygun görülmemiştir.

Şekil 3.32 ve Şekil 3.33’de görüldüğü üzere, jelde görülen bantların parlaklıkları her iki formülasyon ve N/P oranı için en iyi salımın %1 konsantrasyonda SDS uygulaması ile gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bu sonuç literatür bulguları ile uyumlu bulunmuştur [217, 218]. Ayrıca iki jel görüntüsü kıyaslandığında, %1 SDS uygulamasında dahi PPP60 misel/gen kompleksleri ile jel üzerinde görüntülenen bant parlaklıkları PPP30 misellere göre daha düşük bulunmuştur. Sonuçlar, PPP60 misellerin terapötik geni daha iyi bir şekilde koruduğunu ve PPP30 misel komplekslerinden gen salımının daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bunun nedeni, PPP60 misel yapısında bulunan PEI miktarının yüksek oluşu nedeniyle terapötik geni daha stabil bir şekilde koruyup, sıkı paketleyebilmesinden dolayıdır ve sonuçlar PPP60 misel taşıyıcı sistemin başarısını göstermektedir. SDS ile muamele edilmemiş kontrol grubu misel/BikDD gen komplekslerinin jel üzerindeki hareketi değerlendirildiğinde, misel/gen kompleksinden DNA salımı gözlenmemiş ve jel üzerinde herhangi bir bant modeline rastlanmamıştır. Bu durum SDS yokluğunda komplekslerin yapısını koruduğunu ve gen salımının gerçekleşmediğini ortaya koymuştur.

Ayrıca görsel olarak elde edilen bu veriler, jel üzerindeki bantların bağıl yoğunluklarının Image J programı ile kantitatif verilere dönüştürülmesi ile hesaplanmıştır. Şekil 3.34’te verilen bulgular komplekslerden genin % salımına ait grafikleri göstermektedir.



Şekil 3. 34. N/P 20 ve 30 oranındaki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin Image J analizi ile değerlendirilen % salım grafikleri a) PPP30 misel/gen kompleksi b) PPP60 misel/gen kompleksi

Şekil 3.34’te görüldüğü üzere, Image J bulguları, jel görüntülerini doğrular nitelikte olup, her iki formülasyon için terapötik genin miselden en yüksek oranda salımı %1 SDS

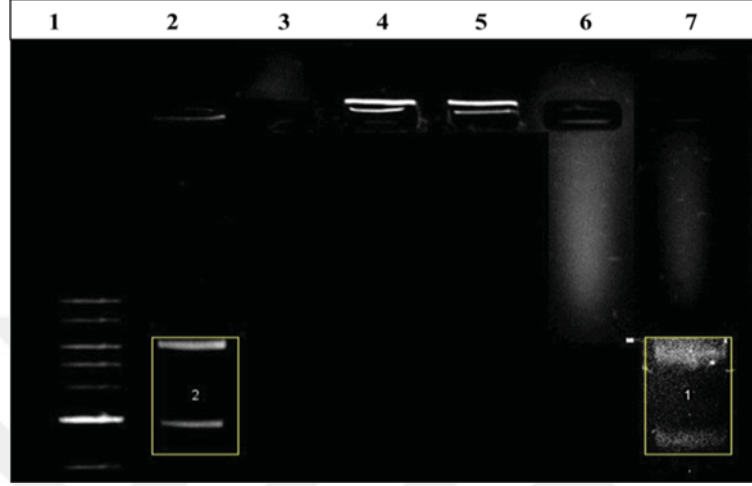
konsantrasyonda, en düşük salımı ise %0,2 SDS konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. %1 SDS ile muamele edilmiş formülasyonlarda, PPP30 misellerin terapötik geni PPP60 misellere göre daha yüksek oranda saldıgı belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak pEGFP-BikDD'nin bağıl yoğunluk değeri %100 olarak kabul edilmiş olup, kontrol grubu ile kıyaslandığında, %1 SDS konsantrasyonu ile PPP30 miselleri N/P 30 oranında terapötik geni %43 salmış, bu oran PPP60 misellerinde ise %20,5 olarak tayin edilmiştir. Bunun nedeni, PPP60 misel yapısında bulunan PEI miktarının yüksek oluşu nedeniyle terapötik geni daha stabil bir şekilde koruyup, sıkı paketleyebilmesinden dolayıdır ve sonuçlar PPP60 misel taşıyıcı sistemin başarısını göstermektedir. Ayrıca, her iki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin N/P 20 formülasyonlarındaki salım yüzdeleri N/P 30 formülasyonlarına oldukça yakın bulunmuş ve yüksek N/P oranlarına bağılı olarak terapötik genin etkili bir şekilde miseller tarafından korunabildiğini göstermiştir. Sonuçlar SDS gibi deterjan uygulamasında dahi PPP60 misellerin N/P 20 ve N/P 30 oranlarında terapötik geni etkili bir şekilde koruyabilme yeteneğinde olduğunu kanıtlamıştır. Aynı zamanda kompleksten DNA'nın serbest bırakılabilir olması transfeksiyon çalışmalarında yüksek etkinlik elde edilebileceğini düşündürmektedir.

3.3.8.2. Misel/Gen Komplekslerinin DNaz-I Nükleaz Stabilite Analizi

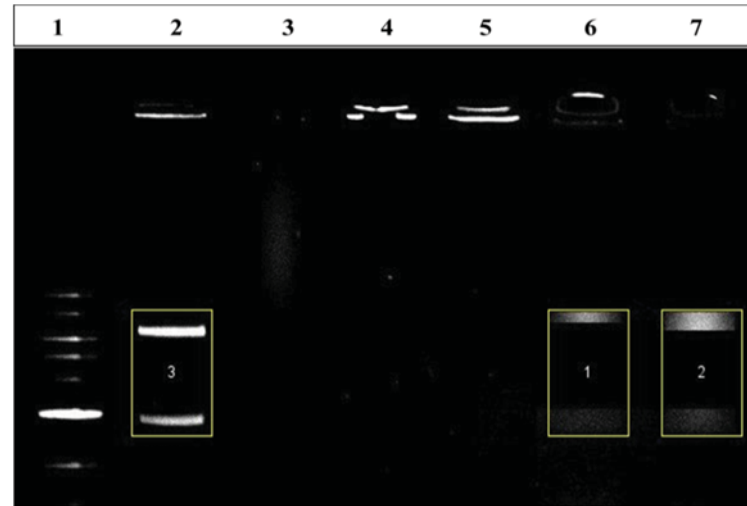
Nanotaşıyıcı/gen komplekslerinin stabilitesi, nükleaz degradasyonundan geni korumak ve başarılı bir gen aktarımı için fonksiyonel bir gen taşıma aracı tasarlayabilmek için kritik bir faktördür [215]. Tez çalışmamızda, PEtOx tabanlı polimerik misellerin terapötik geni enzimatik yıkıma karşı koruma yeteneği DNaz-I nükleaz stabilite analiz ile tayin edilmiştir.

Kan serum ve plazmasında DNA degradasyonunda görevli pek çok enzim bulunmakta olup, en fazla DNaz-I nükleaz enzime rastlanmaktadır [219, 220]. Literatür verileri DNaz-I'in sağlıklı insan kan plazmasında 0,004 U ile 6U/mL aralığındaki oranlarda bulunduğunu ortaya koymuştur. Kanseri türüne bağılı olarak değişmekle birlikte meme kanseri vakalarında plazmadaki bu oranın çok daha yüksek (100U/mL-200U/mL, 400 U/mL) olduğu ve 1 µg ve 2,5 µg DNA için yaklaşık 1U DNaz-I enziminin bu oranı karşıladığı ifade edilmiştir [222]. Bu nedenle biz de tez çalışmamızda formülasyonun plazmada karşılaşılabileceği DNaz-I oranını kullanarak, literatür bilgileri doğrultusunda 20 µl'de 1 µg BikDD gen içerecek şekilde hazırlanan formülasyonların DNaz-I nükleaz enzime karşı stabilitesini tayin etmeyi amaçladık. Çalışmamız kapsamında DNaz-I nükleaz stabilite analizi, N/P 20 ve 30 oranlarında hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin 1 U DNaz-I ile 10 dakika süre ile 37 °C'de inkübasyonu sonrası agaroz jel

üzerinde görüntülenmesine dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.35 ve Şekil 3.36 sırasıyla, PPP30 ve PPP60 misel komplekslerinin DNaz-I uygulaması sonucu elde edilen agaroz jel görüntülerine aittir. Çalışmamızda DNaz-I enzimi ile muamele edilmiş aynı konsantrasyondaki BikDD geni negatif kontrol olarak, DNaz-I enzimi ile muamele edilmemiş BikDD geni ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3. 35. PPP30 misel/gen kompleksinin DNaz-I stabilite çalışmasına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (1. Kuyu 1kb standart DNA, 2. Kuyu 1 µg serbest pEGFP-BikDD geni (DNaz-I ile muamele edilmemiş), 3. Kuyu 1 µg serbest pEGFP-BikDD geni (DNaz-I ile muamele edilmiş), 4. Kuyu N/P 20 oranında misel/BikDD kompleksi (muamele edilmemiş), 5. Kuyu N/P 30 oranında misel/BikDD kompleksi (muamele edilmemiş), 6. Kuyu N/P 20 oranında misel/gen kompleksi, 7. Kuyu N/P 30 oranında misel/gen kompleksi (muamele edilmiş))



Şekil 3. 36. PPP60 misel/gen kompleksinin DNaz-I stabilite çalışmasına ait agaroz jel elektroforez görüntüsü (1. Kuyu 1kb Standart DNA, 2. Kuyu 1 µg serbest pEGFP-BikDD geni (DNaz-I ile muamele edilmemiş), 3. Kuyu 1 µg serbest pEGFP-BikDD geni (DNaz-I ile muamele edilmiş), 4. Kuyu N/P 20 oranında misel/BikDD kompleksi (muamele edilmemiş), 5. Kuyu N/P 30 oranında misel/BikDD kompleksi (muamele edilmemiş), 6. Kuyu N/P 20 oranında misel/gen kompleksi, 7. Kuyu N/P 30 oranında misel/gen kompleksi (muamele edilmiş))

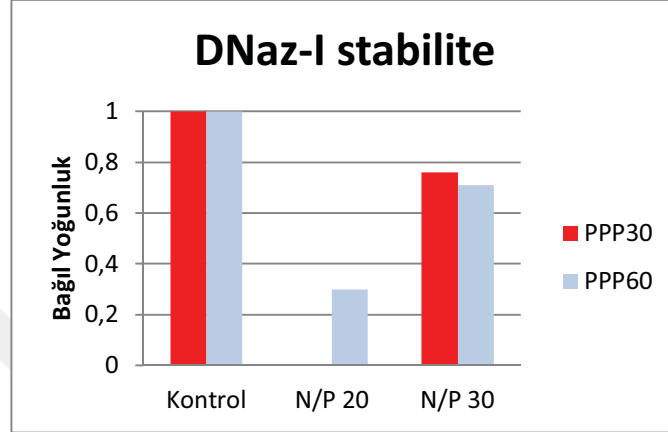
DNAaz-I muamelesi sonunda BikDD geninin enzime karşı dayanıklılığını tayin etmek için genin kompleksten ayrılarak serbest hale geçmesini sağlamak ve jel üzerindeki bant görüntüsünü analiz etmek gerekmektedir. Bu nedenle, kompleksten genin salınması amacıyla Bölüm 2.2.7.1’de belirtildiği üzere SDS salım çalışması yapılmıştır. SDS salım çalışmasında, %1 SDS kullanımı genin salımı için daha iyi bir sonuç verdiğinden, %1 SDS ile serbest hale geçen BikDD geninin jel üzerindeki bant profili görüntülenerek nükleaz stabilitesi analiz edilmiştir. Çalışma sırasında EDTA ile SDS’in birlikte kullanımı DNaz-I’in denatürasyonuna yol açarak kompleksten salınan genin degradasyonunu önlemektedir. Nükleaz stabilite analizi bant profillerinin hem jel üzerindeki görüntüsü hem de Image J programı kullanılarak bant profillerine ait bağıl yoğunluğun sayısal verilere dönüştürülmesi ile değerlendirilmiştir.

Her iki jel görüntüsü, 3. kuyucukta DNaz-I enzimi ile muamele edilmiş serbest BikDD geninin jel üzerinde gene ait herhangi bir bant profili bırakmadığını ve dolayısı ile nükleaz ile tamamen degrade olduğunu ortaya koymuştur. N/P 30 oranındaki PPP60 misel/gen kompleksleri DNaz-I muamelesinden sonra tamamen belirgin bant profilleri ile stabilitesini korumuş olup, bu oran PPP30 misel kompleksleri ile kıyaslandığında bir miktar degradasyon ile küçük görünür bantların varlığı ile sonuçlanmıştır.

Şekil 3.35’de görüldüğü üzere, 7. kuyucuktaki, N/P30 oranında hazırlanan formülasyonda bulunan BikDD genine ait bant profili belirli bir miktar degradasyona uğramakla birlikte jel üzerinde tespit edilmiş olup, 6. kuyucuğa yüklenen N/P 20 oranındaki formülasyonun DNaz-I enzimi tarafından yoğun bir yıkıma uğradığını ve bu nedenle lekelenme şeklinde görüntü bıraktığını ortaya koymuştur. 4. ve 5. kuyucukta görüldüğü üzere, DNaz-I ile muamele edilmemiş BikDD geni kompleksler tarafından başarılı bir şekilde korunmuş olup, SDS ile salımı tetiklenmediğinden dolayı kuyucuk içerisinde tespit edilmiştir. Şekil 3.36’de görüldüğü üzere, 6. ve 7. kuyucuklardaki, N/P 20 ve N/P 30 oranında hazırlanan formülasyonlarda bulunan BikDD genine ait belirgin bant profili jel üzerinde tespit edilmiştir. 4. ve 5. kuyucukta görüldüğü üzere, DNaz-I ile muamele edilmemiş BikDD geni kompleksler tarafından başarılı bir şekilde korunmuş olup, SDS ile salımı tetiklenmediğinden dolayı kuyucuk içerisinde tespit edilmiştir. Sonuçlar, PPP60 misellerin yüksek PEI oranı ile terapötik genin sıkı bir şekilde paketlenmesine bağlı olarak, her iki N/P oranında (20 ve 30) terapötik geni PPP30 komplekslerine göre başarılı bir şekilde nükleaz degradasyonundan koruyabildiğini göstermiştir. Araştırmacılar, yüksek pozitif yük

ve N/P oranındaki komplekslerin nükleaz enzim yıkımına karşı daha dayanıklı olduğunu ortaya koymuştur [190, 222]. Elde edilen sonuçlar literatür verileri ile uyum göstermiştir.

Agaroz jel elektroforezi ile elde edilen jel görüntü sonuçları aynı zamanda Image J programı ile misel kompleksinden salınan BikDD genine ait bantların bağıl yoğunlukları hesaplanarak sayısal veriler ile desteklenmiş ve sonuçlar Şekil 3.37’de verilmiştir.

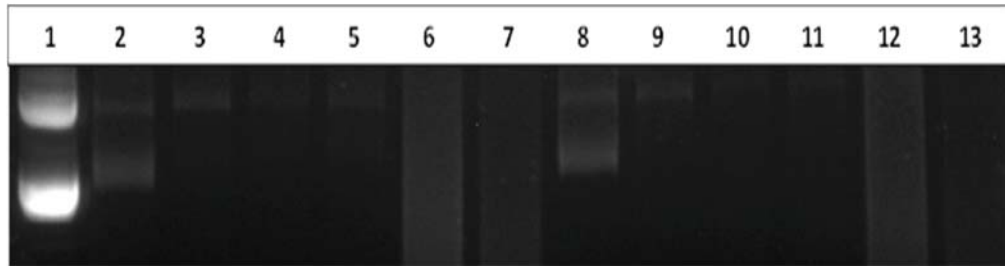


Şekil 3. 37. N/P 20 ve N/P 30 oranında hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin DNaz-I uygulaması sonucu BikDD gen profiline ait bağıl yoğunlukları

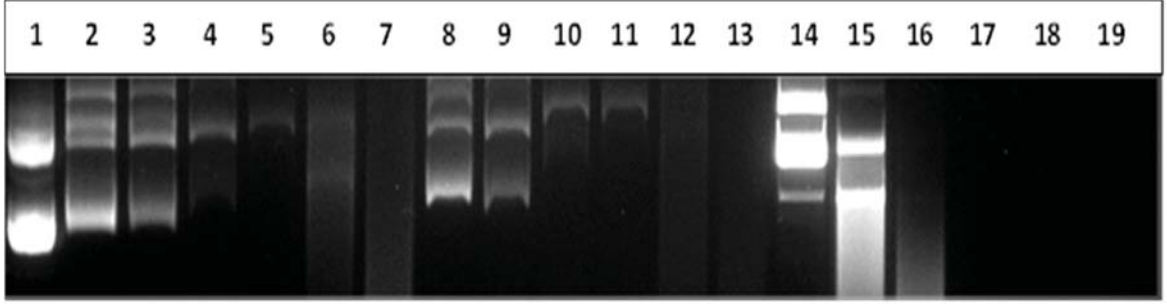
DNaz-I stabilitesi, PPP30 ve PPP60 komplekslerinden salınan genlerin jel üzerindeki bağıl yoğunluklarının, DNaz-I ile muamele edilmemiş serbest BikDD geninin bağıl yoğunluğu ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Serbest BikDD geninin bağıl yoğunluğu 1 olarak kabul edilmiş ve formülasyonlardan salınan genlerin bağıl yoğunlukları buna göre hesaplanmıştır. Şekil 3.37’de görüldüğü üzere N/P 20 oranındaki PPP30 kompleksinden salınan BikDD geni DNaz-I nükleaz uygulaması sonucu tamamen degrade olduğundan herhangi bir sonuç alınamamıştır. PPP30 komplekslerin N/P 30 oranında bağıl yoğunluğun yüksek oluşu, jel üzerinde lekelenme görüntüsü ile kalın bir bant gibi değerlendirilmesinden kaynaklıdır. Ancak stabil bir gene ait bant profili yayılma göstermeden tek bir çizgi halinde olmalıdır. Bununla birlikte, PPP60 misel/gen komplekslerinin N/P 20 oranındaki bağıl yoğunluğu 0,3 iken N/P 30 oranındaki bağıl yoğunluğu ise oldukça yüksek olup kontrole yakın 0,71 olarak tayin edilmiştir. Bu sonuç, PPP 60 miselleri tarafından korunmuş BikDD geninin jel üzerinde yoğun bir bant profili sergilemediğini ve terapötik genin bu formülasyon ile iyi bir şekilde nükleaz degradasyonuna karşı korunduğunu göstermiştir. Elde edilen bağıl yoğunluk sonuçları, jel görüntü sonuçlarını destekler nitelikte olup, PPP60 misellerin N/P 30 formülasyonun nükleaz stabilitesinin diğer formülasyonlara göre çok daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur.

3.3.8.3. Misel/Gen Komplekslerinin Serum Stabilite Analizleri

Terapötik bir genin hedef bölgeye uzatılmış kan dolaşımı, yüksek saklama stabilitesi ve artan transfeksiyon etkinliği ile aktarılabilmesi için gen taşıyıcı sistemler ile sıkı bir şekilde paketlenmesi ve taşıyıcı sistemin ise serum bileşenlerinden korunması gerekmektedir [211]. Çünkü, intravenöz enjeksiyon sonrasında misellerin de dahil olduğu gen taşıyıcı sistemler, kanda bulunan çeşitli serum proteinleri ile opsonizasyon adı verilen spesifik olmayan etkileşimlerde bulunurlar. Serumun yüksek iyonik gücü gen taşıyıcı sistemlerin stabilitesini azaltarak, agregasyona uğramasına neden olmaktadır. Ayrıca, gen taşıyıcı sistemlerin sahip oldukları pozitif yüzey yükü, onları negatif yüklü serum bileşenleri (albümin ve eritrositler gibi) ile aglomerasyona duyarlı hale getirir [56, 223]. Böylelikle plazma proteinleri, miseller yüzeyine adsorbe olabilir ve misel/gen komplekslerinin ayrışmasına ve agregate olmasına yol açarak transfeksiyonu engelleyebilir. Pek çok literatürde, opsonizasyona karşı başta PEG olmak üzere çeşitli görünmez özellik sergileyen polimerlerin kullanımı ile taşıyıcı sistemlerin sterik stabilizasyonu sağlanarak opsonizasyonun önlenebildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır [91, 112]. Bu tez çalışması kapsamında, son zamanlarda PEG'e alternatif görünmez bir polimer olarak önerilen yüksek hidrofilik yapıdaki biyoinert, PetOx tabanlı polimerler ile hazırlanan misellerin serum stabilitesi analiz edilerek, sterik koruma yeteneğini tayin etmek amaçlanmıştır. Serum stabilite analizi, Bölüm 2.2.7.3'de anlatıldığı şekilde N/P 20 ve N/P 30 oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin %10 FBS ile 37°C'de belirli zaman aralıklarında inkübe edilmesi ve agaroz jel elektroforezi ile bant profillerinin değerlendirilmesine bağlı olarak yapılmıştır. Çalışmamızda, aynı koşullarda FBS ile muamele edilen serbest BikDD geni negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.38 ve Şekil 3.39).



Şekil 3. 38. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 misel/gen komplekslerinin belirli zaman aralıklarındaki serum stabilitesine ait agaroz jel görüntüleri (1.kuyu, %10 FBS ile muamele edilmemiş 1µg serbest BikDD geni, 2-7 arası, N/P 30 oranına ait komplekslerin sırasıyla, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 24 saat ve 48 saat süre ile %10 FBS ile inkübasyonuna ait bant profilleri, 8-13 arası aynı sürelerde N/P 20 oranına ait komplekslerdeki genlerin bant profillerini göstermektedir).



Şekil 3. 39. Farklı N/P oranlarındaki PPP60 misel/gen komplekslerinin belirli zaman aralıklarındaki serum stabilitesine ait agaroz jel görüntüleri (1.kuyu, %10 FBS ile muamele edilmemiş 1µg serbest BikDD geni, 2-7 arası, N/P 30 oranına ait komplekslerin sırasıyla, 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 24 saat ve 48 saat süre ile %10 FBS ile inkübasyonuna ait bant profilleri, 8-13 arası aynı sürelerde N/P 20 oranına ait komplekslerdeki genlerin bant profillerini, 14-19 kuyuları arası %10 FBS ile inkübe edilmiş serbest BikDD genine ait bant profillerini göstermektedir).

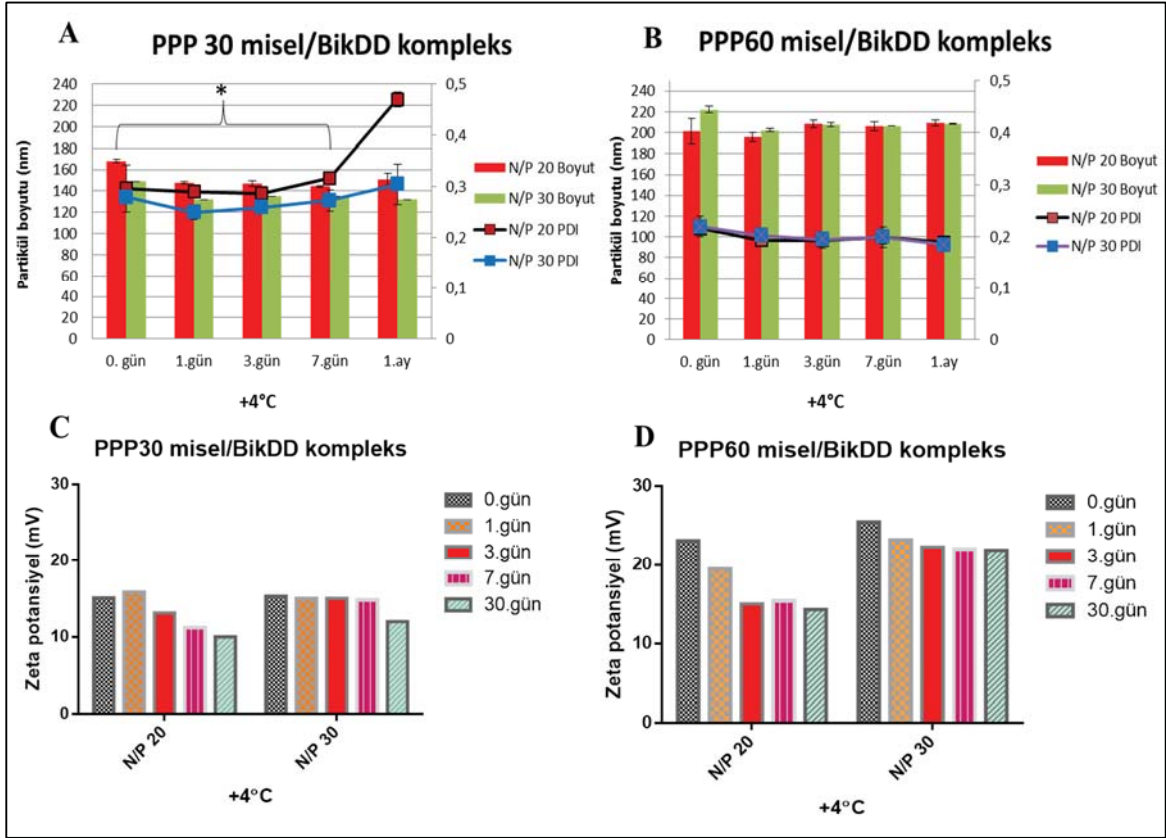
Jel üzerinde görüntülenen bant profilleri, misel/gen komplekslerinin destabilizasyonunu indükleyen, yüksek orandaki negatif yükü nedeniyle miselden genin salınmasına neden olan heparin ajanının varlığı ile tespit edilmiştir [191, 224]. Degradasyon, serum içerisinde bulunan çeşitli nükleazların aktivitesi sonucudur ve Şekil 3.39’da 14-19 sıralarındaki bant görüntüleri, %10 FBS ile farklı zaman noktalarında muamele edilen serbest pEGFP-BikDD geninin beklenildiği üzere, 37 °C’de 1 saat içerisinde tamamen degrade olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, seçilen PPP30 ve PPP60 misel/gen kompleksleri için agaroz jelde saptanabilir bantlar elde edilmiştir. N/P 20 ve 30 oranındaki PPP30 misellerden salınan genler, benzer bant parlaklığı göstermekle birlikte, her iki formülasyonun ilk 30 dakika yüksek bant parlaklığı ile geni koruyabildiği tayin edilmiştir. 30 dakikadan sonra, jel üzerinde gene ait bantlar tespit edilmiş ancak parlaklıklarında azalma görülmüştür. N/P 30 formülasyonunun terapötik geni net bir şekilde 4 saate kadar koruduğu gözlenmiştir. 4 saat ve üzerindeki zaman noktalarında ise genin tamamen degrade olduğu lekelenmiş görüntüsünden yararlanarak ortaya konulmuştur (Şekil 3.38). Bununla birlikte N/P 30 oranındaki PPP60 miseller ise 24 saat sonunda dahi çok daha parlak bant profilleri ile aktif serumda çok daha stabil bir şekilde terapötik geni koruyabilmiştir. N/P 20 oranındaki misellerin ise 4 saat süre ile BikDD genini serum aktivitesine karşı koruyabildiği, 24 ve 48 saatlik zaman noktalarında ise jel üzerinde BikDD genine ait bant gözlenmemesi nedeniyle degradasyona uğradığı tespit edilmiştir (Şekil 3.39). Bu bulgular ışığında, PPP60 misellerin (N/P oranı 30), BikDD genini serum degradasyonundan daha yüksek stabilite ile koruyabilme yeteneğine sahip etkili formülasyonlar olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, sistemik dolaşıma katılan çıplak genin herhangi bir taşıyıcı sistem ile kompleks oluşturmada hedef bölgeye taşınamayacağını kanıtlar [225]. Bu durum, transfeksiyon ve başarılı bir gen tedavisini azaltıcı kritik bir faktördür. Ancak tez çalışmamız kapsamında geliştirilen PPP60 misel/gen komplekslerinin (N/ P oranı 30), yüksek kapasite ile terapötik gen ile etkileşmekte olduğunu, serum degradasyonuna karşı terapötik geni koruyabildiğini ve aktif hedeflendirilmiş bir ajan olmadan dahi geni aktarabileceğini düşündürmektedir. PPP60 misel/gen komplekslerinin (N/P 30) yüksek serum stabilitesi, formülasyonun opsonizasyona uğramadan yüksek transfeksiyon etkinliği ile aktarılabilirliğini işaret etmektedir. Bu formülasyonların ideal bir nanotaşıyıcıda olması gereken tüm özelliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bunun nedeni, yüksek oranda PEI içeren formülasyonların terapötik geni sıkı bir şekilde kondanse edebilmesidir. Bulgular, PEtOx'un sterik bariyer oluşturarak, N/P 30 oranındaki PPP60 kompleks misellerin çevresel etkileşimlerini minimuma indirmek, serum stabilitesini ve kandaki dolaşım süresini arttırmak için PEG'e karşı alternatif uygun bir polimer olabileceği görüşünü doğrulamıştır [135, 225].

3.3.8.4. Misel/Gen Komplekslerinin Kolloidal Stabilité Analizleri

Agregasyon, terapötik bir genin nanotaşıyıcılar ile hedef hücrelere aktarımında karşılaştıkları önemli bir sorundur. Gen taşınması sırasında, hedef hücrede transfeksiyon etkinliğini arttırmak ve komplekslerin yüksek hücresel alımını sağlamak için, miseller taşıyıcıların belirli periyotlarda ve çeşitli ortamlarda agregasyona uğramaması ve stabil bir şekilde fizikokimyasal özelliklerini koruması gerekmektedir [191].

Misel/gen komplekslerinin kolloidal stabiliteleri farklı ortam ve sıcaklık koşullarında belirlenen zaman aralıklarında partikül boyutu, zeta potansiyel ve polidispersite indeksi (PDI) değerlerinin ölçümü ile tayin edilmiştir. Bunun için ilk olarak PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin seçilen N/P oranlarındaki (20 ve 30) formülasyonları +4 °C'de saklanmış ve bu formülasyonların 0, 1, 3, 7 ve 30 günlük (1 aylık) zaman noktalarındaki kolloidal stabiliteleri tayin edilmiştir (Şekil 3.40).



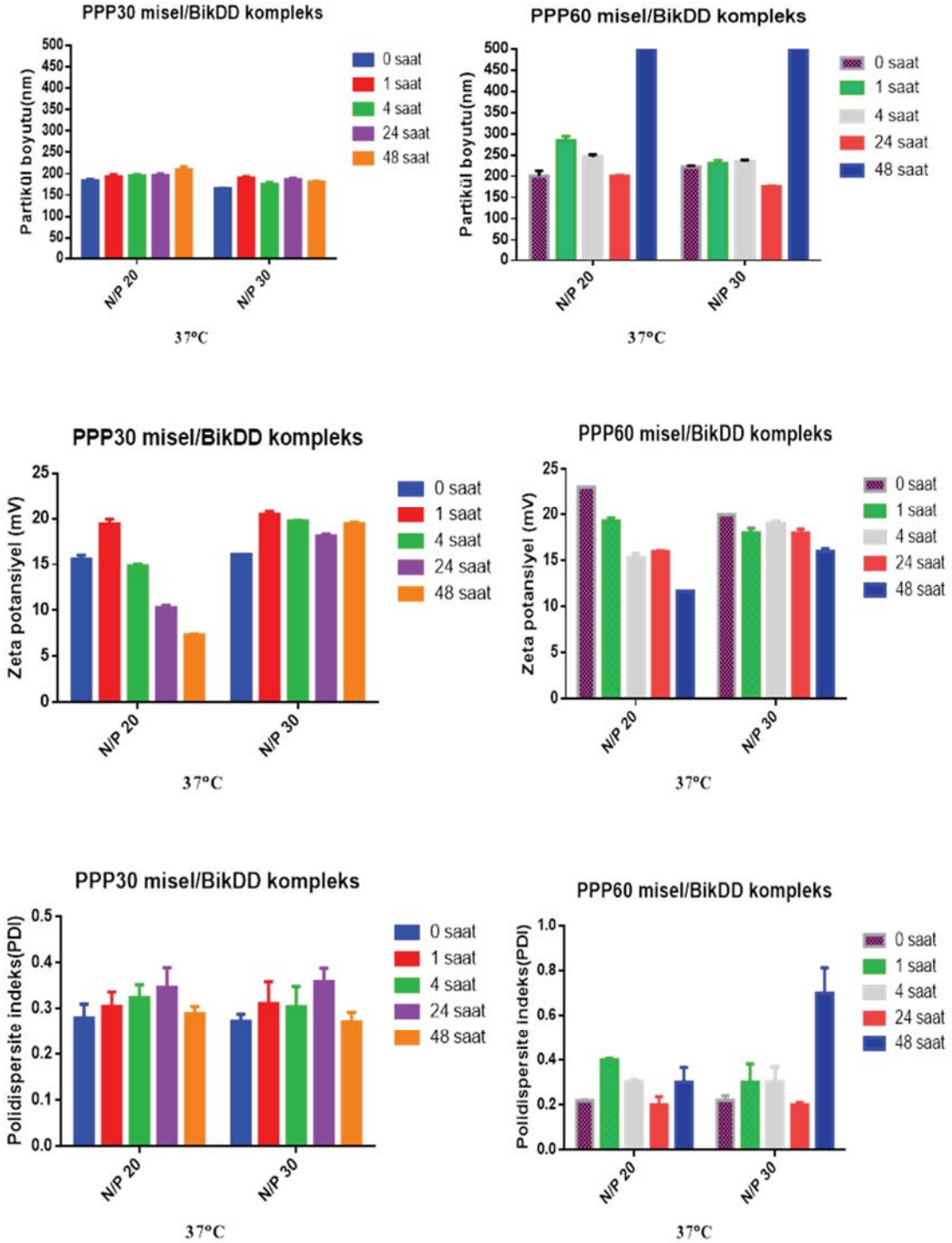
Şekil 3. 40. PPP30 ve PPP60 Misel/gen komplekslerinin +4°C'deki partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinin zamana bağlı değişimi (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.40 a ve b'de görüldüğü üzere, her iki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerine ait partikül boyutu sonuçları komplekslerin +4°C'deki stabilitesini 1 ay süre ile koruduğunu ortaya koymuştur. N/P20 ve N/P 30 oranlarında hazırlanan kompleksler, 131 nm–168 nm aralığında, PPP60 misel/BikDD komplekslerinde boyut 195 nm–220 nm aralığında tayin edilmiş ve sonuçlar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (*p>0,05). PPP60 misel/gen komplekslerinin partikül boyutlarının yüksek olmasının nedeni polimer yapısında bulunan PEI miktarının PPP30 misel/gen komplekslerinin yapısını oluşturan polimerdeki miktarından fazla olmasından kaynaklanmaktadır. PDI sonuçları değerlendirildiğinde, N/P 30 oranında hazırlanan her iki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin homojen dağılımını 30 gün boyunca koruduğu gözlenmiştir. PPP30 kompleksleri için bu değer 0,3 civarında, PPP60 kompleksleri için ise 0,2 civarındadır. Her iki kompleksin N/P 20 ve N/P 30 oranlarındaki formülasyonları +4° C'de yüksek PDI stabilitesi sergilemiş ve yüksek N/P oranına bağlı olarak stabilitenin de arttığını göstermiştir. PDI değerleri ile elde edilen stabilite bulguları, her iki formülasyon için partiküllerin 1 aylık saklama koşullarında çökme ve agregasyona uğramadığı sonucunu ortaya koymuştur. Komplekslerin zeta potansiyel değerleri incelendiğinde ise her iki

kompleks için N/P 20 oranında, zeta potansiyel değerlerinde zamana bağlı azalma tespit edilmekle birlikte pozitif yükünü kaybetmediği gözlenmemiş ve sonuçlar arasında anlamlı bir fark elde edilmemiştir (*p>0,05). N/P 30 oranında ise miseller stabilitesini uzun süre korumuş ve zeta potansiyel değerlerinde önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir. Zeta potansiyel değerlerindeki stabilite bulguları, komplekslerin 1 aylık süre zarfında pozitif yükünü koruduğunu ve zamana bağlı olarak terapötik gen ile ayrılmaya uğramadığını ortaya koymuştur.

Özetle, her iki komplekse ait stabilite sonuçları, N/P 30 oranındaki formülasyonların N/P 20 oranındakilere göre +4° C’de çok daha yüksek stabiliteye sahip olduğunu ve yüksek N/P oranına bağlı olarak stabilitenin de arttığını ortaya koymuştur. Bunun nedeni fizikokimyasal bulguları destekler nitelikte olup, yüksek N/P oranında daha sıkı komplekslerin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Miseller taşıyıcı sistemler sulu çözeltiler içerisinde dinamik bir yapı sergilemekte olup, her seferinde taze hazırlandığında partikül boyutlarında dinamik yapıdan kaynaklı olarak 20±10 nm civarında farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Ancak kolloidal stabilite analizleri için ilk hazırlanan formülasyonlara ait partikül boyutu sonuçları ile 1 aylık stabilite değerlendirilmesi sonunda ölçülen partikül boyutu sonuçları arasında anlamlı fark elde edilmemesi, PEO tabanlı misellerin kolloidal stabilite açısından başarılı sistemler olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca HEPES tamponu içerisinde hazırlanan PPP30 ve PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin, transfeksiyon çalışma koşullarında stabil olup olmadığı, 37°C’de 48 saat içerisinde belirli zaman aralıklarında, komplekslerin partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeks değerlerinde meydana gelen değişikliklerin analizi ile tayin edilmiştir. Şekil 3.41’de, PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerine ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve polidispersite indeksine ait sonuçlar verilmiştir.

Tüm formülasyonlara ait partikül boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeks sonuçları formülasyonların 24 saat süre boyunca 37°C’de stabil kalabildiğini ve stabilitelerinde anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur. Sadece N/P 30 oranındaki PPP60 misel formülasyonlarının 48 saat sonunda partikül boyut ve polidispersite indeksinde artış meydana geldiği tespit edilmiştir.



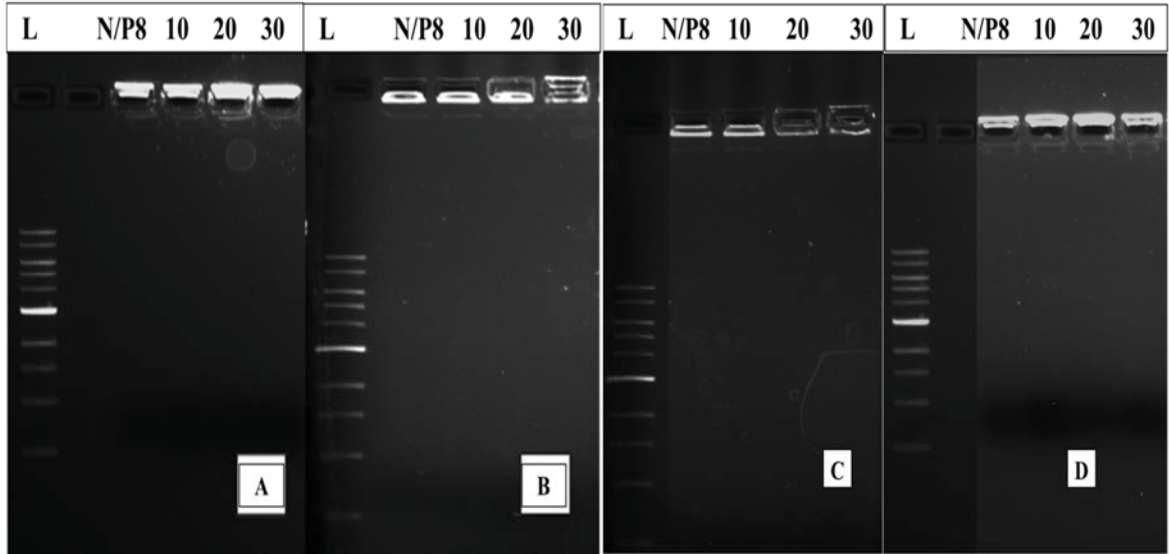
Şekil 3. 41. PPP30 ve PPP60 Misel/gen komplekslerinin 37°C'deki partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinin zamana bağlı değişimi (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Misel/gen komplekslerinin +4°C ve +37°C'deki stabiliteleri karşılaştırıldığında, düşük sıcaklıkta saklanan misel komplekslerin yüksek sıcaklığa göre çok daha dayanıklı olduğu ortaya konulmuştur. DNA gibi biyolojik yapıları materyaller çeşitli çevresel koşullardan (pH, sıcaklık, iyonik güç) hızlı bir şekilde etkilenebilen ve stabilite problemi taşıyan

biyomakromoleküllerdir. Artan sıcaklıkta DNA'nın destabilizasyona uğraması ile iki ipliğin birbirinden ayrılmaya başlaması, az da olsa komplekslerin stabilitesini etkilediğini göstermektedir [227]. Ayrıca sonuçlar, HEPES tamponunda hazırlanan misellerin uzun zaman periyodunda stabil kalabildiğini göstermiştir. Hazırlama ortamının misellerin stabilitesi üzerine olumsuz bir etkisi bulunmamakla birlikte, *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında misellerin gen aktarım etkinliğinin yüksek kolloidal stabilitelerinden dolayı yüksek olacağı düşünülmüştür.

3.3.8.5. PPP30 ve PPP60 Misellere Yüklü BikDD Geninin Stabilite Çalışmaları

PPP30 ve PPP60 misellere kondanse edilen BikDD geninin 24 ve 48 saatlik stabilitesi agaroz jel elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Kompleks oluşturduğu belirlenen N/P oranlarında (8, 10, 20 ve 30) hazırlanan formülasyonlara 1 µg kondanse edilmiş BikDD geninin 24 ve 48 saat sonunda herhangi bir degradasyona ve ayrışmaya maruz kalmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.42). Komplekslerden BikDD gen salımı gerçekleşmediğinden, jel üzerinde BikDD genine ait bantlar tespit edilmemiştir. Bu durum komplekslerin yüksek etkinlikte BikDD'yi stabil halde koruyabildiğini ortaya koymuştur.



Şekil 3. 42. BikDD geni kondanse edilmiş PPP30 misel/gen ve PPP60 misel/gen komplekslerinin 24 ve 48 saatlik stabilitesine ait agaroz jel görüntüleri a)PPP 30 misel/BikDD gen kompleksi (24 saat) b) PPP 60 misel/BikDD gen kompleksi (24 saat) c)PPP 30 misel/BikDD gen kompleksi (48 saat) d) PPP 60 misel/BikDD gen kompleksi (48 saat) (L: Standart DNA)

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

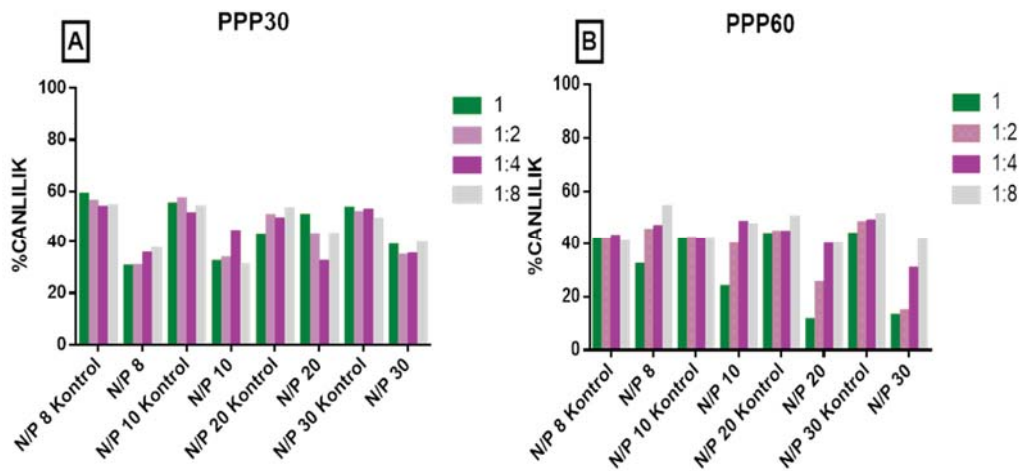
3.4.1. Hücre Canlılığı Çalışmaları

3.4.1.1. MTT Analizi ile Boş Misellerin L929 Hücrelerindeki Hücresel Biyoyoumluluğunun Değerlendirilmesi

Gen transfeksiyon etkinliği, taşıyıcı sistemin sitotoksitesitesi ile ilişkili olduğundan, katyonik polimerlerin viral olmayan vektörler olarak kullanılabilmesinde sitotoksitesite önemli bir parametredir. Fisher ve arkadaşları, genellikle katyonik PEI'nin hücre yüzeyindeki negatif yüklü glikokaliksler ile etkileşim sonucu sitotoksitesiteye neden olduğunu ifade etmiştir [213, 227]. Ayrıca pek çok çalışma, katyonik polimerlerin bu toksik etkisinin, negatif yüklü hücre membranının yüksek katyonik yük ile yıkıma uğraması ya da katyonik polimerin hücre membranındaki makromoleküllere (taşıyıcı proteinler) bağlanmasından kaynaklandığını göstermektedir [87, 89].

Tez çalışmamız kapsamında, apoptotik etkinin kanser hücrelerinde BıkDD geni tarafından meydana getirilmesi ve polimer ya da taşıyıcı sistem kaynaklı bir toksisitenin olmaması gerekmektedir. Bu nedenle, boş misellerin toksik etki oluşturmayan polimer konsantrasyonunu belirlemek ve hidroliz derecesinin hücresel biyoyoumluluk üzerine etkisini tayin etmek amacıyla her iki PPP30 ve PPP60 misellerin belirlenen N/P oranları için gerekli misel konsantrasyonu ve bu konsantrasyonun 3 farklı dilüsyonları sağlıklı L929 fare fibroblastlarında değerlendirilmiştir.

Öncelikle HEPES tamponu içerisinde hazırlanan boş misellerin 4 farklı N/P oranındaki formülasyonları 1:2, 1:4 ve 1:8 oranında dilüe edilmiş ve L929 hücrelerindeki 24 saatlik hücre biyoyoumluluğuna ilişkin bulguları Şekil 3.43'de verilmiştir.

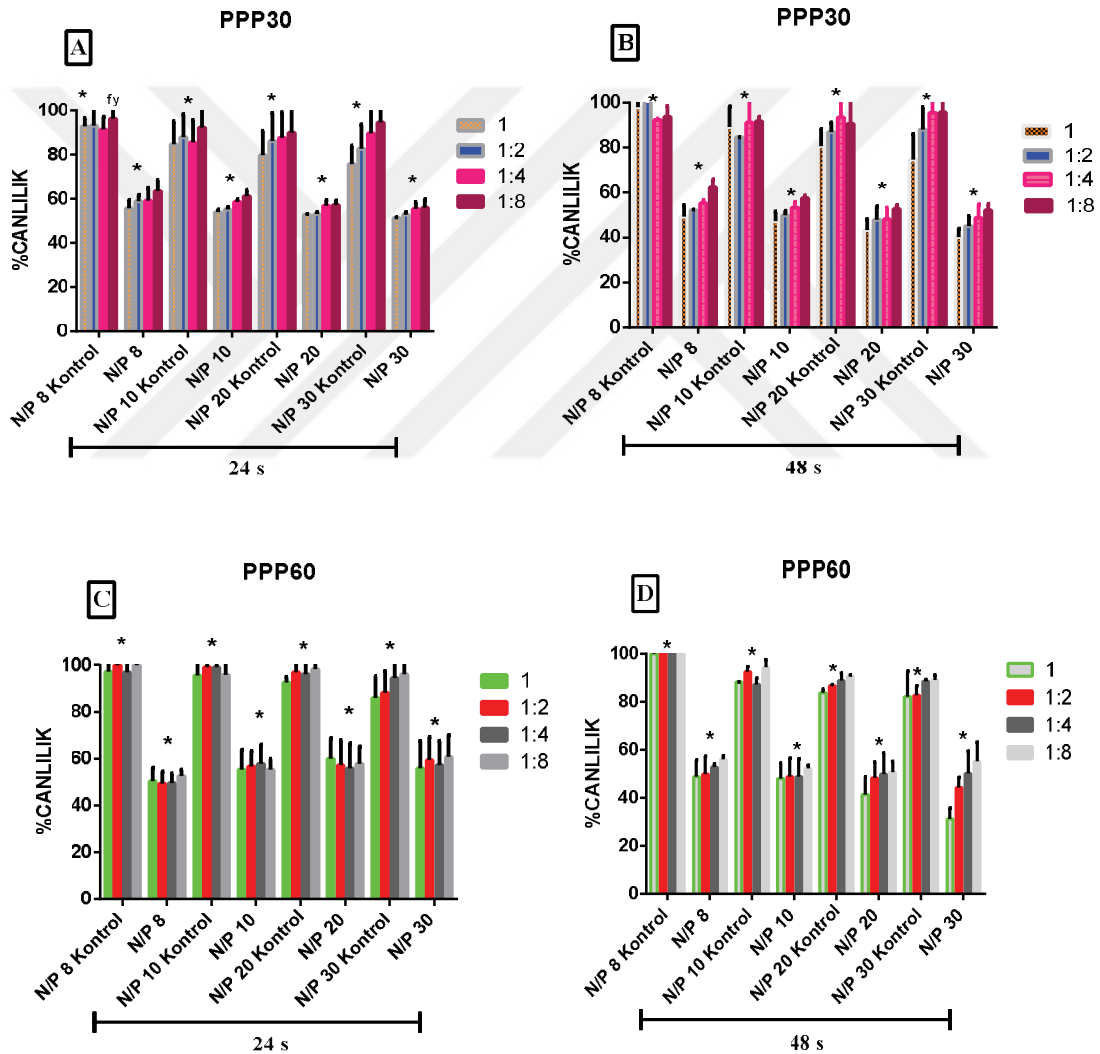


Şekil 3. 43. Farklı N/P oranlarında HEPES tamponu içerisinde hazırlanan boş misel formülasyonlarının L929 hücrelerindeki 24 saatlik MTT analizi a) PPP30 boş miseller b) PPP60 boş miseller(n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Kontrol grubu olarak her bir N/P oranındaki misel formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan miktarlarda HEPES tampon çözeltisi kullanılmıştır. Şekil 3.43'te görüldüğü üzere, MTT analiz sonuçları kontrol grubu da dâhil olmak üzere, tüm N/P oranındaki formülasyonların farklı dilüsyon oranları ile muamele edilen L929 hücre hattında, hücre canlılığının %50'nin altında olduğunu göstermiştir. N/P oranında meydana gelen artışa bağlı olarak, PPP60 boş misellerin N/P 30 oranındaki 1: 8 dilüe formülasyonu uygulanan hücrelerde canlılığın %12'ye düştüğü tayin edilmiştir, kontrol grubunda ise canlılık %43 olarak oldukça düşüktür. PPP30 misel formülasyonlarında ise artan N/P oranında canlılık %38'e düşmüş olup, kontrol grubunda %53 olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar, HEPES tamponunun L929 hücre canlılığında azalmaya neden olduğunu göstermiştir. HEPES, ortam pH'sının hızlı bir şekilde değişmesini önleyen, tamponlama kapasitesi yüksek bir tampon çözeltidir. Literatürde, yüksek konsantrasyonlarda ve büyük hacimlerde kullanılan HEPES'in yüksek tamponlama kapasitesi nedeniyle hücre içi osmolaritenin artmasına ve hücrelerdeki serbest oksijenin, H₂O₂ (peroksit) gibi toksik formlara dönüşmesine neden olarak çeşitli hücre hatlarının ölümüne yol açtığı belirtilmiştir [228, 229]. Çalışmamızda, özellikle yüksek N/P oranlarında, hem misellerin hem de terapötik genin HEPES tamponu içerisinde dilüe edilerek hücrelere uygulanması, hücre içerisindeki osmolaritenin artmasına ve buna bağlı sitotoksiteye neden olmuş olabilir. Bu toksik etkinin formülasyon kaynaklı olmadığı, kontrol grubunda sadece HEPES tampon çözelti uygulanan hücrelerde tayin edilen düşük canlılık ile ortaya konulmuştur. Bu nedenle formülasyonların hazırlanması sırasında HEPES kullanımına devam edilmesine, ancak hücre kültür çalışmalarına uygulanması sırasında serum içermeyen DMEM ortamı ile dilüe edilerek hazırlanmasına karar verilmiştir. Aynı oranlarda serum içermeyen DMEM ortamı ile hazırlanan boş misellerin çeşitli N/P oranları ve her bir N/P oranı için artan dilüsyonlarının (1:2, 1:4 ve 1:8) 24 ve 48 saatlik hücresel canlılık analizleri L929 hücre hattında MTT testi ile değerlendirilmiş ve bulgular Şekil 3.44'de verilmiştir. 24 ve 48 saatlik hücre canlılıkları, kontrol grubu ile paralel değerlendirilmelidir.

Şekil 3.44'te görüldüğü üzere, DMEM içerisinde dilüe edilen formülasyonlar ile gerçekleştirilen MTT analiz sonuçları, hücrelerin canlılık oranının HEPES içerisinde hazırlanan formülasyonlara göre çok daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Tüm N/P oranlarındaki kontrol gruplarının L929 hücreleri üzerindeki % canlılıkları boş misel formülasyonlarına göre yüksektir. PPP30 misellerin kontrol grubu formülasyonları ile muamele eden hücrelerde artan N/P oranına (8'den 30'a) bağlı olarak hücrelerin

canlılığının 24 saatte %94'ten %75'e azaldığı tespit edilmiştir. Ancak dilüsyon oranının artışına bağlı olarak hücre canlılık oranının, en yüksek N/P 30 oranındaki formülasyonlar ile muamele edilen hücrelerde dahi %94 olduğu belirlenmiştir. PPP60 misellerinde N/P8 ve N/P 30 oranları arasındaki kontrol grubu ile muamele edilen L929 hücrelerinde 24 saatte %97 ile % 86 aralığında yüksek canlılık tayin edilmiştir. Ayrıca kontrol grubu ile benzer şekilde her iki PPP30 ve PPP60 boş misellerin farklı N/P oranlarında hazırlanan formülasyon sonuçları, N/P oranında meydana gelen artışa bağlı olarak L929 hücre canlılığında bir azalmaya neden olduğunu ancak formülasyonların artan dilüsyonlarına bağlı olarak hücrelerdeki canlılığın da arttığını işaret etmiştir.



Şekil 3. 44. Farklı N/P oranlarında DMEM kültür ortamı içerisinde hazırlanan boş misel formülasyonlarının L929 hücrelerindeki 24 ve 48 saatlik MTT analizleri a ve b)PPP30 boş misellerin 24 ve 48 saatlik sonuçları, c ve d) PPP60 boş misellerin 24 ve 48 saatlik sonuçları (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

%60 hidrolize PEI içeren blok kopolimerler ile hazırlanan boş miseller yüksek oranda PEI içermesine rağmen 24 saatte en yüksek N/P 30 formülasyonun 1:8 dilüsyon oranında L929 hücrelerinde ortalama %61 canlılık göstermiştir. Bu oran 48 saatte %55 olarak tayin edilmiştir. PPP30 misellerde ise 24 saatte en yüksek N/P 30 formülasyonun 1: 8 dilüsyon oranında hücrelerde %55 canlılık, 48 saatte %52 canlılık tayin edilmiştir. Sonuçlar, formülasyonların kontrol grubuna göre anlamlı fark gösterdiğini ancak artan konsantrasyonlar (N/P oranları) ve dilüsyonlar arasında anlamlı fark olmadığını ortaya koymuştur (*p>0,05). Ayrıca, 24 saat ve 48 saatlik hücre canlılıkları arasında anlamlı fark tayin edilmemiş olup, hücre canlılığının korunduğu şeklinde değerlendirilmesi yapılmıştır.

PPP30 ve PPP60 misellerin en yüksek N/P oranlarındaki formülasyonları sağlıklı L929 hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmadığından, 1:1 dilüsyon oranındaki misel konsantrasyonu seçilmiş ve en yüksek dilüsyon oranına (1:8) düşülecek şekilde transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak doz belirlenmiştir. N/P 30 oranı her iki PPP30 ve PPP60 misellerinde önceki yapılan tüm karakterizasyon çalışmalarında ideal formülasyonlar olarak belirlendiğinden, bu orana ait toksisite oluşturmeyen dilüsyon oranına düşülecek (1:8) şekilde transfeksiyon çalışmalarına devam edilmiştir.

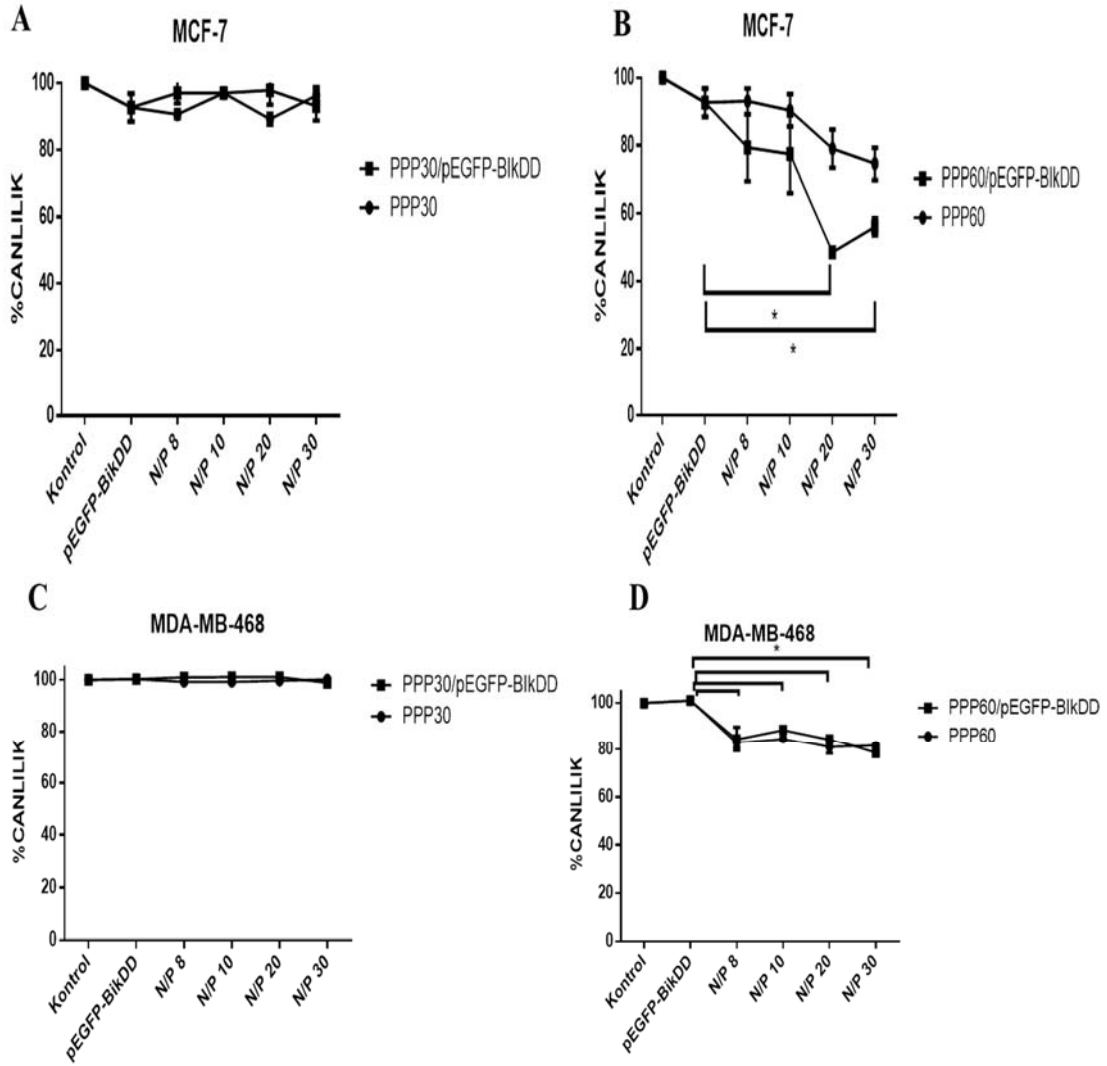
Elde edilen tüm sonuçlar, her iki PPP30 ve PPP60 boş misellerin N/P oranında meydana gelen artışa bağlı olarak L929 hücre canlılığında çok düşük oranda bir azalmaya neden olduğunu, ancak canlılığın %50'nin altına düşmediğini göstermiştir. Hemen hemen tüm formülasyonlar ve dilüsyon oranları ile elde edilen %50 civarındaki hücre canlılık bulguları, beklendiği üzere PEOx'un hidrolizi ile polimer yapısına dâhil olan PEI'nin pozitif yükünden kaynaklı olarak fibroblast hücrelerinde canlılığı az miktarda azaltmıştır. Ancak her iki %30 ve %60 hidrolize misel formülasyonların artan N/P oranları ile muamele edilen hücrelerde dahi %50 civarındaki canlılık oranının korunması formülasyonların hücrelerde toksik etki oluşturmadığını sadece hücrelerin proliferasyonunu önleyerek sitostatik etki oluşturduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular literatür verileri ile kıyaslandığında tez çalışmamız kapsamında sentezlenen PEOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimerlerin oldukça başarılı olduğunu göstermiştir. Shah ve arkadaşları [88], PEOx'un farklı hidroliz derecelerinde sentezlenen PEOx-ko-PEI blok kopolimerlerin hidroliz derecesinin, fibroblast 3T3, pankreatik B hücreleri ve makrofajların canlılığı üzerindeki etkisini tayin etmişlerdir. Araştırmacılar, çalışmamız ile benzer şekilde artan hidroliz derecesinin PEI molekül ağırlığındaki artışa ve hücre tipine bağlı olarak hücre canlılığının azaldığını göstermişlerdir. En yüksek %60 hidroliz

derecesindeki polimerler ile muamele edilen fibroblast hücrelerinde canlılığın 24 saat ve 48 saat sürelerde %64'ten %35'e düştüğünü ortaya koymuştur. Hoogenboom ve arkadaşları [159], PEtOx'un hidrolizine dayalı benzer bir canlılık çalışmasını insan dermal fibroblast hücrelerinde değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, benzer bir şekilde düşük hidroliz derecesinde PEI içeren blok kopolimerin toksik etki göstermediğini ancak artan hidroliz derecesine bağlı olarak %56 molar oranında düz PEI içeren blok kopolimerin fibroblast hücrelerinde toksik etki oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Hidroliz derecesinin %71 oranına artışının insan fibroblast hücre canlılığını 24 saatte dahi %10 oranına kadar ciddi şekilde düşürdüğünü raporlamışlardır.

Başka bir çalışmada, Kronek ve arkadaşları [156], PEtOx'un tek başına *in vitro* ve *in vivo* uygulamalarda biyouyumlu bir polimer olduğunu yüksek canlılık sonuçları ile ortaya koymuş ancak polimerin hidrolizi ile yapıya katılan PEI'nin hücrelerde toksik etkiye neden olduğunu göstermiştir. Uygun hidroliz derecesi belirlendiğinde, polimerin biyomedikal uygulamalarda kullanımı için sınırlayıcı bir durum bulunmamaktadır ancak çalışmamız kapsamında daha düşük bir hidroliz derecesinde polimerlerin kullanımı ile etkili bir tansfeksiyon etkinliğine ulaşılamayacağı düşünüldüğünden, % 30 ve % 60 hidroliz dereceleri ile çalışmalara devam edilmesi uygun bulunmuştur. Ayrıca, %60 hidroliz oranındaki polimerler ile çalışılmasına rağmen hücre canlılığının %50 altına düşmemesi pek çok literatüre göre taşıyıcı sistemimizin avantajlı olduğunu ortaya koymaktadır.

3.4.1.2. Boş Miseller ve pEGFP-BikDD Yüklü Misellerin MCF-7 ve MDA-MB-468 Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin DRAQ-7™ Yöntemi ile Analizi

PPP30 ve PPP60 boş miseller ve PPP30-PPP60 misel/pEGFP-BikDD gen yüklü komplekslerin, aynı konsantrasyonlar ve N/P oranlarındaki formülasyonların 48 saatlik hücre canlılık analizi iki farklı MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattında yeni bir canlılık boyası olan DRAQ-7 ile flow sitometre analizi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.45'da verilmiştir.



Şekil 3. 45. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 boş misellerin ve misel/gen komplekslerinin (a ve b) MCF-7 ve (c ve d) MDA-MB-468 hücre hatlarındaki hücre canlılık analizleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

DRAQ-7 ölü hücrelerin tayininde kullanılan yeni bir canlılık boyasıdır [231]. Bu görevini, canlılığını kaybetmiş hücrelerin membran geçirgenliğinden yararlanarak nükleusa ulaşma ve DNA'yı işaretleme ile gerçekleştirmektedir [232]. Çalışmamızda çıplak BikDD geni uygulanmış hücreler ile formülasyon uygulanmamış hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. DRAQ-7 negatif hücreler canlı hücre yüzdesini ifade etmektedir. Şekil 3.45'da çıplak BikDD geni muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde beklendiği üzere, %90 üzerinde canlılık gözlenmiştir. Ayrıca, boş misel formülasyonları ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde artan N/P oranlarında dahi %80 civarında canlılık elde edilmiş olup boş misellerin hücrelerde toksisite sergilemediği ortaya konulmuştur. Şekil 3.45 a ve c'de görüldüğü üzere, PPP30 misel/BikDD gen

komplekslerinin tüm N/P oranlarında % hücre canlılıkları, boş formülasyonları ile kıyaslandığında her iki hücre hattında da ortalama %90 üzerindedir. Bunun nedeni, düşük hidroliz derecesindeki PPP30 misellerin DNA'yı tamamen kondanse edebilmesi ve polimer zinciri üzerindeki tüm PEI bloklarına ait katyonik yükün DNA ile gizlenebilmesinden kaynaklıdır [93]. Şekil 3.45b'de görüldüğü üzere, BikDD yüklü PPP 60 misellerin N/P 8'den N/P 30'a değişen formülasyonları ile muamele edilen MCF-7 hücrelerindeki canlılıklarının %79'dan %56'ya, boş PPP60 misellerin artan N/P oranlarındaki konsantrasyonları ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde canlılığın %93'ten %76'ya azaldığı gözlenmiş olup, elde edilen bu sonuçlar, PPP60 miseller ve misel/gen komplekslerinin artan N/P oranlarında hücre canlılığını azaltıcı etkiye neden olduğunu ortaya koymuştur. PPP60 misel/BikDD gen yüklü miseller ile muamele edilen MCF-7 hücrelerin % canlılığı, çıplak BikDD geni muamele edilmiş kontrol grubu ile kıyaslandığında N/P 20 ve N/P 30 oranları arasında anlamlı fark bulunmuştur (*p<0,05). Bu beklediğimiz bir sonuç olup, artan N/P oranlarında toksisitenin arttığını ifade etmektedir. Aynı N/P oranlarındaki boş PPP60 miseller ile gen yüklü miseller kıyaslandığında formülasyonlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur (*p<0,05). Şekil 3.45d'de görüldüğü üzere, MDA-MB-468 hücrelerine uygulanan boş PPP60 miseller ile PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin canlılıkları arasında anlamlı fark bulunmamakla birlikte (*p>0,05), gen yüklü komplekslerin tüm N/P oranları, kontrol grubu olan pEGFP-BikDD'ye göre anlamlı fark göstermiştir. Sonuçlar formülasyonların artan N/P oranlarında, MDA-MB-468 hücrelerinin canlılıklarını azalttığını, buna rağmen en yüksek N/P oranında dahi hücrelerde ortalama %80 oranında canlılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, hücre tipine bağlı olarak formülasyonların hücreler üzerindeki toksik etkisinin değiştiğini ortaya koymuş olup [87, 232], MCF-7 hücrelerinin MDA-MB-468 hücrelerine göre daha duyarlı olduğu tayin edilmiştir. Ayrıca, sonuçlar hidroliz derecesinin ve N/P oranlarının hücre canlılığı üzerine etkisi olduğunu göstermiştir. Artan hidroliz derecesine bağlı olarak PPP60 misellerini oluşturan polimer zincirindeki PEI molekül ağırlığının artışı hücre canlılığını azaltmış olup, bu sonuçlar literatür bulgularını destekler niteliktedir [15, 49, 178, 179, 233]. Yüksek hidroliz derecesinde, blok kopolimer zinciri üzerindeki PEI bloklarının terapötik gen ile tam kondensasyonu sonrası halen polimer zinciri üzerinde fazladan pozitif yükün bulunması hücrelerde toksik etki oluşturmaktadır. Bu bulgular çalışmamızdaki zeta potansiyel sonuçlarını destekler nitelikte olup, yüksek hidroliz derecesindeki PPP60 misellerin, düşük hidroliz derecesindeki PPP30 misellere göre daha yüksek pozitif zeta potansiyel sergilediği sonuçlar ile uyumludur.

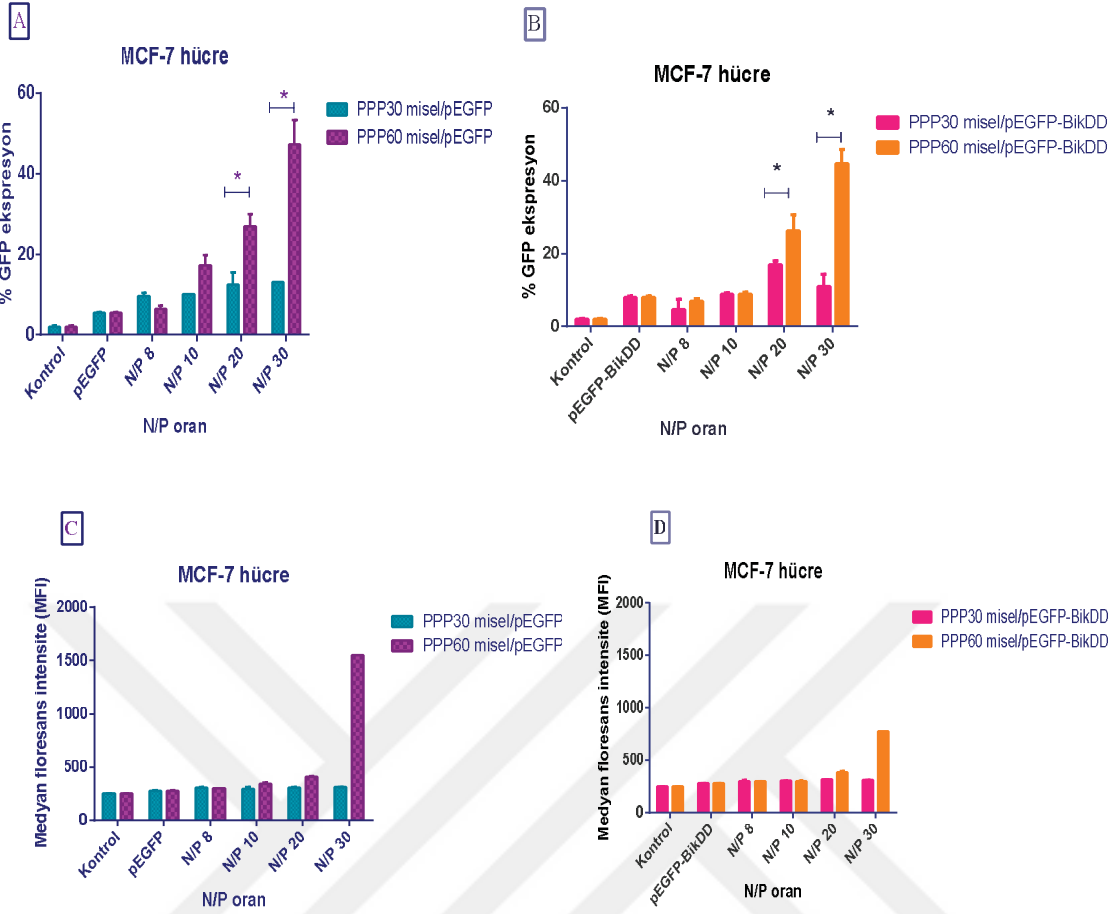
Fernandes ve arkadaşları [15], PEOx'un kısmi hidrolizi ile üç farklı hidroliz derecesinde (%30, %70 ve %96) sentezledikleri PEOx-ko-PEI polimeri ile hazırladıkları polimer/DNA komplekslerinin HeLa hücrelerindeki 24 saatlik canlılıklarını MTT testi ile analiz etmişlerdir. Araştırmacılar, %30 hidrolize kompleksler ile %65 oranında canlılık elde etmiş olup, %96 hidroliz derecesindeki kompleksler ile canlılığın %44,3'e azaldığını tayin etmiştir. Çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar, Fernandes ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu olup, artan hidroliz derecesinde hücre canlılığında azalma meydana geldiğini ve polikasyonun negatif yüklü membranlar ile güçlü etkileşimi nedeniyle toksik olduğunu ortaya koymuştur. Benzer bir çalışma Lin ve arkadaşları [93] tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, farklı hidroliz derecelerindeki boş P(EOz/EI)-*b*-PEOz-NH₂ polimerler ile muamele edilen HeLa hücrelerinde, artan hidroliz oranına bağlı olarak hücre canlılıklarında azalma tespit etmişlerdir. Ancak araştırmacılar, plazmit DNA ile hazırlanan polipeks formülasyonlarında artan konsantrasyonlarda dahi hücre canlılığının yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Bunun nedeni, polipeks oluşum sonucu PEOx'un hidrofilik kabuk yapısının PEI'ni çekirdekte tutarak katyonik yükünün gizlenmesi sonucu hücrelerde toksisiteye neden olmaması ile ilişkilendirilmiştir.

Yüksek toksisitenin yüksek transfeksiyon etkinliği ile ilişkili olduğu geçmiş çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Tez çalışmamızda başarılı bir transfeksiyon etkinliği için kullanılan PEI polikasyonun toksisitesi güçlü pozitif yükünden kaynaklıdır [235]. Konvansiyonel 25 kD'lık lineer PEI, gen transfeksiyonu için oldukça yüksek etkinlikte bir polikasyon olmakla birlikte, yüksek toksisite ve biyoparçalanır özellikte olmayışı polimerin dezavantajlarını oluşturmaktadır [213, 235]. Bu nedenle son yıllarda, birçok çalışmada düşük molekül ağırlıklı PEI kullanımına odaklanılmıştır [233, 236, 237]. Bu düşünceden yola çıkarak, lineer PEI'nin kısıtlamalarını ortadan kaldırmak ve toksisitesini azaltmak için tez çalışmamızda PEOx'un kısmi hidrolizi ile sentezlenen polimer omurgasında 1400 ve 2800 Da gibi oldukça düşük molekül ağırlığında lineer PEI içeren blok kopolimerler kullanılmıştır. Sitotoksosite sonuçlarımız literatürle uyumlu olarak, PEOx'un hidrolizinin hücre canlılığını etkileyen kritik bir faktör olduğunu doğrulamış olup [159], yüksek toksisite sergileyen PPP60 misel/gen komplekslerinin, N/P 30 oranındaki formülasyonlarının meme kanseri hücrelerini daha yüksek etkinlikle transfekte edebilme yeteneğinde olacağını düşündürmüştür.

3.4.2. Misel/pEGFP-BikDD Gen Komplekslerinin MCF-7 ve MDA-MB-468 Hücrelerine *in vitro* Transfeksiyonuna İlişkin Sonuçlar

Transfeksiyon etkinliği ve sitotoksosite, gen taşıyıcı sistemler için en önemli parametrelerdendir ve artan transfeksiyon etkinliğinin yüksek toksisite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak PEI taşıyan polimerik taşıyıcı sistemin konsantrasyonu, transfeksiyonun başarısı açısından oldukça önemlidir [89, 206]. Bu nedenle, hücrelerde toksik etki oluşturmayan ancak yüksek transfeksiyon etkinliği gösterebilen PEI içeren misel konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Tez çalışmamızda, transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak en uygun formülasyonu seçebilmek amacıyla, daha önce bahsettiğimiz *in vitro* sitotoksosite çalışmaları ile miseli oluşturan blok kopolimerin her bir N/P oranı için farklı dilüsyon oranları hazırlanmış ve hücrelerde toksisite oluşturmayan en düşük konsantrasyon belirlenmiştir. Her bir N/P oranı için çalışılan 3 farklı dilüsyon oranından hücrelerde en yüksek canlılığa neden olan, 1: 8 dilüsyon oranı seçilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda 50 µL'de 4µg BikDD olacak şekilde serumsuz ortamda hazırlanan misel/gen kompleksleri 750 µL kültür ortamı içeren hücrelere uygulanarak bu toksik olmayan doza düşülmüştür.

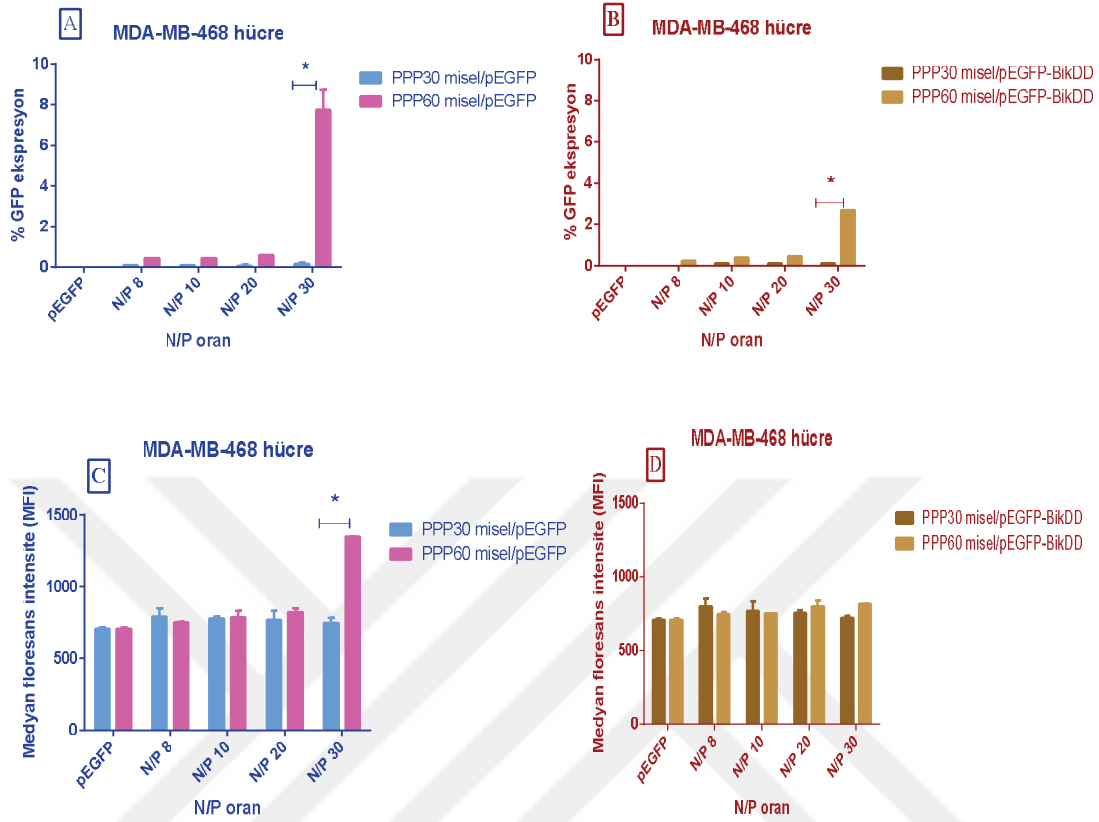
Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin MCF-7 ve MDA-MB-468 meme kanseri hücre hatlarındaki *in vitro* transfeksiyon etkinliği Bölüm 2.2.9.2' de belirtildiği şekilde serum içeren ve serum içermeyen hücre kültür ortamında 48 saat süre sonunda flow sitometre ile analiz edilmiştir. Tez çalışmamızda, *in vitro* transfeksiyon etkinliğinin tayini yeşil floresan proteini (GFP) kodlayan bir plazmit DNA'nın (pEGFP-C3) ve plazmit DNA'ya sokulmuş terapötik BikDD geninin (pEGFP-BikDD) hücrelerdeki ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. GFP eksprese eden hücreler (GFP+) yüzde olarak ve medyan floresan intensitesi (MFI) ölçülerek ifade edilmiştir. Medyan floresan intensitesi, popülasyondaki GFP+ hücrelerin floresan yoğunluğunu ifade etmektedir. Çalışmamızda, çıplak pEGFP-C3 ya da pEGFP-BikDD geni uygulanmış hücreler ve formülasyon uygulanmamış hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Öncelikle, serumun *in vitro* transfeksiyona etkisini tayin etmek amacıyla formülasyonlar doğrudan serum içeren kültür ortamına ekilmiş MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerine uygulanmış ve 48 saat sonunda analiz edilmiştir. GFP ekspresyon ve MFI verilerine ilişkin bulgular Şekil 3.46 ve 3.47'de verilmiştir.



Şekil 3. 46. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD komplekslerinin serumlu ortamdaki MCF-7 hücrelerine transfeksiyon etkinliği (a ve b) %GFP ekspresyon (c ve d) Medyan floresans intensite (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.46 a'da, PPP30 ve PPP60 misellerin terapötik gen içermeyen pEGFP-C3 ile kompleks formülasyonların MCF-7 hücre hattındaki %GFP ekspresyonuna ait sonuçlar verilmiştir. Çıplak pEGFP-C3 uygulanan hücrede %5,5 oranında ekspresyon elde edilmiş olup, en düşük N/P 8 oranı ile PPP30 formülasyonu için dahi ekspresyon oranı %9,6, PPP60 formülasyonu için ise %6,4 olarak tayin edilmiştir. PPP30 formülasyonu ile en yüksek N/P 30 oranında ise GFP ekspresyonu $13,2 \pm 0,0$ 'de kalırken, PPP60 formülasyonunda bu oran çok daha yüksek $47,2 \pm 0,0$ olarak tayin edilmiştir. Şekil 3.46b'de verilen terapötik gen yüklü misellerin MCF-7 hücresindeki 48 saatlik transfeksiyon analizleri, pEGFP-C3 yüklü miseller ile benzer sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. Çıplak pEGFP-BikDD ile muamele edilen hücrelerde GFP ekspresyonu %8 oranında iken, en yüksek N/P 30 oranındaki PPP30/BikDD kompleks miselleri ile GFP ekspresyonu %11, PPP60/BikDD kompleks miselleri ile ise %44 oranında GFP ekspresyonu tayin edilmiştir. Artan hidroliz derecesi ve N/P oranları ile paralel olarak formülasyonların hücrelerdeki transfeksiyon etkinlikleri de artış sergilemiştir. Tüm

sonuçlar MFI değerleri ile desteklenmiş olup, kontrol ile kıyaslandığında en yüksek N/P oranında, en yüksek MFI elde edilmiştir.



Şekil 3. 47. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD komplekslerinin serumlu ortamdaki MDA-MB-468 hücrelerine transfeksiyon etkinliği a ve b) %GFP ekspresyon (c ve d) Medyan floresan intensite (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

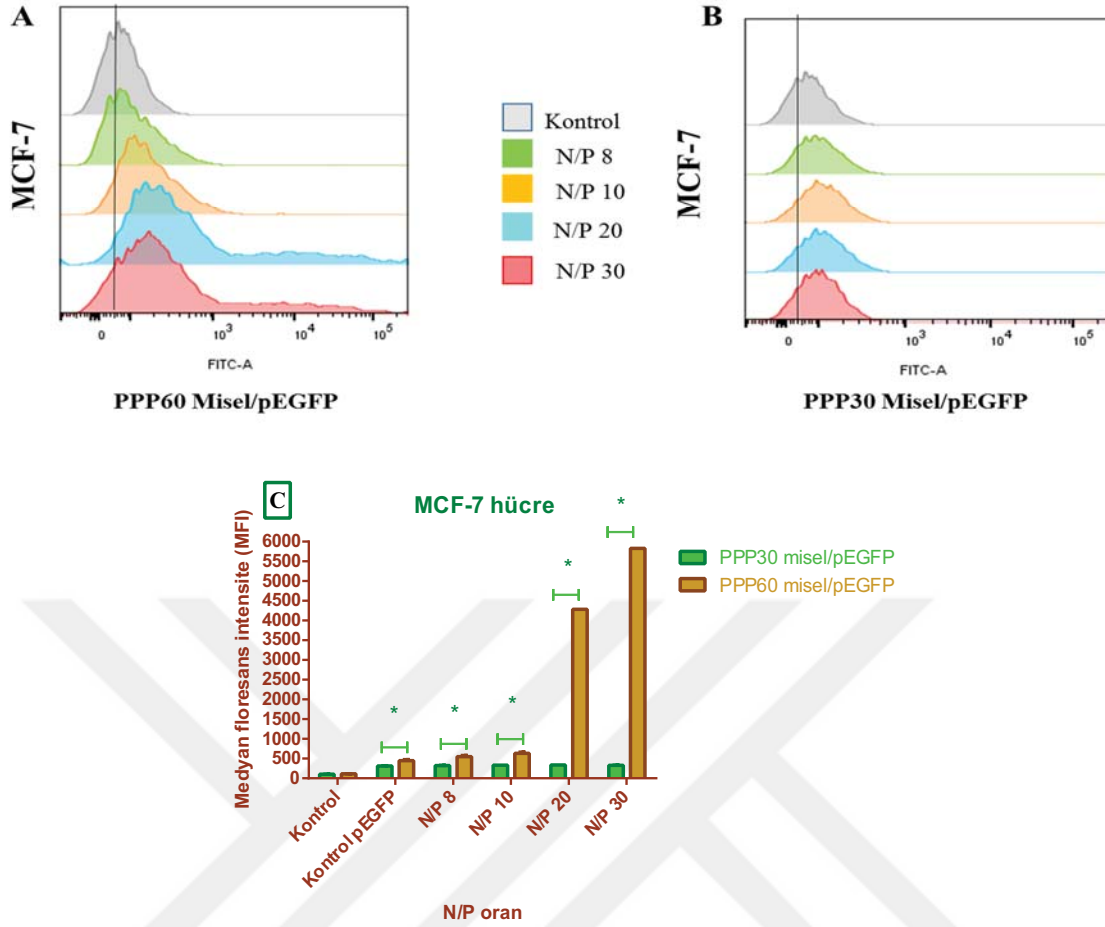
Şekil 3.47a ve b’de görüldüğü üzere, formülasyonların serumlu ortamda MDA-MB-468 hücreleri üzerindeki transfeksiyon etkinliği, MCF-7 hücrelerine göre anlamlı oranda düşük bulunmuştur. Her iki pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD yüklü PPP60 miseller ile en yüksek N/P 30 oranında dahi sırasıyla %8 ve %2,5 GFP ekspresyonu tayin edilmiştir. PPP30 formülasyonların MDA-MB-468 hücrelerindeki transfeksiyon etkinliği tüm N/P oranlarında kontrol grubu hücreleri ile aynıdır, bu nedenle serum içeren ortamda PPP30 misel/gen komplekslerinin etkili bir transfeksiyon ajanı olmadığı belirlenmiştir. PPP60 misel/gen kompleksleri ise yapısındaki yüksek PEI oranına rağmen serumlu ortamda MDA-MB-468 hücrelerinde düşük transfeksiyon etkinliği göstermiştir. %GFP ekspresyon sonuçları, MFI değerleri ile doğrulanmıştır. Sonuçlar, MDA-MB-468 hücrelerinde %10 serum içeren ortamın formülasyonların gen transfeksiyonunu olumsuz etkilediğini göstermiştir. Ayrıca, her iki hücre hattında çıplak pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD gen

uygulamasý sonucu transfeksiyonun çok düşük bulunması taşıyıcı bir sistem olmadan DNA'nın hücre çekirdeğine aktarılmasının mümkün olmadığını ortaya koymuştur [52].

Serum ortamı, transfeksiyonun başarısını etkileyen önemli parametrelerden biridir. Serum proteinleri gen taşıyıcı sistemlere bağlanarak partiküllerin yükünü nötrlemekte ve böylece agregasyona yol açarak transfeksiyonu engellemektedir [51, 205]. Ancak çalışmamızdaki transfeksiyon sonuçları, PPP60 misel/gen komplekslerinin artan N/P oranına bağlı olarak %10 serum ortamında dahi MCF-7 hücrelerinde yüksek transfeksiyon etkinliği gösterdiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, PPP30 misel/gen kompleksleri MCF-7 hücrelerinde düşük transfeksiyon göstermiş olup, PPP60 miselleri ile kıyaslandığında, N/P 20 ve 30 oranlarında formülasyonlar arasında anlamlı fark elde edilmiştir (*p<0,05). Bu bulgu, hidroliz derecesinin transfeksiyon üzerindeki etkisini net bir biçimde ortaya koymuştur. Ayrıca PPP60 misel/gen kompleksleri ile MDA-MB-468 hücrelerinde, MCF-7 hücrelerine göre daha düşük transfeksiyon etkinliği elde edilmesi, gen transfeksiyonun hücre tipine bağlı olduğunu düşündürmüştür. Yin ve arkadaşları [239], PEI içeren partiküllerin pDNA transfeksiyon etkinliklerini serum varlığında MCF-7 hücreleri ve MDA-MB-231 hücrelerinde değerlendirmiştir. Sonuçlar tez çalışmamızı doğrular nitelikte olup MDA-MB-231 hücrelerine aktarımın MCF-7 hücrelerine göre düşük olduğunu ve aktarım etkinliğinin hücre tipine göre farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur.

Serum ortamındaki transfeksiyon analizlerine ait tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, PPP60 misel/gen komplekslerinin her iki hücre hattındaki gen transfeksiyonu, yüksek PEI hidroliz oranı ve misel kabuğunu oluşturan PEOx'un yüksek hidrofilik yapısı nedeniyle serum proteinlerine dayanıklı olduğunu, opsonizasyondan korunma yeteneğine sahip, stabilitesi yüksek başarılı bir gen taşıyıcı sistem olabileceğini kanıtlamıştır.

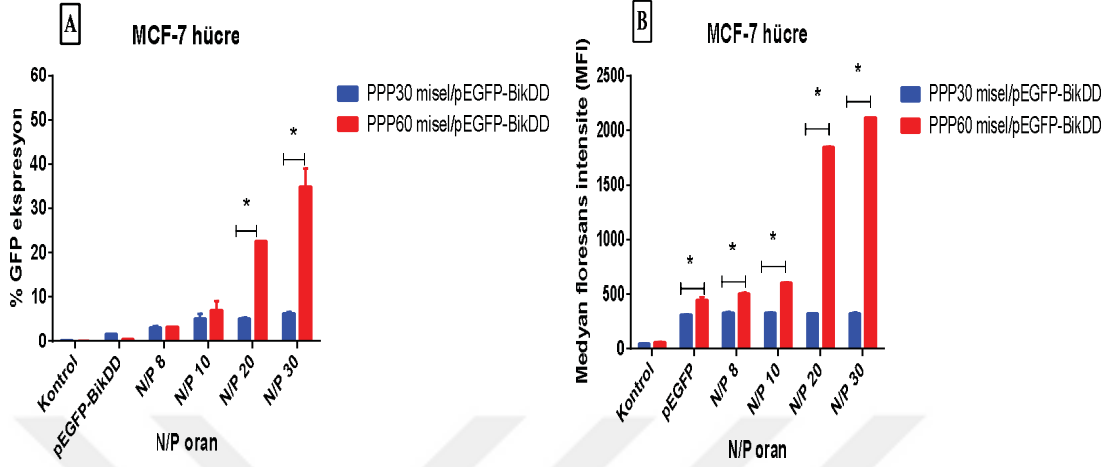
Serumlu ortamdaki çalışmalar sonrasında, PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP ve misel/BikDD gen komplekslerinin serum içermeyen ortamdaki transfeksiyon etkinlikleri 48 saat sonunda MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde değerlendirilmiş ve %GFP ekspresyon ve MFI sonuçları Şekil 3.48-3.52 arasında verilmiştir.



Şekil 3. 48. Farklı N/P oranlarındaki (a)PPP60 ve (b)PPP30 misel/pEGFP-C3 kompleksleri ile muamele edilen serum içermeyen ortamdaki MCF-7 hücrelerinin GFP ekspresyonlarına ait flow sitometre histogramı (c) Medyan floresan intensite (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.48 a ve b’de görüldüğü üzere kontrol grubu olarak kullanılan, formülasyon uygulanmayan MCF-7 hücrelerinde düşük floresan ekspresyonu elde edilmiş olup, her iki formülasyonda artan N/P oranına bağlı olarak kontrole göre piklerde sağa doğru kayma gözlenmiştir. Ancak PPP30 misel/gen komplekslerinin farklı N/P oranlarındaki pik kaymaları kontrol grubuna yakınlık göstermiştir. Kontrol grubu pEGFP-C3 formülasyonun GFP ekspresyonu %1,6 oranında olup, PPP30 misel/pEGFP-C3 yüklü misellerin MCF-7 hücrelerindeki %GFP ekspresyonu en yüksek N/P 30 oranında dahi %5,1’dir. PPP60 misel/pEGFP-C3 ile ise en yüksek N/P 30 oranında hücrelerde %44,6 oranında GFP ekspresyonu elde edilmiştir. MFI değerleri incelendiğinde ise, PPP60 misel/pEGFP kompleksleri ile N/P 30 oranında kontrol grubuna göre MCF-7 hücrelerinde 30 kat fazla floresans yoğunluğu, N/P 20 oranında ise 20 kat fazla floresans yoğunluğu elde edilmiştir. Bu durum artan N/P oranına bağlı olarak hücrelerin GFP ekspresyonlarında artış meydana geldiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular literatür verilerini doğrular nitelikte olup, Gaspar ve arkadaşlarının, PEtOx-PLA-g-PEI blok kopolimeri ile yaptıkları çalışmada bu blok

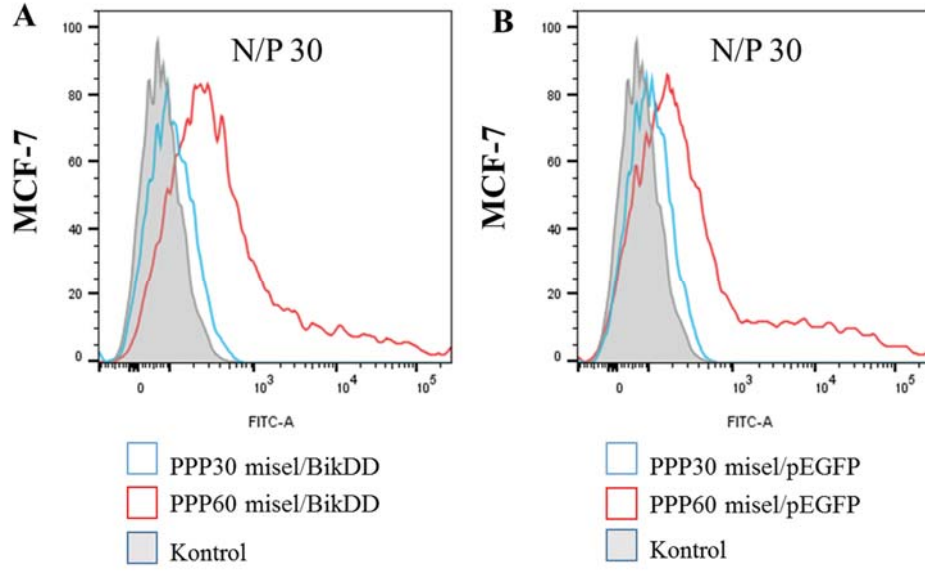
kopolimerler ile hazırladıkları misellerin artan N/P oranlarında küçük halkasal DNA'yı MCF-7 hücrelerine yüksek etkinlikte aktardıklarını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar en yüksek N/P oranında en yüksek gen ekspresyonu (%50) gözlemişlerdir [179].



Şekil 3. 49. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP-BikDD komplekslerinin serum içermeyen ortamdaki MCF-7 hücrelerine transfeksiyon etkinliği (a) GFP ekspresyon (b) Medyan Floresan intensite (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.49'da görüldüğü üzere terapötik BikDD geni yüklü PPP30 ve PPP60 misellerin MCF-7 hücrelerindeki gen transfeksiyon etkinlikleri pEGFP-C3 yüklü miseller ile benzer sonuçlar göstermiştir. Düşük hidroliz derecesindeki PPP30 misellerin gen aktarım etkinlikleri PPP60 misellere göre oldukça düşük bulunmuştur. PPP60 misellerin artan N/P oranlarında hücrelere yüksek oranda BikDD genini aktardığı GFP ekspresyonlarında meydana gelen artış ile tayin edilmiştir. Çıplak pEGFP-BikDD geninin MCF-7 hücrelerindeki GFP ekspresyonu %0,5 olarak oldukça düşüktür. PPP30 misellerin gen aktarım etkinliği artan N/P oranlarında dahi düşük bulunmuş olup, en yüksek N/P 30 oranında pEGFP-BikDD genini hücrelere %6,3 oranında, PPP60 misellerin ise %35 oranında yüksek bir etkinlik ile aktardığı tayin edilmiştir. Ayrıca formülasyonların N/P20 ve N/P30 oranlarındaki gen ekspresyonları arasında anlamlı fark gözlenmiştir (*p<0,05). Bu fark, artan N/P oranlarında PPP60 misellerin, PPP30 misellere göre MCF-7 hücrelerine yüksek etkinlikte gen aktarımını gerçekleştirdiğini istatistiksel olarak da ortaya koymuştur.

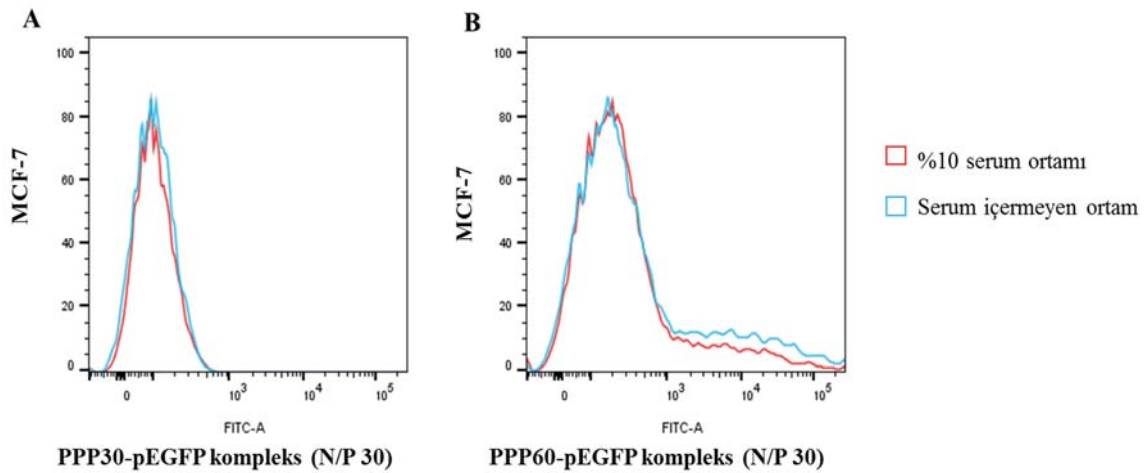
N/P 30 oranındaki PPP30 ve PPP60 miseller ile aktarılan genlerin MCF-7 hücrelerindeki GFP ekspresyon sonuçları, karşılaştırmalı olarak Şekil 3.50'deki flow sitometre histogramlarında özetlenmiştir.



Şekil 3. 50. (a) pEGFP-BikDD (b) pEGFP-C3 yüklü N/P 30 orandaki PPP30 ve PPP60 misellerin MCF-7 hücrelerindeki gen ekspresyonlarına ait flow sitometre histogramları

Şekil 3.50’de görüldüğü üzere, kontrol grubu (gri) olarak formülasyon uygulanmayan hücrelerde düşük floresan ekspresyonu gözlenmiştir. PPP30 misel/gen kompleksleri (mavi) uygulanan hücrelerde kontrol grubuna yakın düşük ekspresyon tayin edilmiş, kırmızı ile gösterilen PPP60 misel/gen kompleksleri uygulanan MCF-7 hücrelerinde ise yüksek floresan ekspresyonu tayin edilmiştir.

Ayrıca Şekil 3.47’ de verilen formülasyonların serumlu ortamdaki gen transfeksiyon sonuçları, serum içermeyen ortamdaki sonuçlar ile karşılaştırılmış ve en yüksek transfeksiyon etkinliği sergileyen N/P 30 oranındaki komplekslerin serum ortamındaki gen aktarım başarısı tayin edilmiştir. Karşılaştırma sonuçları Şekil 3.51’de verilmiştir.

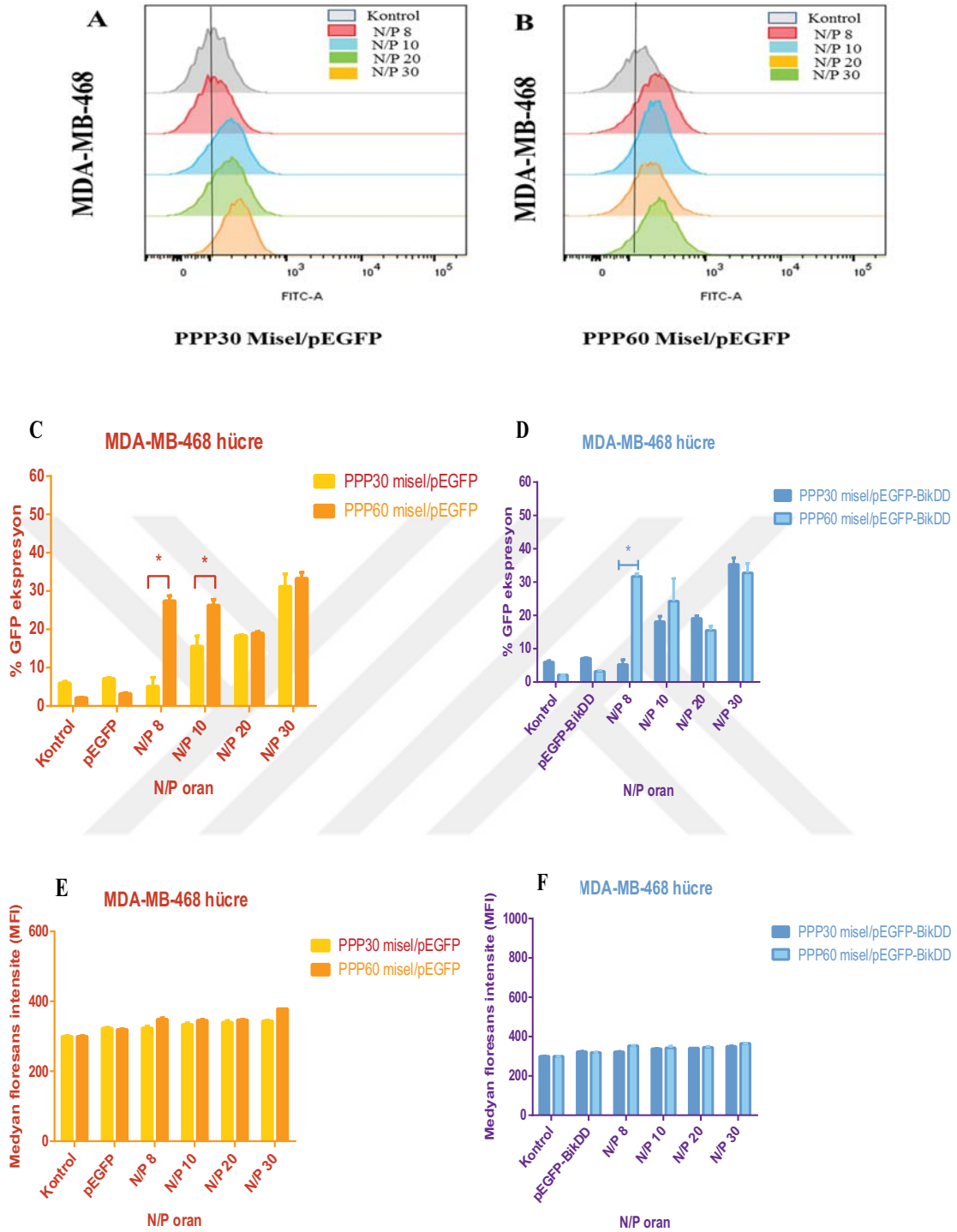


Şekil 3. 51. (a) PPP30-pEGFP (b) PPP60-pEGFP formülasyonlarının %10 serum içeren ve serum içermeyen ortamdaki floresan ekspresyonlarına ait flow sitometre histogramları

Şekil 3.51’de görüldüğü üzere komplekslerin %10 serum içeren ve serumsuz ortamdaki floresan ekspresyon histogramları üst üste çakışmıştır. Bu sonuç, en yüksek N/P oranında her iki PPP30 ve PPP60 komplekslerinin serumlu ve serumsuz ortamda pEGFP-C3’ü MCF-7 hücrelerine benzer floresan ekspresyon oranı ile aktarabildiğini göstermiştir. Ancak PPP60-pEGFP kompleksleri ile muamele edilen hücrelerdeki floresan ekspresyonu, serumlu ortamda %44, serumsuz ortamda ise %47 oranında oldukça yüksek iken, PPP30-pEGFP kompleksleri ile bu oranın %5,1 ve 13,2 olarak oldukça düşük bulunmuştur. Sonuçlar, PPP60 misel formülasyonlarının en yüksek N/P 30 oranında, %10 serum ortamında dahi MCF-7 hücrelerine geni yüksek etkinlikte aktardığını ve gen taşımadaki başarısını ortaya koymuştur. Bu bulgular, PPP60 formülasyonun *in vivo* çalışmalarda yüksek serum stabilitesi nedeniyle kan dolaşımında uzun süre kalabileceğini işaret etmektedir.

Aynı zamanda, PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin gen transfeksiyon etkinlikleri, tez çalışmamız kapsamında çalışılan diğer bir hücre hattı olan MDA-MB-468 hücrelerinde değerlendirilmiştir (Şekil 3.52)

Şekil 3.52 a ve b’de görüldüğü üzere, MDA-MB-468 hücreleri ile serumsuz ortamda yapılan transfeksiyon çalışmaları sonuçlarına göre, PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP kompleksleri uygulanan hücrelerde artan N/P oranlarına bağlı olarak hücrelerdeki GFP ekspresyonu artmıştır. PPP30 misel/pEGFP kompleksleri ile N/P 8 oranında neredeyse çıplak pEGFP-C3’ye eşit oranda %15,6 GFP ekspresyonu elde edilmiş olup, N/P 30 oranındaki formülasyonlar ile muamele edilen hücrelerdeki transfeksiyon etkinliği, N/P oranındaki artışa bağlı olarak %31,2 GFP ekspresyonu ile sonuçlanmıştır. PPP30 misel/pEGFP kompleksleri ile PPP60 misel/pEGFP kompleksleri kıyaslandığında, N/P 20 ve N/P 30 oranlarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır (*p>0,05). Bu sonuçlar PPP30 ve PPP60 misellerin MDA-MB-468 hücrelerindeki transfeksiyon etkinliklerinin benzer oranda olduğunu ortaya koymuştur. BikDD yüklü PPP30 miseller ile aynı şekilde artan N/P oranlarında hücredeki gen ekspresyonunda artış tayin edilmiştir. Yine PPP60 misel/gen kompleksleri ile muamele edilen hücrelerde en yüksek N/P 30 oranında hücrelerde ortalama %32,8 oranı ile en yüksek GFP ekspresyonu tayin edilmiştir. Ancak formülasyon uygulanan hücrelerdeki medyan floresan intensitelerinin tüm N/P oranlarında dahi kontrol grubu ile anlamlı bir fark göstermediği belirlenmiştir. GFP eksprese eden hücre yüzdesi yüksek olmakla birlikte, hücrelerdeki floresan yoğunlukları homojendir.



Şekil 3. 52. Farklı N/P oranlarındaki PPP30 ve PPP60 misel/pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD komplekslerinin serum içermeyen ortamdaki MDA-MB-468 hücrelerine transfeksiyon etkinliği (a ve b) Flow sitometre histogram grafikleri (c ve d) GFP ekspresyon(e ve f) Medyan floresan intensitesi (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Tüm sonuçlar değerlendirildiğine, yüksek hidroliz derecesindeki PPP60 misellerin yüksek N/P oranında terapötik geni serumsuz ortamda her iki hücre hattına da başarılı bir şekilde aktarabilme yeteneğinde olduğunu göstermekle birlikte, hücre tipine bağlı olarak GFP ekspresyonlarında farklılık gözlenmiştir. MDA-MB-468 hücre hattı, üçlü negatif meme

kanseri hücre modelindedir ve PC hücre kaynaklı büyüme faktörü (PCDGF, epitelin / granül prekürsörü) eksprese ettiğinden dolayı, daha tümörojenik ve agresif bir kanser hücresidir [240]. Ayrıca bu hücrelerin duplikasyon süresinin 47 saat olduğu literatürde belirtilmiştir [241]. Hücrelerin bu özelliği nedeniyle, komplekslerin etkili transfeksiyonu belirli oranlarda kısıtlanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar sitotoksosite sonuçları ile uyumluluk sergilemiş ve yüksek toksisitenin yüksek transfeksiyona yol açtığı görüşünü doğrulamıştır. Bu bağlamda, blok kopolimerin PEI içeriği başarılı bir gen transfeksiyonu için oldukça önemli bir faktördür, çünkü bilindiği üzere, PEI proton süngeri etkisi ile endozomdan kaçışı kolaylaştırarak genin nükleusa aktarımını kolaylaştırmaktadır [92, 206].

Jeong ve arkadaşları, %88 oranında hidrolize lineer PEI'nin en yüksek N/P oranında hücrelerde en yüksek transfeksiyon etkinliği sergilediğini ortaya koymuşlardır. En düşük hidroliz derecesinde (%55) transfeksiyon sonucu lusiferaz protein ekspresyonu %2 civarında iken, %88 hidroliz derecesindeki blok kopolimer ile gen aktarım sonucu hücrelerdeki ekspresyon %7,5 oranına yükselmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda polimer omurgasında artan PEI molekül ağırlığının hücrelerde toksisiteye neden olduğunu belirtmişlerdir [50].

Benzer bir çalışmada, Fernandes ve arkadaşları [15], PEtOx'un hidrolizi ile 3 farklı hidroliz oranında (%30, %70 ve %96) PEI içeren polimerler ile 5 µg β-galaktosidaz kodlayan plazmit DNA'yı kompleksleştirmiş ve HeLa servikal karsinoma hücrelerindeki transfeksiyon etkinliğini incelemiştir. Sonuçlar, artan hidroliz derecesinde %96 oranında PEI içeren komplekslerin artan N/P oranında en yüksek transfeksiyon etkinliği sergilediğini göstermiştir. %30 hidrolize polimer ile en yüksek N/P 100 oranında hücrelerde %5'in altında ekspresyon, %96 hidrolize polimer ile aynı N/P oranında 4 kat fazla ekspresyon elde edilmiştir. Ancak, bu hidroliz derecesindeki polimerler ile muamele edilen hücrelerin canlılıklarında azalma gözlenmiştir. Araştırmacılar, hidroliz derecesi ve PEI miktarının hücre transfeksiyonu ve toksisite üzerindeki etkisini ortaya koymuşlardır.

Gaspar ve arkadaşları[179] benzer yapıdaki polimerler ile hazırladıkları miselpleksler ile MCF-7 hücrelerinde %50 oranında GFP + hücre elde etmişlerdir. Tez çalışmamız sonuçlarının tüm bu bulguları doğrular nitelikte olduğu gösterilmiştir.

PPP30 misellerinin her iki serumlu ve serumsuz ortamda MCF-7 hücrelerine gen aktarım etkinliği yok denecek kadar azdır. Bununla birlikte düşük hidroliz derecesinde PEI

içermesine rağmen PPP30 misellerin MDA-MB-468 hücrelerine gen aktarımı serumsuz ortamda yüksek olup, serumlu ortamda hücrelerin kompleksler ile transfeksiyonu düşük bulunmuştur. Bu bulgu, MDA-MB-468 hücrelerinin, serumsuz ortamda PPP30 misellerin düşük PEI hidroliz oranı kaynaklı düşük katyonik yük ile düşük toksisiteye rağmen yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olduğunu göstermiştir. Jeong ve arkadaşları hücre tipine bağlı olmakla birlikte, düşük molekül ağırlığının toksisiteye yol açmadan yüksek transfeksiyona neden olabileceğini göstermiştir [50].

Ayrıca gen transfeksiyon çalışmaları sonuçlarında bir nokta dikkat çekmiştir. Her iki serumlu ve serumsuz ortamda, terapötik BikDD gen yüklü miseller ile uygulama sonrası elde edilen MFI sonuçları, pEGFP yüklü misellerin gen aktarımı ile elde edilen MFI sonuçları ile kıyaslandığında düşük bulunmuştur. Plazmit haritaları incelediğinde BikDD geninin pEGFP-C3 plazmit dizisi üzerinde GFP ekspresyonundan sorumlu gen dizisine ait bir bölgeye sokulduğunu ve bu çakışmadan kaynaklı olarak pEGFP- BikDD geninin GFP ekspresyonun engellenmesine bağlı olarak hücrelerdeki floresan yoğunluğunun düşmesine yol açtığı tayin edilmiştir.

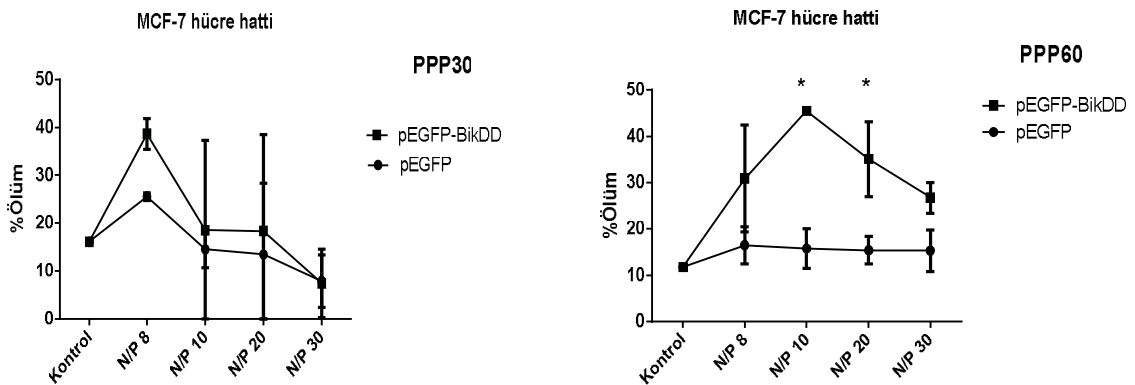
Özetle elde edilen tüm sonuçlar, gen transfeksiyon etkinliğinin hücre tipi, N/P oranı ve polimer omurgası üzerindeki PEI'nin hidroliz derecesine bağlı olduğunu ortaya koymuştur. PPP60 misel/gen kompleksleri, yüksek PEI hidroliz derecesi, düşük boyutu, yüksek zeta potansiyeli ve stabilitesi gibi özellikleri ile terapötik geni sıkı bir şekilde paketleyerek nükleusa başarılı bir şekilde ulaştırabilmiştir. Yüksek pozitif yüklü miseller terapötik gen ile sıkı kompleksler oluşturarak transfeksiyonun artmasına neden olmuştur. Ayrıca PPP60 misellerin yüksek katyonik yükü nedeniyle negatif yüklü membranlar ile etkileşiminin fazla olması da transfeksiyonun yüksek olması ile sonuçlanmıştır. Yüksek hidroliz derecesine rağmen PPP60 misellerin yapısındaki 2800 Da molekül ağırlığındaki PEI, pek çok literatüre göre çok düşük molekül ağırlığındadır ancak %44'ün üzerinde sergilediği transfeksiyon etkinliği, sistemin başarısını ortaya koymuştur. Bu bulgular ışığında, tez çalışmamızda kullanılan PPP60 misel/gen komplekslerinin özellikle meme kanseri tedavisinde *in vitro* ve *in vivo* uygulamalar için umut verici gen taşıyıcı ajanlar olabileceği gösterilmiştir.

3.4.3. Flow Sitometre Analizi ile Geç Apoptozise Bağlı Ölümün Değerlendirilmesi

Tez çalışmamızda, iki farklı hidroliz derecesindeki PPP30 ve PPP60 misellerin terapötik proapoptotik BikDD genini meme kanseri hücrelerine aktarımı sonucu hücrelerdeki geç apoptoz kaynaklı ölüm, yeni bir canlılık boyası olan DRAQ-7™ ile 599/644 nm

maksimum eksitasyon, 694 nm maksimum emisyonunda flow sitometre aracılığıyla tayin edilmiştir. DRAQ-7™ boyası geç apoptoz kaynaklı ölümün tayininde avantajlı özellikleri nedeniyle son yıllarda geleneksel olarak apoptoz tayininde kullanılan propodiyum iyodüre (PI) göre tercih edilmektedir. DRAQ-7™ membran bütünlüğü bozulmamış hücrelere giremez ve gerçek zamanlı tayini kolaydır. DRAQ-7™ boyasının canlı hücre membranını geçemediği fakat permeabilitesi yüksek hücreleri hızlıca geçerek nükleer DNA'yı işaretlediği belirtilmiştir. Bu nedenle apoptoz, nekroz ve ölüm kaynaklı hücre membran permeabilizasyonu ile ölü hücrelerin tayininde belirteç olarak işlev görmektedir [230, 241].

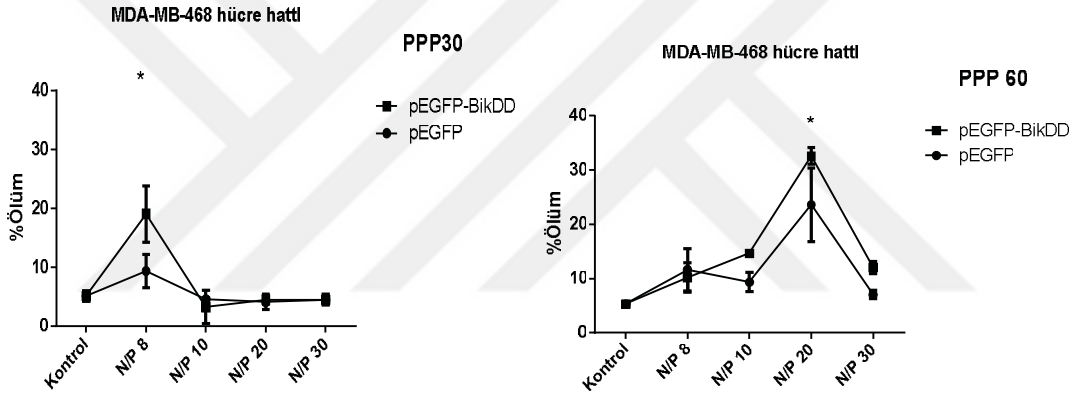
Tez çalışmamızda, pEGFP-BikDD geni ile kompleks miseller, Bölüm 2.2.9.2'de belirtildiği şekilde MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerine uygulanmış ve transfeksiyon etkinliği flow sitometre ile analiz edilmiştir. Analiz sırasında sadece GFP eksprese eden (GFP+) hücreler içerisinde DRAQ-7™ (+) hücrelerin yüzdesi, P10 alanın çizilmesi ile belirlenmiş olup, DRAQ-7™ (+) hücreler ölü hücreleri ifade etmektedir. Bu nedenle, alan içerisinde kalan hücreler sadece terapötik genin aktarıldığı ve geç apoptoza bağlı ölümün meydana geldiği hücrelerin yüzdesini ifade etmektedir. BikDD gen yüklü misellerin meme kanseri hücrelerindeki geç apoptoz kaynaklı ölüm oranı, terapötik BikDD geni taşımayan pEGFP-C3 yüklü miseller ile muamele edilen (kontrol grubu) hücrelerdeki ölüm oranı ile kıyaslanarak tayin edilmiştir. MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerinde, DRAQ-7™ analizine bağlı apoptoz kaynaklı ölüm sonuçları Şekil 3.53 ve Şekil 3.54'de verilmiştir. DRAQ-7™ ile hücre ölümünün belirlenmesi, GFP + hücrelerin tayini ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 53. pEGFP-BikDD ve pEGFP-C3 yüklü PPP30 ve PPP60 miseller ile muamele edilen MCF-7 hücrelerin DRAQ-7 analizine bağlı apoptoz kaynaklı % ölümü (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin MCF-7 hücre hattındaki apoptotik etkisi değerlendirildiğinde, PPP30 misel/gen kompleksleri ile muamele edilmiş hücrelerdeki

DRAQ-7™ + hücrelerin yüzdesi kontrole yakın bulunmuştur. N/P 8 oranındaki PPP30 misel/BikDD gen kompleksleri, MCF-7 hücrelerini %38,6 oranında, kontrol grubu miseller ise (pEGFP-C3 yüklü) %25,5 oranında öldürmüştür. N/P oranındaki artışa bağlı olarak DRAQ-7™ + ölü hücrelerin sayısı azalmış ve N/P 30 oranındaki pEGFP-C3 yüklü miseller ve terapötik gen yüklü miseller hücreleri %7 oranında öldürmüştür. Kontrol grubu miseller ile terapötik gen yüklü misellerin tüm N/P oranlarındaki sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (*p>0,05). PPP60 misel/BikDD gen kompleksleri ise kontrol grubu miseller (%15 ölüm) ile kıyaslandığında N/P 10 oranında MCF-7 hücrelerini %45,5 gibi yüksek bir oranda öldürmüştür. Aradaki fark, MCF-7 hücrelerinde %30 oranında BikDD kaynaklı ölüm meydana geldiğini ortaya koymuştur. Bu oran N/P 30 oranında %26,7'ye düşmekle birlikte kontrol misellere göre 2 kat fazla ölüm tayin edilmiştir.



Şekil 3. 54. pEGFP-BikDD ve pEGFP-C3 yüklü PPP30 ve PPP60 miseller ile muamele edilen MDA-MB-468 hücrelerin DRAQ-7 analizine bağlı apoptoz kaynaklı % ölümü (n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Şekil 3.54'de verilen MDA-MB-468 hücre hattındaki analiz sonuçları PPP30 misel/BikDD komplekslerinin, kontrol grubu miseller ile benzer sonuçlar gösterdiğini ortaya koymuştur. PPP30 misel/BikDD komplekslerinin N/P 10, 20 ve 30 oranlarındaki formülasyonları ile muamele edilmiş MDA-MB-468 hücrelerindeki ölüm oranı, formülasyon uygulanmamış kontrol hücrelerinin ölüm oranına yakın olup anlamlı bir fark bulunamamıştır (*p>0,05). PPP30 misellerin N/P 8 oranındaki pEGFP ve pEGFP-BikDD yüklü formülasyonları ile muamele edilen hücrelerde % ölüm açısından anlamlı bir fark elde edilmesine rağmen standart sapmaları yüksek olduğundan, % ölüm oranı önemsiz bulunmuştur. PPP60 misel/BikDD gen komplekslerinin N/P 20 formülasyonları, MDA-MB-468 hücrelerini %30 oranında, pEGFP yüklü miseller ise %20 oranında öldürmüş olup, aradaki fark, BikDD geni yüklü misellerin %10 oranında hücre ölümüne neden olduğunu ortaya koymuştur.

N/P 30 oranındaki miseller ile muamele edilen MDA-MB-468 hücrelerinde apoptoza bağlı % ölümü ilginç bir şekilde düşmüş ve kontrol grubu miseller ile yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Literatür bulguları incelendiğinde BikDD geninin meme kanseri hücrelerindeki apoptoza bağlı ölüm etkinliğinin hücre hattına bağlı olarak, çok yüksek oranda olmadığı tayin edilmiştir. Araştırmacılar, BikDD etkinliğinin hücre hattına bağlı olmakla birlikte ölüm oranını MCF-7 hücrelerinde %20-%35 civarında [34, 35], MDA-MB-468 [243] hücrelerinde ise %13 gibi düşük oranda olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular ile kıyaslandığında analiz sonuçlarımız literatür ile tam anlamıyla uyumludur. Özellikle PPP60 misel/gen komplekslerinin kontrol grubu misellere göre MCF-7 hücrelerine BikDD genini başarılı bir şekilde aktardığını ve kontrol misellere göre daha yüksek oranda apoptoza neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgular daha önce gerçekleştirdiğimiz transfeksiyon analiz sonuçlarını destekler niteliktedir. Her iki hücre hattında, PPP30 misel/BikDD komplekslerinden kaynaklı geç apoptoza bağlı ölümün düşük olması, transfeksiyon etkinliğinin düşük olmasına bağlı olarak düşük bulunmuştur. Yüksek transfeksiyon etkinliği gösteren PPP60 miseller ise MCF-7 hücrelerini daha yüksek oranda ölüme sürüklemiştir ancak ilginç bir şekilde, beklendiği gibi en yüksek N/P oranlarında yüksek hücre ölümü elde edilememiştir.

BikDD geni meme kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünün apoptotik gen tedavisinde kullanılmaktadır [37, 38, 40]. Bu gen apoptotik etkisini, ürünü olan BikDD proteinin kanser hücrelerinde overeksprese edilen Bcl-2 proteinlerine bağlanarak ve böylece apoptoz yolağını aktive ederek gerçekleştirmektedir [35]. Literatürde, Bcl-2 proteinini düşük eksprese eden MCF-7 hücrelerinde, BikDD geninin apoptotik etkinliğinin düşük olduğu ve buna bağlı olarak BikDD geni kaynaklı apoptotik yolağın bu hücrelerde aktif hale gelmediği ifade edilmiştir [244]. Çalışmamızda N/P 20 ve N/P 30 oranında ölüm oranının düşük olması bununla ilişkili olabilir. Ayrıca, apoptoz kaynaklı ölümün yüksek N/P oranlarında düşük olması nekrotik hücrelerin tayin edilmemesinden kaynaklı da olabilir. Apoptotik BikDD geni uygulaması sonucu kanser hücreleri nekroza uğramış olabilirler ancak tez çalışmamız kapsamında sadece geç apoptoz kaynaklı ölüm tayin edildiğinden ölüm oranı düşükmüş gibi gözlenebilir. Çalışmamızda erken apoptoz ya da nekrozun tayini için sıklıkla kullanılan Annexin V-FITC yönteminin tercih edilmemesinin nedeni, GFP proteinin yeşil floresanın, Annexin V-FITC ile aynı dalga boyunda ışıma vermesine bağlı olarak floresanlarında çakışma meydana geleceğinden dolayıdır. Bu

nedenle sadece geç apoptozise bağılı ölüm çalışılmış olup, erken apoptoz ve nekroz durumundaki hücrelerin tayininin farklı sonuçların elde edilmesine neden olabileceğı düşünölmektedir. Buna rağmen PPP60 miseller ile en yüksek N/P 20 ve 30 oranlarında dahi kontrol grubu miseller ile kıyaslandığında hücrede %11 ile %20 arasında ile apoptoza bağılı ölüm tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatür bulguları ile kıyaslandığında BikDD geninin hücrelerdeki apoptotik ölüm etkinliğı ile oldukça benzerlik göstermektedir. Lang ve arkadaşları, VISA caudalin vektör ile BikDD geninin MCF-7 hücrelerinde %20 oranında ölüme yol açtığını göstermiştir [36].

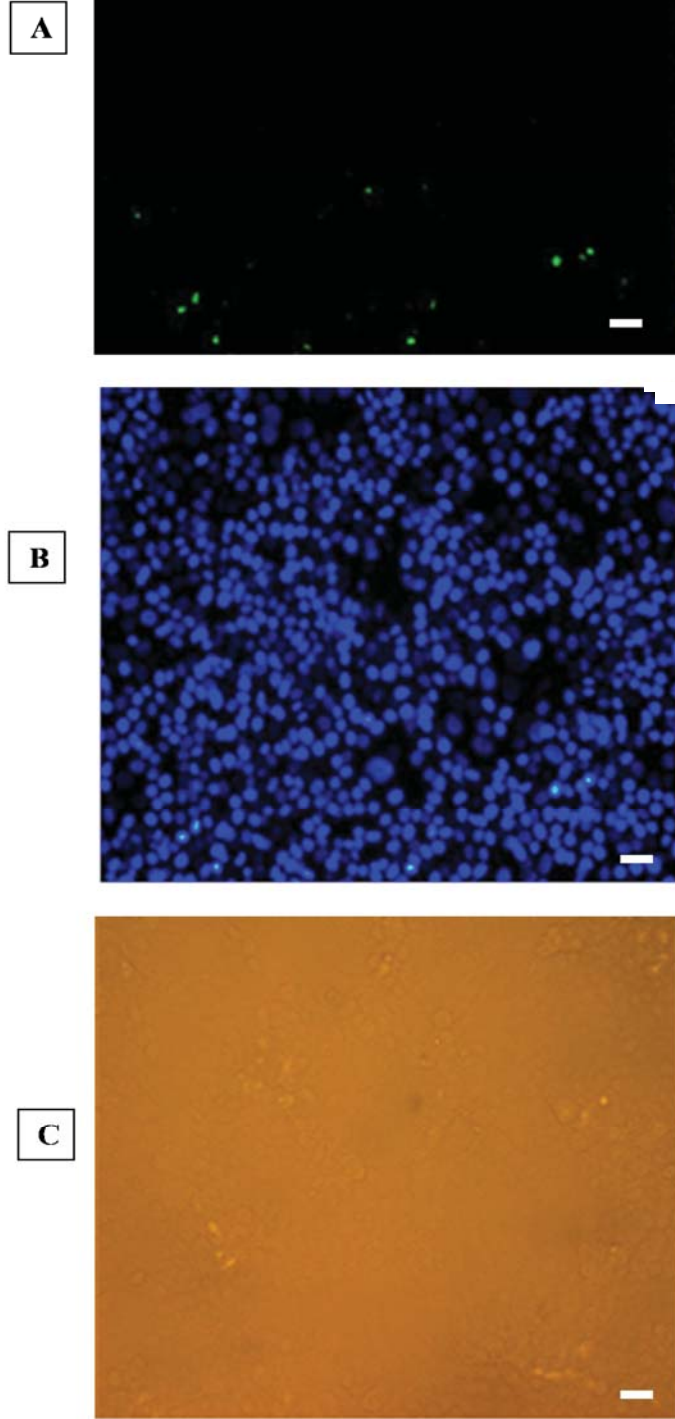
Literatürlerde belirtildiğı üzere, BikDD geninin meme kanseri hücrelerindeki apoptotik etkinliğı düşük olduğundan dolayı genellikle çeşitli kombine tedaviler ile etkinliğinin artırılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. Bunun öncelikli nedeninin bazı kanser hücrelerinde BikDD'ye karşı direnç gelişimi ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Araştırmacılar, özellikle üçlü negatif meme kanseri modelinde çeşitli mekanizmalar ile BikDD geninin hücredeki stabilitesinin engellenerek yıkıma uğraması ve hücrelerin bu gene karşı direnç geliştirmesi ile olduğunu ortaya koymuştur [32, 242]. Tez çalışmamız kapsamında kullanılan, MDA-MB-468 hücre hattı da bu modele örnektir. Bu nedenle çalışmamızda her iki PPP30 ve PPP60 kompleksin MDA-MB-468 hücrelerini belirli oranlarda transfekte edebilmesine rağmen, apoptoza bağılı düşük ölüm gözlenmesinin nedeni, hücrelere miseller ile BikDD geninin aktarılabildiğini ancak gene karşı hücrelerin direnç geliştirmiş olması ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle çeşitli kombine tedaviler kullanılarak hücrelerdeki BikDD geni etkinliğinin arttırılabileceğı düşünölebilir.

Özetle elde edilen sonuçlar, BikDD kaynaklı apoptotik etkinin hücre tipine göre farklılıklar göstermekle birlikte, PPP60 misel/gen komplekslerinin başarılı bir apoptotik gen tedavisi için etkili ajanlar olduğunu ortaya koymuştur.

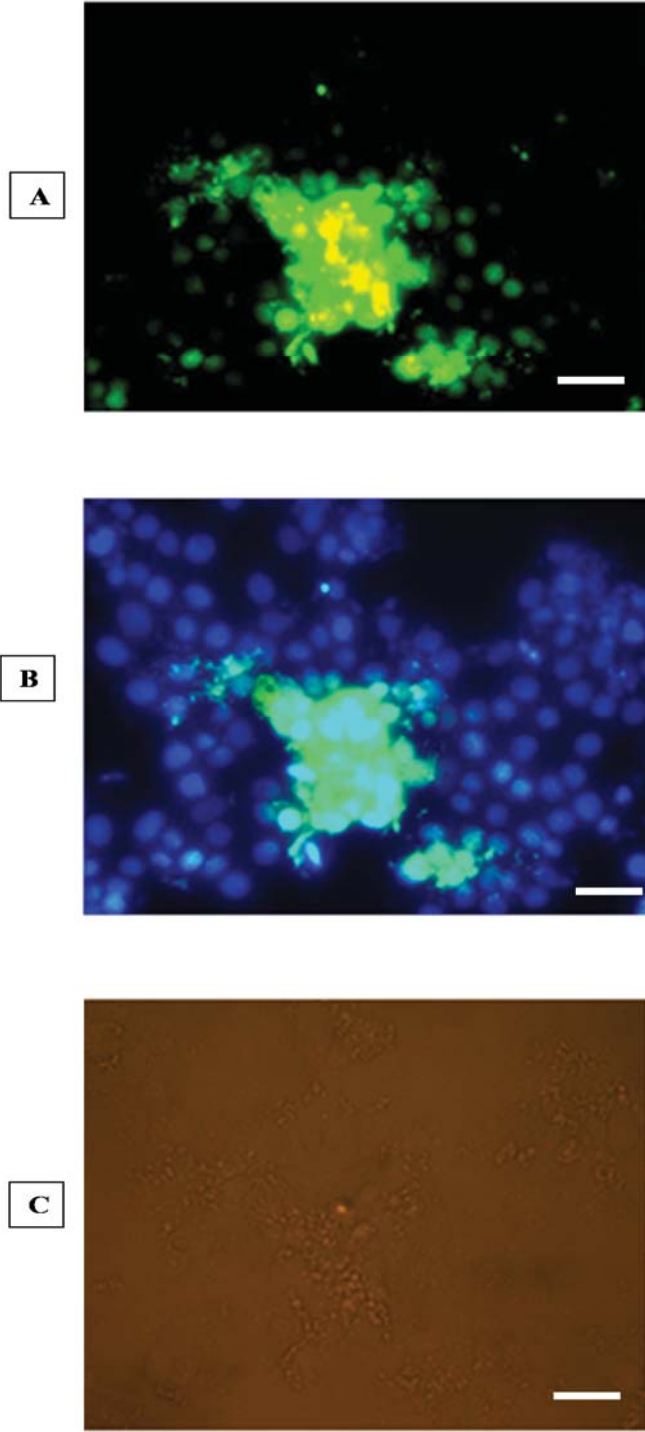
3.4.4. Floresan Mikroskop Yöntemi ile *in vitro* GFP Ekspresyonunun Tayin Edilmesi

In vitro transfeksiyon çalışmaları sonucu en yüksek transfeksiyon etkinliğı PPP60 misel/gen kompleksleri ile N/P 20 ve N/P 30 oranlarında elde edildiğinden, GFP + hücrelerin ekspresyon analizi bu formölasyonlar ile her iki MCF-7 ve MDA-MB-468 hücre hattında inverted floresan mikroskop ile tayin edilmiştir. Hücreler, kontrol grubu olarak çıplak pEGFP-BikDD geni ve seçilen misel/gen formölasyonları ile 48 saat süre ile inkübe edilmiş ve GFP + hücreler floresan mikroskop altında görüntölenmiştir (Şekil 3.55-Şekil 3.60).

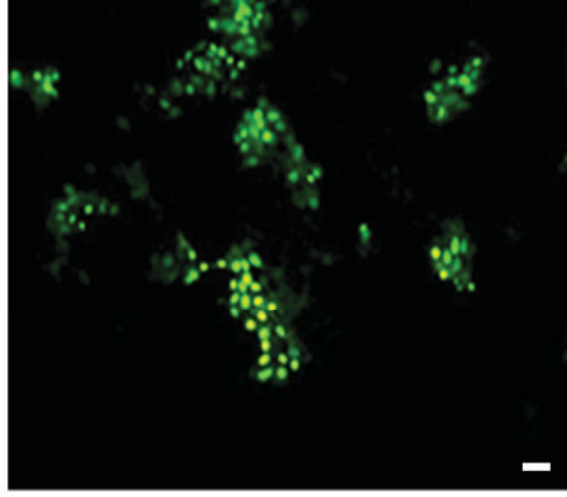
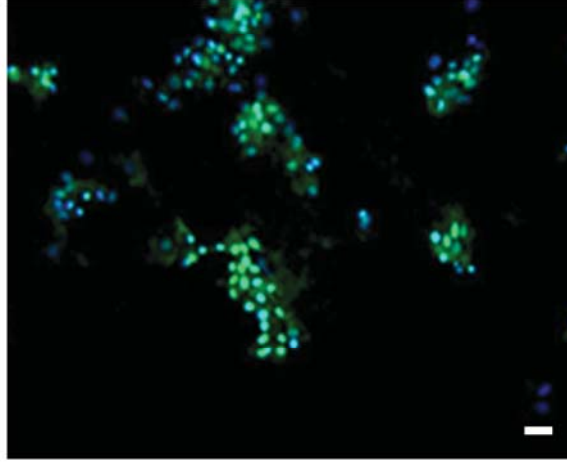
Kontrol grubu olarak çıplak pEGFP-BikDD geni uygulanan her iki hücre hattında da beklendiği üzere GFP ekspresyonu tayin edilmemiştir (Şekil 3.55 ve Şekil 3.58). PPP60 misel/gen komplekslerinin farklı N/P oranları ile muamele edilen MCF-7 hücre hattındaki GFP floresan yoğunluğu sonuçları, N/P 30 oranındaki formülasyonların N/P 20 oranındaki formülasyonlara göre hücrelerde daha güçlü floresan yoğunluğuna neden olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3.56 ve 3.57). Ayrıca, Şekil 3.59 ve 3.60'da verilen MDA-MB-468 hücre hattındaki floresan mikroskop sonuçlarında görüldüğü üzere, benzer şekilde N/P 20 oranındaki kompleksler ile muamele edilen hücrelerde gözlenen floresan yoğunluğu, N/P 30 oranına göre çok daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar N/P 30 oranında hazırlanan formülasyonlar ile inkübe edilen her iki hücre hattında, floresan yoğunluğun yüksek olduğunu göstermiş olup, hücrelerdeki floresan yoğunluğunun misel/gen komplekslerinin N/P oranı ile önemli ölçüde bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. N/P oranında meydana gelen artış hücrelerde GFP ekspresyonuna bağlı floresan yoğunluğunun artmasına neden olmuştur. Elde edilen sonuçlar daha önceki flow sitometre analizi ile elde edilen transfeksiyon etkinliği sonuçlarını doğrulamış olup, MCF-7 hücrelerinin MDA-MB-468 hücrelerine göre transfeksiyon için çok daha uygun bir hücre hattı olduğunu ve blok kopolimerin PEI içeriğinin başarılı bir gen transfeksiyonu için önemli bir parametre olduğunu ortaya koymuştur.



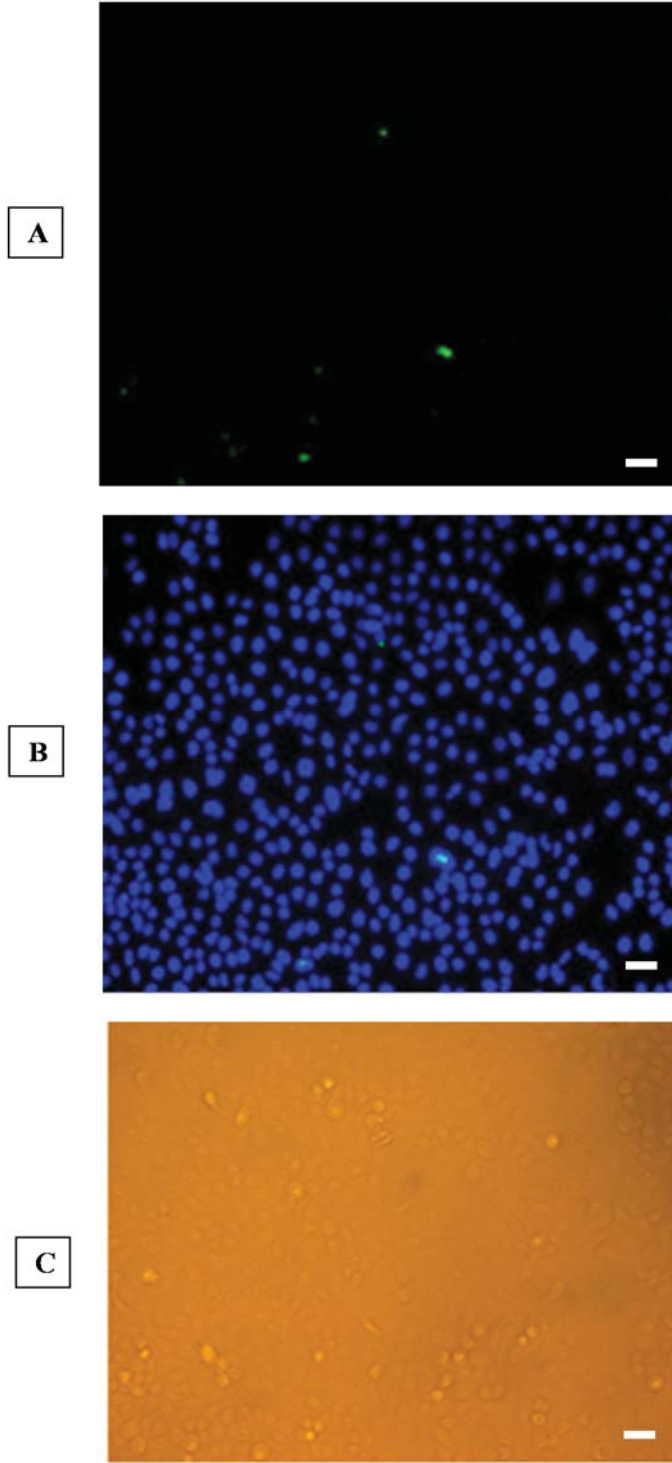
Şekil 3. 55. Çıplak pEGFP-BikDD geni ile muamele edilen MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MCF-7 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü (Ölçek çubuğu 50 μm 'dir).



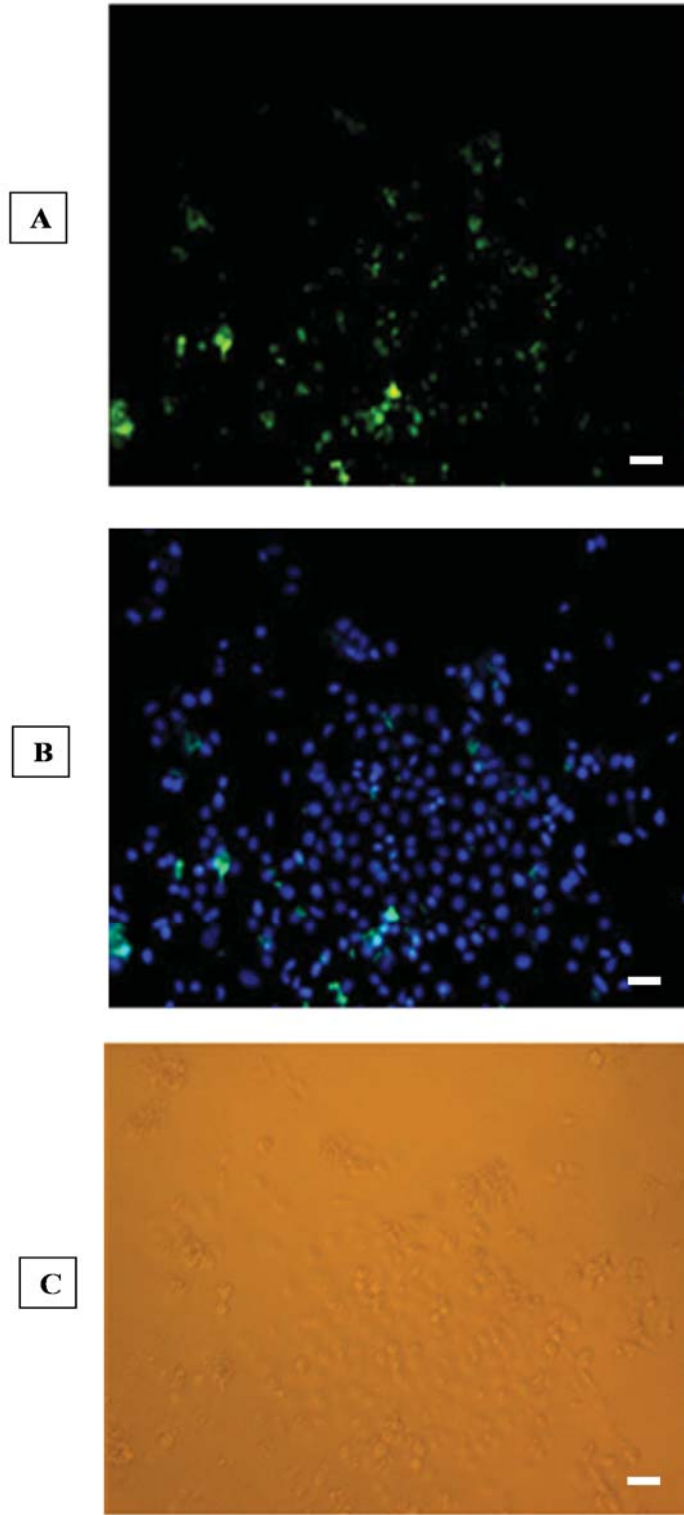
Şekil 3. 56. N/P 20 oranında hazırlanan PPP60 misel/BikDD komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MCF-7 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü (Ölçek çubuğu 50 μm 'dir).

A**B****C**

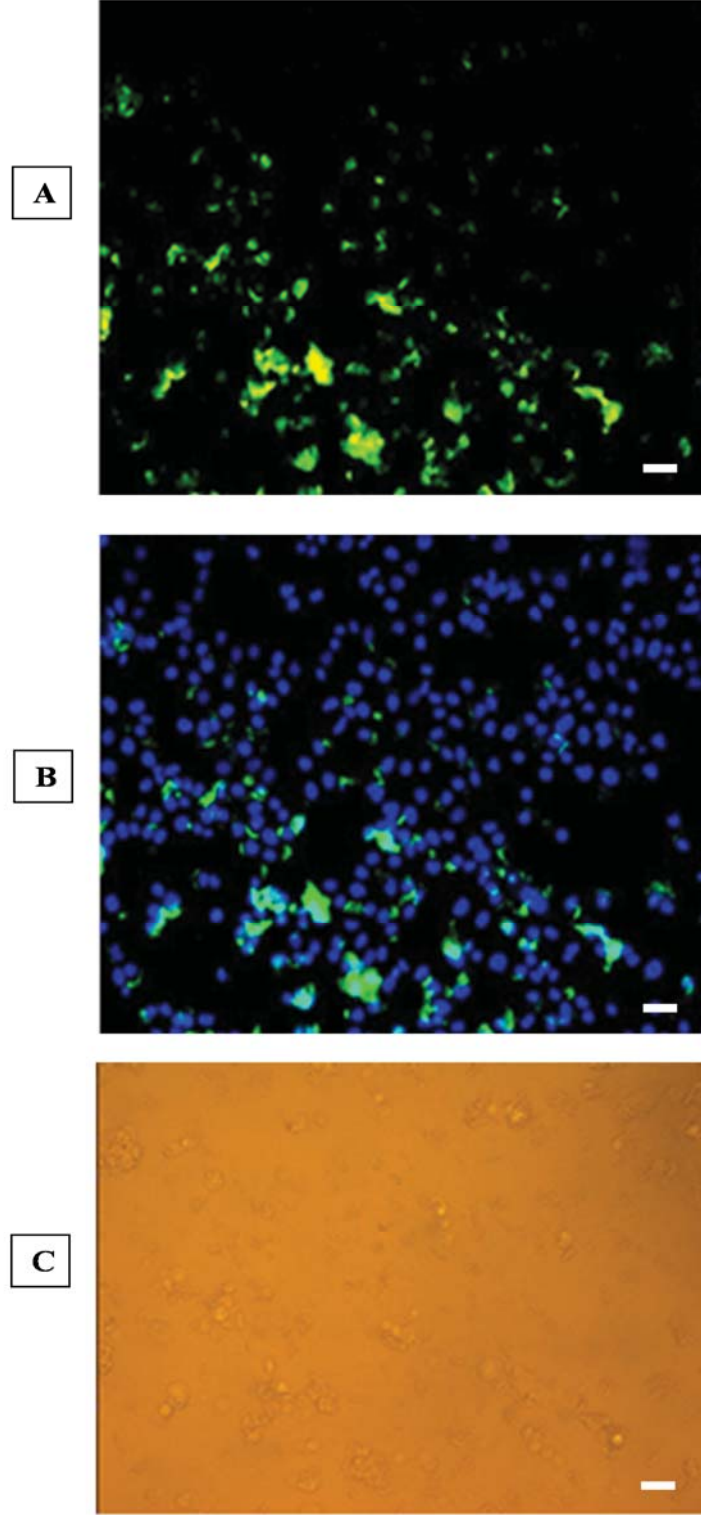
Şekil 3. 57. N/P 30 oranında hazırlanan PPP60 misel/BikDD komplekslerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MCF-7 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü (Ölçek çubuğu 50 μm 'dir).



Şekil 3. 58. Çıplak pEGFP-BikDD geni ile muamele edilen MDA-MB-468 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MDA-MB-468 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü (Ölçek çubuğu 50 μm 'dir).

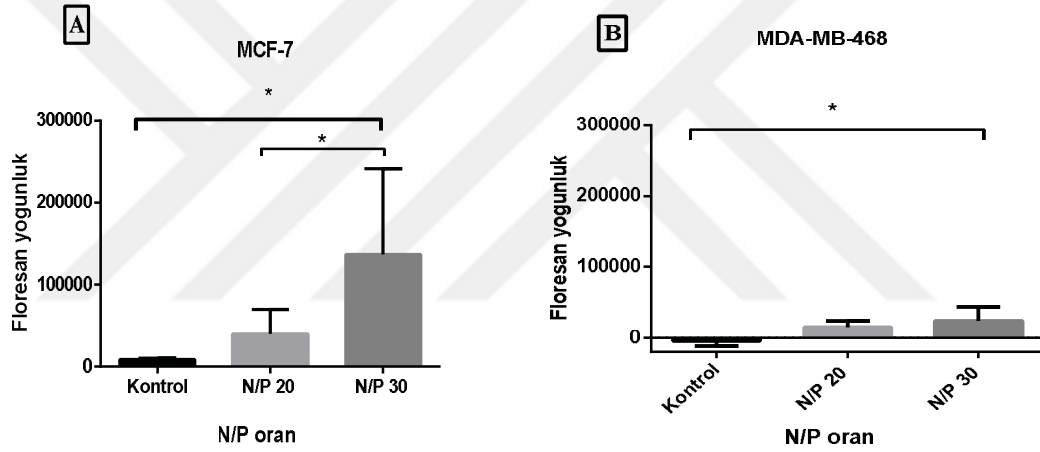


Şekil 3. 59. N/P 20 oranında hazırlanan PPP60 misel/BikDD komplekslerinin MDA-MB-468 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MDA-MB-468 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü (Ölçek çubuğu 50 μm 'dir).



Şekil 3. 60. N/P 30 oranında hazırlanan PPP60 misel/BikDD komplekslerinin MDA-MB-468 hücrelerinde 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen floresan mikroskop görüntüleri A. GFP eksprese eden hücreler (yeşil renkli), B. DAPI ile çekirdekleri boyanmış hücreler ile GFP eksprese eden hücrelerin birleştirilmiş hali C. MDA-MB-468 hücre hattı ışık mikroskobu görüntüsü (Ölçek çubuğu 50 μm 'dir).

Ayrıca floresan mikroskop ile elde edilen sonuçlar, her iki hücre hattındaki floresan yoğunluklarının Image J programı (NIH, ABD) ile kantitatif verilere dönüştürülmesi ile desteklenmiştir (Şekil 3.61). MCF-7 hücrelerinde çıplak pEGFP-BikDD geni ile aktarım sonrası floresan ışıma gözlenmemekle birlikte, N/P 30 oranındaki PPP60 misel/gen kompleksleri, kontrol (çıplak pEGFP-BikDD) ve N/P 20 oranına göre hücrelerde yüksek floresan yoğunluğu göstermiştir. Tek yönlü ANOVA analizine göre N/P 30 oranına ait kompleksler, kontrol grubu ve N/P 20 oranına göre, istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur (Şekil 3.61a). MDA-MB-468 hücrelerinde N/P 30 oranı ile transfeksiyon sonrası elde edilen floresan yoğunluğu MCF-7 hücrelerine göre düşük bulunmuştur. Kontrol pEGFP-BikDD geni uygulanan hücrelerde floresan yoğunluğu neredeyse gözlenmemekle birlikte, N/P 30 oranı ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) tayin edilmiştir (Şekil 3.61b).



Şekil 3. 61. N/P 20 ve 30 oranındaki PPP60 misel/gen komplekslerinin transfeksiyonuna ait GFP ekspresyon floresan yoğunluğunun kantitatif analizi a) MCF-7 hücreleri b) MDA-MB-468 hücreleri (Veriler ortalama $\pm$ S.D ve istatistiksel fark tek yönlü ANOVA analizi ile hesaplanmıştır ($p<0.05$)).

Çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen tüm analizler, terapötik genin başarılı aktarımı için PEtOx'un PEI'ye kısmi hidrolizinin ve elde edilen hidroliz derecesinin önemini ortaya koymuştur. Bu bulgular ışığında tez çalışmamız kapsamında geliştirilen PPP60 misellerin, terapötik bir gen ile etkili misel/gen kompleksleri oluşturarak *in vitro*'da ve potansiyel olarak *in vivo* çalışmalarda kullanım için uygun umut verici gen aktarım ajanları olabileceği öngörülmüştür.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların amacı, son 20 yılda biyo uyumlu, düşük immünojenite ve yüksek fonksiyonel özellikte ve suda çözünür bir polimer olarak PEG'e alternatif olarak sunulan Poli 2-etil-2-oksazolin polimerin kısmi hidrolizi ile iki farklı hidroliz derecesinde sentezlenen PEtOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimerler ile pasif hedeflenebilme yeteneği kazandırılmış nanoboyutlu, ideal özellikte yeni bir polimerik misel tabanlı gen taşıyıcı sistemler hazırlamak ve bu miseller sistemlerin apoptotik bir gen olan BikDD genini yüksek stabilite ile meme kanseri hücrelerine aktarımı sonucu gen tedavisindeki başarısını değerlendirmektir. Çalışma kapsamında katyonik PEI'nin bilinen yüksek sitotoksitesinin, PEtOx'un kısmi hidrolizi ile iki farklı hidroliz yüzdesinde (%30 ve %60) PEI içeren PEtOx-ko-PEI-b-PCL blok kopolimerlerden hazırlanan miseller ile azaltılması ve terapötik genin etkinliğinin artırılması da hedeflerimiz arasındadır. Kapsamı bu doğrultuda belirlenen tez çalışması sonucunda elde edilen sonuçlar ve öneriler şu şekilde özetlenebilir;

—Misellere yüklenecek BikDD genini taşıyan pEGFP-BikDD plazmitleri başarılı bir şekilde çoğaltılarak, yüksek saflık ve konsantrasyonda elde edilmiştir.

—Misel formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılacak olan PEtOx₍₁₀₇₀₀₎₍₁₁₃₀₀₎-b-PCL₂₁₀₀ blok kopolimeri sentezlenip saflaştırılarak, ¹H-NMR, FT-IR ve GPC karakterizasyonları yapılmıştır. Karakterizasyon sonucu ideal özellikte olduğu belirlenen bu blok kopolimerler ile ince film hidratasyon yöntemi ile boş miseller hazırlanarak gerekli karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

—İnce film hidratasyon yöntemi, ideal partikül büyüklüğü ve dağılımları açısından misellerin hazırlanmasında etkili bir yöntem olarak seçilmiştir.

—İdeal özelliklerde miseller oluşturabildiği belirlenen PEtOx₍₁₀₇₀₀₎₍₁₁₃₀₀₎-b-PCL₂₁₀₀ blok kopolimerin kısmi asit hidrolizi ile iki farklı hidroliz derecesinde %30 ve %60 PEI içeren PEtOx₇₅₀₀-ko-PEI_{(%30)1400}-b-PCL₂₁₀₀(PPP30) ve PEtOx₄₃₀₀-ko-PEI_{(%60)2800}-b-PCL₂₁₀₀(PPP60) blok kopolimerleri sentezlenmiştir. Bunun için, PEtOx-ko-PEI ve PCL blokları ayrı ayrı canlı katyonik halka açılım polimerizasyonu ile başarılı bir şekilde sentezlenerek, azid-alkin klik kimyası (CuAAC) reaksiyonu ile birbirlerine konjuge edilmiştir.

—Hidroliz ve konjugasyon reaksiyonları, ¹H-NMR, FT-IR ve GPC karakterizasyonları ile doğrulanmış ve literatüre yeni bir blok kopolimer ile birlikte yeni bir yöntem kazandırılmıştır.

—PPP30 ve PPP60 amfifilik blok kopolimerlerin misel oluşturma yetenekleri kritik misel konsantrasyonu (KMK) tayininde kullanılan piren yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, her iki blok kopolimerin düşük konsantrasyonlarda suda kendiliğinden düzenlenerek misel yapılarını oluşturabildiğini ve elde edilen düşük KMK değerleri ile dolaşımda seyrilmeye karşı son derece dayanıklı kalabileceklerini ortaya koymuştur.

—Ayrıca, PPP30 ve PPP60 blok kopolimerlerin misel oluşturma yetenekleri ¹H-NMR yöntemi ile analiz edilmiş ve sonuçlar piren yöntemini doğrulamıştır.

—PPP30 ve PPP60 blok kopolimerleri kullanılarak ince film hidrasyon yöntemi ile boş miseller hazırlanmış, partikül büyüklükleri, zeta potansiyel değerleri ve polidispersite indeks analizleri yapılmıştır. Artan hidroliz derecesine bağlı olarak polimer omurgasındaki PEI bloğunun artışı boş misellerin partikül boyutunun artmasına ve pozitif yük ile yüklenerek zeta potansiyelinin artmasına neden olmuştur. Her iki hidroliz derecesindeki misel formülasyonları oldukça dar bir aralıkta dağılım (PDI) sergilemiştir.

—Pozitif yüklü PPP30 ve PPP60 boş miseller ile negatif yüklü DNA'nın elektrostatik etkileşimi ile farklı N/P oranlarında misel/DNA (pEGFP-C3 ve pEGFP-BikDD) kompleksleri hazırlanmış, partikül büyüklükleri, zeta potansiyel değerleri ve polidispersite indeks analizleri yapılmıştır. Tüm komplekslerin partikül boyutu 200 nm'nin altında elde edilmiş olup, misellerin *in vivo* çalışmalar için EPR etkisi ile pasif hedeflenmeye uygun olduğu gözlenmiştir. Yapıya terapötik genin eklenmesi komplekslerin homojen dağılımlarını etkilememiştir. Böylece boş misellere yüklenen genlerin formülasyon yapısında herhangi bir agregasyona yol açmadığı ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar, daha yüksek katyonik yükü ile PPP60 misellerin PPP30 misellere göre terapötik BikDD genini, artan N/P oranına bağlı olarak daha sıkı paketleyebileceğini ve negatif yükteki hücre membranları ile etkileşimlerinin daha yüksek olabileceğini ortaya koymuştur.

—PPP30 ve PPP60 misellerin terapötik BikDD geni ile kompleks oluşturma yetenekleri jel retardasyon analizleri ile değerlendirilmiştir. Her iki formülasyonun belirli N/P oranlarında kompleks oluşturabilme yeteneğine sahip olduğunu ancak yüksek hidroliz derecesinden kaynaklı olarak serbest amin grubu fazla olan PPP60 misellerin daha düşük N/P oranında geni kondanse ettiği tayin edilmiştir.

—Boş ve BikDD gen yüklü misellerin morfolojik karakterizasyonları TEM ile analiz edilmiş ve misellerin küresel formda ve düzgün şekilli olduğu tespit edilmiştir. BikDD gen yüklü misellerin boyut ve morfolojilerinin, gen yüklemesinden kaynaklı olarak

değişmediği ve terapötik genin formülasyonda agregasyona yol açmadığı ortaya konulmuştur.

—PPP 30 ve PPP60 misel/gen kompleksleri ile yapılan serum ve DNAz-I stabilite çalışmalarının sonuçları her iki formülasyonun belirli oranlarda terapötik geni, serum ve DNAz-I uygulamasına karşı stabil tutabildiğini gösterirken, PPP60 misellerin yüksek N/P oranlarında terapötik BikDD genini başarılı bir şekilde nükleaz ve serum degradasyonundan koruyabildiği ortaya konulmuştur. Bulgular, PEtOx'un sterik bariyer oluşturarak ve N/P 30 oranındaki PPP60 kompleks misellerin çevresel etkileşimlerini azaltarak PEG'e karşı alternatif uygun bir polimer olduğu görüşünü doğrulamıştır.

—Hücresel biyouyumluluk çalışmaları, PPP30 ve PPP60 misellerin sağlıklı fibroblast hücrelerinde artan N/P oranlarında dahi %50 canlılık oranının korunduğunu ve formülasyonların hücrelerde sitotoksik değil sitostatik etki oluşturduğunu ortaya koymuştur.

—PPP30 ve PPP60 misel/gen komplekslerinin MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerindeki canlılık analiz sonuçları PPP30 komplekslerinin her iki hücre hattında toksisiteye neden olmadığı, PPP60 misellerin yapısındaki PEI oranının yüksek olmasına bağlı olarak her iki hücre hattında artan N/P oranlarında canlılığı az miktar düşürdüğü gözlenmiştir.

—Yeni bir canlılık boyası (DRAQ-7) kullanımı ile pratik, etkin ve gerçek zamanlı bir canlılık analiz yöntemi tasarlanarak literatüre kazandırılmıştır.

—Transfeksiyon çalışmaları, PPP60 misel/gen komplekslerinin, PPP30 komplekslerine göre artan N/P oranlarında her iki MCF-7 ve MDA-MB-468 hücrelerine serum içeren ortamda dahi BikDD genini yüksek etkinlikle aktarabildiğini ortaya koymuş olup sonuçlar floresan mikroskop analizi ile doğrulanmıştır.

—Gen transfeksiyon etkinliğinin hücre tipi, N/P oranı ve polimer omurgası üzerindeki PEI'nin hidroliz derecesine bağlı olduğu ortaya konulmuştur.

—Apoptoz kaynaklı ölüm sonuçları, PPP60 misel/gen komplekslerinin hücre tipine bağlı olarak apoptotik etki göstermekle birlikte, MCF-7 hücrelerinde BikDD kaynaklı ölümü arttırdığı ortaya konulmuştur. Literatür bulguları, BikDD geninin bu hücrelerdeki apoptotik etkinliğinin viral vektörler ile dahi çok yüksek olmadığını ifade etmekte olup, tez çalışmamız ile elde edilen bu sonuçların literatür ile yüksek uyumlulukta olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışması ile literatürde ilk defa biyouyumlu bir polimer olan PEtOx'un kısmi ile sentezlenen PEI içeren blok kopolimer ile hazırlanan misellerin meme kanserinin terapötik bir gen ile apoptotik gen tedavisi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PPP 60 misellerin terapötik geni yüksek stabilite ile meme kanseri hücrelerine başarılı bir şekilde aktarabilen ideal viral olmayan gen aktarım araçları olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, PEtOx'un *in vitro* ve *in vivo* uygulamalar için gen taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında PEG'e alternatif olabilme potansiyelinin altı çizilmiştir.

İleriye yönelik olarak verilebilecek öneriler arasında,

PPP60 formülasyonunun başarısından dolayı bu misel formülasyonu kullanılarak klinik etkinliği yüksek farklı bir terapötik gen ile gen tedavi çalışmalarının yapılması,

BikDD geninin hücrelerdeki apoptotik etkinliğinin arttırılması için, PPP60 misellerin BikDD geni ile birlikte kombine bir tedavi ajanı ile formülasyonlarının geliştirilmesi

BikDD geninin Bcl-2 proteinini yüksek düzeyde eksprese eden farklı bir kanser hattındaki etkinliğinin değerlendirilmesi

Formülasyonların aktif hedeflendirme ajanları ile gen tedavisindeki başarısının *in vivo* çalışmalar ile değerlendirilmesi

Apoptotik yolların incelenmesi bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] D. Hanahan and R. A. Weinberg, The Hallmarks Of Cancer, *Cell*, 100, 1, 57–70, **2000**.
- [2] T. Wirth and S. Ylä-Herttuala, Gene Therapy Used in Cancer Treatment, *Biomedicines*, 2,2, 149–162, **2014**.
- [3] Geneva: WHO position paper on mammography screening, http://www.who.int/cancer/publications/mammography_screening/en/ (Temmuz, **2018**).
- [4] Cancer Research UK, <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer> (Temmuz, **2018**).
- [5] M. Kalimutho, K. Parsons, D. Mittal, J. A. López, S. Srihari, and K. K. Khanna, Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease, *Trends in Pharmacological Science*, 36, 12, 822–846, **2015**.
- [6] G. Gu, D. Dustin, and S. A. Fuqua, Targeted therapy for breast cancer and molecular mechanisms of resistance to treatment, *Current Opinion in Pharmacology*, 31, 97–103, **2016**.
- [7] World Cancer Research Fund International, <https://www.wcrf.org/> (Temmuz, **2018**).
- [8] Z. Xie and X. Zeng, DNA/RNA-based formulations for treatment of breast cancer, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14, 12, 1379–1393, **2017**.
- [9] W. Gradishar, B. Anderson, R. Balassanian, S. Blair, and H. Burstein, NCCN Guidelines Insights. Breast Cancer, Version 1.2017. Featured Updates to the NCCN Guidelines., *Journal of the National Comprehensive Cancer Work*, 15, 4, 433–451, **2017**.
- [10] H. Shen, V. Mittal, M. Ferrari, and J. Chang, Delivery Of Gene Silencing Agents For Breast Cancer Therapy., *Breast Cancer Research*, 15 VN-r, 3, 205, **2013**.
- [11] M. S. Khalili, P. Dall, and D. Curiel, Gene Therapy For Carcinoma Of The Breast, *Cancer Gene Therapy*, 13, 7, 633–647, **2006**.
- [12] U.S.National Institutes of Health. Clinical Trials.gov, <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (Temmuz, **2018**).
- [13] Gene Therapy Clinical Trials Worldwide Provided by the Journal of Gene Medicine, <http://www.abedia.com/wiley/indications.php> (Temmuz, **2018**).
- [14] M. A. Mintzer and E. E. Simanek, Nonviral Vectors for Gene Delivery, *Chemical Reviews*, 109, 2, 259–302, **2009**.
- [15] J. C. Fernandes, X. Qiu, F. M. Winnik, M. Benderdour, X. Zhang, K. Dai, and Q. Shi, Linear Polyethylenimine Produced By Partial Acid Hydrolysis Of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) For DNA And siRNA Delivery In Vitro, *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4091–4102, **2013**.
- [16] S. Mao, W. Sun, and T. Kissel, Chitosan-Based Formulations For Delivery Of DNA and siRNA, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 1, 12–27, **2010**.
- [17] N. Nayerossadat, P. Ali, and T. Maedeh, Viral And Nonviral Delivery Systems For Gene Delivery, *Advanced Biomedical Research*, 1, 1, 27, **2012**.

- [18] W. F. Anderson, Human Gene Therapy, *Nature*, 392, 6679,25–30, **1998**.
- [19] D. D. Lasic, *Liposomes in Gene Delivery*. CRC Press, **1997**.
- [20] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, and M. R. Abedi, 21. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide To 2017 - an Update, *The Journal of Gene Medicine*, e3015, **2018**.
- [21] C. A. Stein and D. Castanotto, FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017, *Molecular Therapy*, 25, 5, 1069–1075, **2017**.
- [22] Human Gene Therapy, <https://h-genetherapy.weebly.com/types.html> (Temmuz, **2018**).
- [23] K. Rau, C. Day, and M. Hung, Breast Cancer Gene Therapy, *Cancer Gene Therapy*, 34, 705-740, **2003**.
- [24] W. E. Criss, Gene Therapy in Human Breast Cancer, *Middle East*, 32, 283–291, **2002**.
- [25] N. Dias and C. a Stein, Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms, *Molecular Cancer Therapy*, 1, 347–355, **2002**.
- [26] O. Mehmet Saka and A. Bozkir, Formulation And İn Vitro Characterization Of Pegylated Chitosan And Polyethylene İmine Polymers With Thrombospondin-I Gene Bearing pDNA, *Journal of Biomedical Matererials Research Part B Applications Biomaterials*, 100B, 4, 984–992, **2012**.
- [27] P. Nanni, G. Forni, and P. L. Lollini, Cytokine Gene Therapy: Hopes And Pitfalls, *Annals of Oncology Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 10, 3, 261–6, **1999**.
- [28] G. Coşkun and H. Özgür, Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20, 3, 145–158, **2014**.
- [29] R. J. Bold, P. M. Termuhlen, and D. J. McConkey, Apoptosis, Cancer And Cancer Therapy, *Surgical Oncology*, 6, 3, 133–142, **1997**.
- [30] J. Lin, C. Page, X. Jin, A. O. Sethi, R. Patel, and G. Nunez, Suppression Activity Of Pro-Apoptotic Gene Products İn Cancer Cells, A Potential Application For Cancer Gene Therapy, *Anticancer Research*, 21, 2A, 831–9, **2001**.
- [31] J. M. Adams and S. Cory, The Bcl-2 Apoptotic Switch İn Cancer Development And Therapy, *Oncogene*, 26, 9, 1324–1337, **2007**.
- [32] J. M. Adams and S. Cory, Life-or-Death Decisions By The Bcl-2 Protein Family, *Trends in Biochemical Science*, 26, 1, 61–66, **2001**.
- [33] S. Ye, M. Ponz-Sarvise, S. S. Chang, W. C. Chang, C. H. Chen, J. L. Hsu, and M. C. Hung, Proteasome İnhibition Enhances The Killing Effect Of BikDD Gene Therapy, *American Journal of Translational Research*, 7, 2, 319–327, **2015**.
- [34] Y. Zou, H. Peng, B. Zhou, Y. Wen, S. C. Wang, E. M. Tsai, and M. C. Hung, Systemic Tumor Suppression By The Proapoptotic Gene Bik, *Cancer Research*, 62, 1, 8–12, **2002**.
- [35] Y. M. Li, Y. Wen, B. P. Zhou, H. Kuo, Q. Ding, and M. Hung, Enhancement of Bik Antitumor Effect by Bik Mutants Advances in Brief Enhancement of Bik Antitumor Effect by Bik Mutants, *Cancer Research*, 63, 22, 7630–7633, **2003**.

- [36] J. Lang, J. L. Hsu, F. Meric-bernstam, C. Chang, Y. Bao, H. Yamaguchi, X. Xie, W. A. Woodward, D. Yu, G. N. Hortobagyi, and M. Hung, BikDD eliminates Breast Cancer Initiating Cells And Synergizes with Lapatinib For Breast Cancer Treatment, *Cancer Cell*, 20, 3, 341–356, **2012**.
- [37] Q. Ding, X. He, W. Xia, J. M. Hsu, C. Te Chen, L. Y. Li, D. F. Lee, J. Y. Yang, X. Xie, J. C. Liu, and M. C. Hung, Myeloid Cell Leukemia-1 Inversely Correlates With Glycogen Synthase Kinase-3 β Activity And Associates With Poor Prognosis In Human Breast Cancer, *Cancer Research*, 67, 10, 4564–4571, **2007**.
- [38] X. Xie, L. Li, X. Xiao, J. Guo, Y. Kong, M. Wu, W. Liu, G. Gao, J. L. Hsu, W. Wei, M.-C. Hung, and X. Xie, Targeted Expression of BikDD Eliminates Breast Cancer with Virtually No Toxicity in Noninvasive Imaging Models, *Molecular Cancer Therapy*, 11, 9, 1915–1924, **2012**.
- [39] Y.-P. Sher, T.-F. Tzeng, S. F. Kan, J. Hsu, X. Xie, Z. Han, W.-C. Lin, L. Y. Li, and M.-C. Hung, Cancer Targeted Gene Therapy Of BikDD Inhibits Orthotopic Lung Cancer Growth And Improves Long-Term Survival, *Oncogene*, 28, 37, 3286–3295, **2009**.
- [40] Y.-P. Sher, S.-J. Liu, C.-M. Chang, S.-P. Lien, C.-H. Chen, Z. Han, L.-Y. Li, J.-S. Chen, C.-W. Wu, and M.-C. Hung, Cancer-Targeted BikDD Gene Therapy Elicits Protective Antitumor Immunity Against Lung Cancer, *Molecular Cancer Therapy*, 10, 4, 637–647, **2011**.
- [41] L.-Y. Li, H.-Y. Dai, F.-L. Yeh, S.-F. Kan, J. Lang, J. L. Hsu, L.-B. Jeng, Y.-H. Chen, Y.-P. Sher, W.-C. Lin, and M.-C. Hung, Targeted Hepatocellular Carcinoma Proapoptotic BikDD Gene Therapy, *Oncogene*, 30, 15, 1773–83, **2011**.
- [42] X. Xie, Y. Kong, H. Tang, L. Yang, J. L. Hsu, and M.-C. Hung, Targeted BikDD Expression Kills Androgen-Dependent and Castration-Resistant Prostate Cancer Cells, *Molecular Cancer Therapy*, 13, 7, 1813–1825, **2014**.
- [43] H. B. Xing, H. M. Pan, Y. Fang, X. Y. Zhou, Q. Pan, and D. Li, Construction Of A Tumor Cell-Targeting Non-Viral Gene Delivery Vector With Polyethylenimine Modified With RGD Sequence-Containing Peptide, *Oncology Letters*, 7, 2, 487–492, **2014**.
- [44] T. F. Kresina, Ed., *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., **2000**.
- [45] I. M. Verma and N. Somia, Gene Therapy - Promises, Problems And Prospects, *Nature*, 389, 6648, 239–242, **1997**.
- [46] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, and P. S. Stayton, Design And Development Of Polymers For Gene Delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 7, 581–593, **2005**.
- [47] S. Y. Wong, J. M. Pelet, and D. Putnam, Polymer Systems For Gene Delivery- Past, Present, And Future, *Progress in Polymer Science*, 32, 8–9, 799–837, **2007**.
- [48] X. Gao, K.-S. Kim, and D. Liu, Nonviral Gene Delivery: What We Know And What is Next, *AAPS Journals*, 9, 1, E92–E104, **2007**.
- [49] T. G. Park, J. H. Jeong, and S. W. Kim, Current Status Of Polymeric Gene

- Delivery Systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 4, 467–486, **2006**.
- [50] J. H. Jeong, S. H. Song, D. W. Lim, H. Lee, and T. G. Park, DNA Transfection Using Linear Poly (Ethylenimine) Prepared By Controlled Acid Hydrolysis Of Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline), *Journal of Controlled Release*, 73, 391–399, **2001**.
- [51] J. Panyam and V. Labhasetwar, Biodegradable Nanoparticles For Drug And Gene Delivery To Cells And Tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 3, 329–347, **2003**.
- [52] L. F. Gottfried and D. a Dean, Extracellular And Intracellular Barriers To Non-Viral Gene Transfer, *Novel Gene Therapy Approaches*, 75–88, **2013**.
- [53] H. G. Addelhady, S. Allen, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, and P. M. Williams, Direct Real-Time Molecular Scale Visualisation Of The Degradation Of Condensed DNA Complexes Exposed To Dnase 1, *Nucleic Acids Researches*, 31, 14, 4001–4005, **2003**.
- [54] C. M. Wiethoff and C. R. Middaugh, Barriers to Nonviral Gene Delivery, *Journal of Pharmaceutical Science*, 92, 2, 203–217, **2003**.
- [55] M. Kurs, G. F. Walker, V. Roessler, M. Ogris, W. Roedel, R. Kircheis, and E. Wagner, Novel Shielded Transferrin–Polyethylene Glycol–Polyethylenimine/DNA Complexes for Systemic Tumor-Targeted Gene Transfer, *Bioconjugate Chemistry*, 14, 1, 222–231, **2003**.
- [56] K. Hong, W. Zheng, A. Baker, and D. Papahadjopoulos, Stabilization Of Cationic Liposome-Plasmid DNA Complexes By Polyamines And Poly(Ethylene Glycol)-Phospholipid Conjugates For Efficient in Vivo Gene Delivery, *FEBS Letters*, 400, 2, 233–237, **1997**.
- [57] M. E. Davis, Non-Viral Gene Delivery Systems, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 2, 128–131, **2002**.
- [58] S. D. Conner and S. L. Schmid, Regulated Portals Of Entry Into The Cell, *Nature*, 422, 37–43, **2003**.
- [59] J. Winkler, Nanomedicines Based On Recombinant Fusion Proteins For Targeting Therapeutic siRNA Oligonucleotides, *Therapeutic Delivery*, 2, 7, 891–905, **2011**.
- [60] M. Morille, C. Passirani, A. Vonarbourg, A. Clavreul, and J. P. Benoit, Progress in Developing Cationic Vectors For Non-Viral Systemic Gene Therapy Against Cancer, *Biomaterials*, 29, 24–25, 3477–3496, **2008**.
- [61] D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O’Brodvich, and G. L. Lukacs, Metabolic Instability Of Plasmid DNA In The Cytosol: A Potential Barrier To Gene Transfer, *Gene Therapy*, 6, 4, 482–497, **1999**.
- [62] D. Luo and W. M. Saltzman, Synthetic DNA Delivery Systems, *Nature Biotechnology*, 18, 1, 33–37, **2000**.
- [63] D. J. Glover, D. L. Leyton, G. W. Moseley, and D. A. Jans, The Efficiency Of Nuclear Plasmid DNA Delivery Is A Critical Determinant Of Transgene Expression At The Single Cell Level, *The Journal of Gene Medicine*, 12, 1, 77–85, **2010**.
- [64] D. Gorlich and I. . Mattaj, Nucleocytoplasmic Transport, *Science*, 271, 5255,

1513–1518, **1996**.

- [65] C. W. Pouton, Nuclear Import Of Polypeptides, Polynucleotides And Supramolecular Complexes, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 1, 51–64, **1998**.
- [66] N. Pante, Nuclear Pore Complex Is Able to Transport Macromolecules with Diameters of 39 nm, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 2, 425–434, **2002**.
- [67] M. S. Al-Dosari and X. Gao, Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress, *AAPS Journals*, 11, 4, 671–681, **2009**.
- [68] O. J. Müller, H. A. Katus, and R. Bekeredjian, Targeting The Heart With Gene Therapy-Optimized Gene Delivery Methods, *Cardiovascular Research*, 73, 3, 453–462, **2007**.
- [69] S. B. Manjila, J. N. Baby, E. N. Bijin, I. Constantine, K. Pramod, and J. Valsalakumari, Novel Gene Delivery Systems, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 3, 1, 1–7, **2013**.
- [70] S. M. Dizaj, S. Jafari, and A. Y. Khosroushahi, A Sight On The Current Nanoparticle-Based Gene Delivery Vectors, *Nanoscale Research Letters*, 9, 1, 1–9, **2014**.
- [71] C. E. Thomas, A. Ehrhardt, and M. A. Kay, Progress And Problems With The Use Of Viral Vectors For Gene Therapy, *Nature Reviews Genetics*, 4, 5, 346–358, **2003**.
- [72] M. Ramamoorth and A. Narvekar, Non Viral Vectors In Gene Therapy - An Overview, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9, 1, GE01-GE06, **2015**.
- [73] S. Mali, Delivery Systems For Gene Therapy, *Indian Journal of Human Genetics*, 19, 1, 3–8, **2013**.
- [74] I. Ullah, K. Muhammad, M. Akpanyung, A. Nejari, A. L. Neve, J. Guo, Y. Feng, and C. Shi, Bio-reducible, Hydrolytically Degradable And Targeting Polymers For Gene Delivery, *Journal of Materials Chemistry B*, 5, 18, 3253–3276, **2017**.
- [75] M. Yousefpour Marzbali and A. Yari Khosroushahi, Polymeric Micelles As Mighty Nanocarriers For Cancer Gene Therapy: A Review, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 79, 4, 637–649, **2017**.
- [76] E. Cevher, A. Demir, and E. Sefik, Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy, *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, InTech, **2012**.
- [77] Y. Taniyama, K. Tachibana, K. Hiraoka, M. Aoki, S. Yamamoto, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ogihara, Y. Kaneda, and R. Morishita, Development Of Safe And Efficient Novel Nonviral Gene Transfer Using Ultrasound: Enhancement Of Transfection Efficiency Of Naked Plasmid DNA In Skeletal Muscle, *Gene Therapy*, 9, 6, 372–380, **2002**.
- [78] W. Wang, W. Li, N. Ma, and G. Steinhoff, Non-viral gene delivery methods, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14, 1, 46–60, **2013**.
- [79] V. P. Torchilin, Multifunctional nanocarriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1532–1555, **2006**.

- [80] A. M. Jhaveri and V. P. Torchilin, Multifunctional Polymeric Micelles For Delivery Of Drugs And siRNA, *Frontiers Pharmacology*, 5, 2, 123–131, **2014**.
- [81] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, Nanocarriers As An Emerging Platform For Cancer Therapy, *Nature Nanotechnology*, 2, 12, 751–760, **2007**.
- [82] J. Zhang, X. Li, L. Lou, Y. Jia, Z. Jin, and Y. Zhu, Non-viral Gene Therapy. In Intracellular Delivery: Fundamentals and Applications, 5, A. Prokop, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 599–699, **2011**.
- [83] M. Thomas and A. M. Klibanov, Non-viral gene therapy: Polycation-Mediated DNA Delivery, *Applied Microbiology And Biotechnology*, 62, 1, 27–34, **2003**.
- [84] X. Sun and N. Zhang, Cationic Polymer Optimization for Efficient Gene Delivery, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10, 2, 108–125, **2010**.
- [85] S. Zhang, B. Zhao, H. Jiang, B. Wang, and B. Ma, Cationic Lipids And Polymers Mediated Vectors For Delivery of siRNA, *Journal of Controlled Release*, 123, 1, 1–10, **2007**.
- [86] C. Mattu, G. Brachi, and G. Ciardelli, *Smart Polymeric Nanoparticles*. Elsevier, **2018**.
- [87] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr, A Versatile Vector For Gene And Oligonucleotide Transfer Into Cells In Culture And in vivo: Polyethylenimine, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 16, 7297–7301, **1995**.
- [88] R. Shah, Z. Kronekova, A. Zahoranová, L. Roller, N. Saha, P. Saha, and J. Kronek, In Vitro Study Of Partially Hydrolyzed Poly(2-Ethyl-2-Oxazolines) As Materials For Biomedical Applications, *Journal of Material Science Materials in Medicine*, 26, 4, **2015**.
- [89] A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, and R. Langer, Exploring Polyethylenimine-Mediated DNA Transfection And The Proton Sponge Hypothesis, *Journal of Gene Medicine*, 7, 5, 657–663, **2005**.
- [90] H. Hosseinkhani, F. Abedini, K. L. Ou, and A. J. Domb, Polymers In Gene Therapy Technology, *Polymers for Advanced Technologies*, 26, 2, 198–211, **2015**.
- [91] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, and J. Yan, Toxicity Of Cationic Lipids And Cationic Polymers in Gene Delivery, *Journal of Controlled Release*, 114, 1, 100–109, **2006**.
- [92] M. Ogris, S. Brunner, S. Schüller, R. Kircheis, and E. Wagner, Pegylated DNA/Transferrin-PEI Complexes: Reduced Interaction With Blood Components, Extended Circulation in Blood And Potential For Systemic Gene Delivery, *Gene Therapy*, 6, 4, 595–605, **1999**.
- [93] C.-P. Lin, C. Sung, and H. Hsiue, Non-viral pH-sensitive Gene Carriers based on Poly((2-ethyl-2-oxazoline)-co-ethylenimine)-block-Poly(2-ethyl-2-oxazoline): A Study of Gene Release Behavior, *Journal of Medical and Biological Engineering*, 32, 5, 365–372, **2012**.
- [94] H. P. C. Van Kuringen, V. R. De La Rosa, M. W. M. Fijten, J. P. A. Heuts, and R. Hoogenboom, Enhanced Selectivity For The Hydrolysis Of Block Copoly(2-

- Oxazoline)s in Ethanol-Water Resulting in Linear Poly(Ethylene Imine) Copolymers, *Macromolecular Rapid Communications*, 33, 9, 827–832, **2012**.
- [95] C. Englert, L. Tauhardt, M. Hartlieb, K. Kempe, M. Gottschaldt, and U. S. Schubert, Linear Poly(ethylene imine)-Based Hydrogels for Effective Binding and Release of DNA, *Biomacromolecules*, 15, 4, 1124–1131, **2014**.
- [96] E. Blanco, C. W. Kessinger, B. D. Sumer, and J. Gao, Multifunctional Micellar Nanomedicine for Cancer Therapy, *Experimental Biology and Medicine*, 234, 2, 123–131, **2009**.
- [97] L. Zhang, S. Wang, M. Zhang, and J. Sun, Nanocarriers For Oral Drug Delivery, *Journal of Drug Targeting*, 21, 6, 515–527, **2013**.
- [98] L. Gros, H. Ringsdorf, and H. Schupp, Polymeric Antitumor Agents on a Molecular and on a Cellular Level?, *Angewandte Chemie International edition*, 20, 4, 305–325, **1981**.
- [99] S. C. Kim, D. W. Kim, Y. H. Shim, J. S. Bang, H. S. Oh, S. W. Kim, and M. H. Seo, In vivo Evaluation Of Polymeric Micellar Paclitaxel Formulation: Toxicity And Efficacy, *Journal of Controlled Release*, 72, 1–3, 191–202, **2001**.
- [100] X. Zhao, Z. Poon, A. C. Engler, D. K. Bonner, and P. T. Hammond, Enhanced Stability of Polymeric Micelles Based on Postfunctionalized Poly(ethylene glycol)- b -poly(γ -propargyl l -glutamate): The Substituent Effect, *Biomacromolecules*, 13, 5, 1315–1322, **2012**.
- [101] A. Gothwal, I. Khan, and U. Gupta, Polymeric Micelles: Recent Advancements in the Delivery of Anticancer Drugs, *Pharmaceutical Researches*, 33, 1, 18–39, **2016**.
- [102] C. Tan, Y. Wang, and W. Fan, Exploring Polymeric Micelles For Improved Delivery Of Anticancer Agents: Recent Developments in Preclinical Studies, *Pharmaceutics*, 5, 1, 201–219, **2013**.
- [103] E. V. Batrakova, T. K. Bronich, J. A. Vetro, and A. V. Kabanov, Polymer Micelles as Drug Carriers, *Nanoparticulates as Drug Carriers*, Imperial College Press, 57–93, **2006**.
- [104] S. C. Owen, D. P. Y. Chan, and M. S. Shoichet, Polymeric Micelle Stability, *Nano Today*, 7, 1, 53–65, **2012**.
- [105] V. P. Torchilin, Structure And Design Of Polymeric Surfactant-Based Drug Delivery Systems, *Journal of Controlled Release*, 73, 2–3, 137–172, **2001**.
- [106] E. V. Batrakova and A. V. Kabanov, Pluronic Block Copolymers: Evolution Of Drug Delivery Concept From Inert Nanocarriers To Biological Response Modifiers, *Journal of Controlled Release*, 130, 2, 98–106, **2008**.
- [107] S. Biswas, S. Vaze, Onkar, S. Movassaghian, and V. P. Torchilin, Polymeric Micelles for the Delivery of Poorly Soluble Drugs, *Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs*, Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltd, 411–477, **2013**.
- [108] Y. Lu and K. Park, Polymeric Micelles And Alternative Nanonized Delivery Vehicles For Poorly Soluble Drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 453, 1, 198–214, **2013**.
- [109] X. Yang, J. J. Grailer, S. Pilla, D. A. Steeber, and S. Gong, Tumor-Targeting,

- pH-Responsive, and Stable Unimolecular Micelles as Drug Nanocarriers for Targeted Cancer Therapy, *Bioconjugate Chemistry*, 21, 3, 496–504, **2010**.
- [110] M. Yokoyama, Polymeric Micelles As Drug Carriers: Their Lights And Shadows, *Journal of Drug Targeting*, 22, 7, 576–583, **2014**.
- [111] M. Nakayama, J. Akimoto, and T. Okano, Polymeric Micelles With Stimuli-Triggering Systems For Advanced Cancer Drug Targeting, *Journal of Drug Targeting*, 22, 7, 584–599, **2014**.
- [112] H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, and K. Kataoka, Accumulation Of Sub-100 Nm Polymeric Micelles In Poorly Permeable Tumours Depends On Size, *Nature Nanotechnology*, 6, 12, 815–823, **2011**.
- [113] V. P. Torchilin, PEG-Based Micelles As Carriers Of Contrast Agents For Different Imaging Modalities, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 2, 235–252, **2002**.
- [114] N. Nishiyama and K. Kataoka, Current State, Achievements, And Future Prospects Of Polymeric Micelles As Nanocarriers For Drug And Gene Delivery, *Pharmacology Therapeutics*, 112, 3, 630–648, **2006**.
- [115] C. Allen, D. Maysinger, and A. Eisenberg, Nano-Engineering Block Copolymer Aggregates For Drug Delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 16, 1–4, 3–27, **1999**.
- [116] A. V Kabanov, E. V Batrakova, and V. Y. Alakhov, Pluronic Block Copolymers As Novel Polymer Therapeutics For Drug And Gene Delivery, *Journal of Controlled Release*, 82, 2–3, 189–212, **2002**.
- [117] N. Rapoport, Physical Stimuli-Responsive Polymeric Micelles For Anti-Cancer Drug Delivery, *Progress in Polymer Science*, 32, 8–9, 962–990, **2007**.
- [118] A. N. Lukyanov, Z. Gao, L. Mazzola, and V. P. Torchilin, Polyethylene Glycol-Diacyllipid Micelles Demonstrate Increased Accumulation in Subcutaneous Tumors in Mice, *Pharmaceutical Research*, 19, 10, 1424–1429, **2002**.
- [119] N. Rapoport, Stabilization And Activation Of Pluronic Micelles For Tumor-Targeted Drug Delivery, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 16, 1–4, 93–111, **1999**.
- [120] X. Shuai, T. Merdan, A. K. Schaper, F. Xi, and T. Kissel, Core-Cross-Linked Polymeric Micelles as Paclitaxel Carriers, *Bioconjugate Chemistry*, 15, 3, 441–448, **2004**.
- [121] V. K. Mourya, N. Inamdar, R. B. Nawale, and S. S. Kulthe, Polymeric Micelles: General Considerations And Their Applications, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 45, 2, 128–138, **2011**.
- [122] Polyion Complex Micelles: Preparation and Physicochemical Properties (Nanotechnology), <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/polyion-complex-micelles-preparation-and-physicochemical-properties-nanotechnology> (Temmuz, **2018**).
- [123] S. S. Kulthe, Y. M. Choudhari, N. N. Inamdar, and V. Mourya, Polymeric Micelles: Authoritative Aspects For Drug Delivery, *Designed Monomers and Polymers*, 15, 5, 465–521, **2012**.

- [124] Z. L. Yang, X. R. Li, K. W. Yang, and Y. Liu, Amphotericin B-Loaded Poly(Ethylene Glycol)–Poly(Lactide) Micelles: Preparation, Freeze-Drying, and in vitro Release, *Journal of Biomedical Materials and Research Part A*, 85A, 2, 539–546, **2008**.
- [125] Y. Nagasaki, T. Okada, C. Scholz, M. Iijima, M. Kato, and K. Kataoka, The Reactive Polymeric Micelle Based on An Aldehyde-Ended Poly(ethylene glycol)/Poly(lactide) Block Copolymer, *Macromolecules*, 31, 5, 1473–1479, **1998**.
- [126] E. G. Kelley, R. P. Murphy, J. E. Seppala, T. P. Smart, S. D. Hann, M. O. Sullivan, and T. H. Epps, Size Evolution Of Highly Amphiphilic Macromolecular Solution Assemblies Via A Distinct Bimodal Pathway, *Nature Communications*, 5, 3599, **2014**.
- [127] D. Y. Kang, M. J. Kim, S. T. Kim, K. S. Oh, S. H. Yuk, and S. Lee, Size Characterization Of Drug-Loaded Polymeric Core/Shell Nanoparticles Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 8, 2183–2188, **2008**.
- [128] R. K. Jain, Transport Of Molecules Across Tumor Vasculature, *Cancer Metastasis Review*, 6, 4, 559–93, **1987**.
- [129] T. P. Padera, B. R. Stoll, J. B. Tooredman, D. Capen, E. di Tomaso, and R. K. Jain, Pathology: Cancer Cells Compress Intratumour Vessels, *Nature*, 427, 6976, 695–695, **2004**.
- [130] Y. Matsumura, Poly (Amino Acid) Micelle Nanocarriers in Preclinical And Clinical Studies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 8, 899–914, **2008**.
- [131] Y. Matsumura and H. Maeda, A New Concept For Macromolecular Therapeutics In Cancer Chemotherapy: Mechanism Of Tumoritropic Accumulation Of Proteins And The Antitumor Agents Smancs, *Cancer Research*, 46, 12 Pt 1, 6387–6392, **1986**.
- [132] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, Tumor Vascular Permeability And The EPR Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review, *Journal of Controlled Release*, 65, 1–2, 271–84, **2000**.
- [133] V. Torchilin, Tumor Delivery Of Macromolecular Drugs Based On The EPR Effect, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 3, 131–135, **2011**.
- [134] V. P. Torchilin, Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives, *Pharmaceutical Research*, 24, 1, 1–16, **2006**.
- [135] H. Schlaad and R. Hoogenboom, Poly(2-oxazoline)s and Related Pseudo-Polypeptides, *Macromolecular Rapid Communications*, 33, 19, 1599–1599, **2012**.
- [136] N. Adams and U. S. Schubert, Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 15, 1504–1520, **2007**.
- [137] O. Sedlacek, B. D. Monnery, S. K. Filippov, R. Hoogenboom, and M. Hruby, Poly(2-Oxazoline)s-Are They More Advantageous for Biomedical Applications Than Other Polymers?, *Macromolecular Rapid Communications*, 33, 19, 1648–1662, **2012**.

- [138] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, and U. S. Schubert, Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives, *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 36, 6288–6308, **2010**.
- [139] J. K. Armstrong, G. Hempel, S. Koling, L. S. Chan, T. Fisher, H. J. Meiselman, and G. Garratty, Antibody Against Poly(Ethylene Glycol) Adversely Affects PEG-Asparaginase Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients, *Cancer*, 110, 1, 103–111, **2007**.
- [140] T. Tagami, K. Nakamura, T. Shimizu, N. Yamazaki, T. Ishida, and H. Kiwada, CpG Motifs in pDNA-sequences Increase Anti-PEG IgM Production Induced By PEG-Coated pDNA-Lipoplexes, *Journal of Controlled Release*, 142, 2, 160–166, **2010**.
- [141] T. Suzuki, M. Ichihara, K. Hyodo, E. Yamamoto, T. Ishida, H. Kiwada, H. Ishihara, and H. Kikuchi, Accelerated Blood Clearance Of Pegylated Liposomes Containing Doxorubicin Upon Repeated Administration To Dogs, *International Journal of Pharmaceutics*, 436, 1–2, 636–643, **2012**.
- [142] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, and G. M. Whitesides, A Survey Of Structure-Property Relationships Of Surfaces That Resist The Adsorption Of Protein, *Langmuir*, 17, 18, 5605–5620, **2001**.
- [143] Y. Arima, M. Toda, and H. Iwata, Complement Activation On Surfaces Modified With Ethylene Glycol Units, *Biomaterials*, 29, 5, 551–560, **2008**.
- [144] Z. He, J. Liu, and L. Du, The Unexpected Effect Of Pegylated Gold Nanoparticles On The Primary Function Of Erythrocytes, *Nanoscale*, 6, 15, 9017–9024, **2014**.
- [145] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, and M. J. Vicent, Overcoming The PEG-Addiction: Well-Defined Alternatives To PEG, From Structure–Property Relationships To Better Defined Therapeutics, *Polymer Chemistry*, 2, 9, 1900, **2011**.
- [146] M. Bauer, C. Lautenschlaeger, K. Kempe, L. Tauhardt, U. S. Schubert, and D. Fischer, Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) As Alternative For The Stealth Polymer Poly(Ethylene Glycol): Comparison Of in Vitro Cytotoxicity And Hemocompatibility, *Macromolecular Bioscience*, 12, 7, 986–998, **2012**.
- [147] V. R. de la Rosa, Poly(2-Oxazoline)s As Materials For Biomedical Applications, *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 25, 5, 1211–1225, **2014**.
- [148] R. Hoogenboom and H. Schlaad, Bioinspired Poly(2-oxazoline)s, *Polymers (Basel)*, 3, 1, 467–488, **2011**.
- [149] H. Schlaad, C. Diehl, A. Gress, M. Meyer, A. L. Demirel, Y. Nur, and A. Bertin, Poly(2-oxazoline)s as Smart Bioinspired Polymers, *Macromolecular Rapid Communications*, 31, 6, 511–525, **2010**.
- [150] R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, and R. Jordan, Poly(2-oxazoline)s as Polymer Therapeutics, *Macromolecular Rapid Communications*, 33, 19, 1613–1631, **2012**.
- [151] V. R. De La Rosa, A. Van Den Bulcke, and R. Hoogenboom, Poly(2-oxazoline)s: the Versatile Polymer Platform for Biomedicine, *Material Matters, Aldrich*, 11, 3, 75–78, **2016**.

- [152] R. Hoogenboom and H. Schlaad, Thermoresponsive Poly(2-Oxazoline)S, Polypeptoids, And Polypeptides, *Polymer Chemistry*, 8, 1, 24–40, **2017**.
- [153] R. Luxenhofer and R. Jordan, “Poly(2-oxazoline)s (POx) in Biomedical Applications,” *Material Matters, Aldrich*, 8, 3, 70, **2016**.
- [154] S. Zalipsky, C. B. Hansen, J. M. Oaks, and T. M. Allen, Evaluation of Blood Clearance Rates and Biodistribution of Poly(2-oxazoline)-Grafted Liposomes, *Journal of Pharmaceutical Science*, 85, 2, 133–137, **1996**.
- [155] R. Konradi, B. Pidhatika, A. Mühlebach, and M. Textor, Poly-2-methyl-2-oxazoline: A Peptide-like Polymer for Protein-Repellent Surfaces, *Langmuir*, 24, 3, 613–616, **2008**.
- [156] J. Kronek, Z. Kroneková, J. Lustoň, E. Paulovičová, L. Paulovičová, and B. Mendrek, In Vitro Bio-Immunochemical And Cytotoxicity Studies Of Poly(2-Oxazolines), *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 22, 7, 1725–1734, **2011**.
- [157] Serina Therapeutics, <http://www.serinatherapeutics.com/> (Temmuz, 2018).
- [158] K. Kempe, A. Vollrath, H. W. Schaefer, T. G. Poehlmann, C. Biskup, R. Hoogenboom, S. Hornig, and U. S. Schubert, Multifunctional Poly(2-oxazoline) Nanoparticles for Biological Applications, *Macromolecular Rapid Communications*, 31, 21, 1869–1873, **2010**.
- [159] H. P. C. Van Kuringen, J. Lenoir, E. Adriaens, J. Bender, B. G. De Geest, and R. Hoogenboom, Partial Hydrolysis of Poly(2-ethyl-2-oxazoline) and Potential Implications for Biomedical Applications?, *Macromolecular Bioscience*, 12, 8, 1114–1123, **2012**.
- [160] S. Cheon Lee, C. Kim, I. Chan Kwon, H. Chung, and S. Young Jeong, Polymeric Micelles Of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)-Block-Poly(Epsilon-Caprolactone) Copolymer As A Carrier For Paclitaxel, *Journal of Controlled Release*, 89, 3, 437–46, **2003**.
- [161] X. Wang, X. Li, Y. Li, Y. Zhou, C. Fan, W. Li, S. Ma, Y. Fan, Y. Huang, N. Li, and Y. Liu, Synthesis, Characterization And Biocompatibility Of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)-Poly(D,L-Lactide)-Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) Hydrogels, *Acta Biomaterials*, 7, 12, 4149–4159, **2011**.
- [162] C.-H. Wang, Y.-S. Hwang, P.-R. Chiang, C.-R. Shen, W.-H. Hong, and G.-H. Hsiue, Extended Release of Bevacizumab by Thermosensitive Biodegradable and Biocompatible Hydrogel, *Biomacromolecules*, 13, 1, 40–48, **2012**.
- [163] T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizman, R. Weimer, A. Mero, G. Pasut, and F. M. Veronese, Polyoxazoline: Chemistry, Properties, and Applications in Drug Delivery, *Bioconjugate in Chemistry*, 22, 5, 976–986, **2011**.
- [164] R. Luxenhofer, A. Schulz, C. Roques, S. Li, T. K. Bronich, E. V. Batrakova, R. Jordan, and A. V. Kabanov, Doubly Amphiphilic Poly(2-Oxazoline)s As High-Capacity Delivery Systems For Hydrophobic Drugs, *Biomaterials*, 31, 18, 4972–4979, **2010**.
- [165] B. Pidhatika, M. Rodenstein, Y. Chen, E. Rakhmatullina, A. Mühlebach, C. Acikgöz, M. Textor, and R. Konradi, Comparative Stability Studies of Poly(2-methyl-2-oxazoline) and Poly(ethylene glycol) Brush Coatings, *Biointerphases*,

7, 1, 1–4, **2012**.

- [166] F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, and M. Essler, Synthesis, Biodistribution And Excretion Of Radiolabeled Poly(2-Alkyl-2-Oxazoline)s, *Journal of Controlled Release*, 119, 3, 291–300, **2007**.
- [167] L.-Y. Qiu, L. Yan, L. Zhang, Y.-M. Jin, and Q.-H. Zhao, Folate-Modified Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) As Hydrophilic Corona in Polymeric Micelles For Enhanced Intracellular Doxorubicin Delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 456, 2, 315–24, **2013**.
- [168] L. Yan and L. Qiu, Indocyanine Green Targeted Micelles With Improved Stability For Near-Infrared Image-Guided Photothermal Tumor Therapy, *Nanomedicine*, 10, 3, 361–373, **2015**.
- [169] Y. Gao, C. Zhang, Y. Zhou, J. Li, L. Zhao, Y. Li, Y. Liu, and X. Li, Endosomal pH-Responsive Polymer-Based Dual-Ligand-Modified Micellar Nanoparticles for Tumor Targeted Delivery and Facilitated Intracellular Release of Paclitaxel, *Pharmaceutical Research*, 32, 2649–62, **2015**.
- [170] Z. He, A. Schulz, X. Wan, J. Seitz, H. Bludau, D. Y. Alakhova, D. B. Darr, C. M. Perou, R. Jordan, I. Ojima, A. V. Kabanov, and R. Luxenhofer, Poly(2-oxazoline) Based Micelles With High Capacity For 3rd Generation Taxoids: Preparation, *in vitro* and *in vivo* Evaluation, *Journal of Controlled Release*, 208, 67–75, **2015**.
- [171] C.-H. Wang, W.-T. Wang, and G.-H. Hsiue, Development Of Polyion Complex Micelles For Encapsulating And Delivering Amphotericin B, *Biomaterials*, 30, 19, 3352–3358, **2009**.
- [172] M. Thomas, J. J. Lu, Q. Ge, C. Zhang, J. Chen, and A. M. Klibanov, Full Deacylation Of Polyethylenimine Dramatically Boosts Its Gene Delivery Efficiency And Specificity To Mouse Lung, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 16, 5679–5684, **2005**.
- [173] G.-H. Hsiue, H.-Z. Chiang, C.-H. Wang, and T.-M. Juang, Nonviral Gene Carriers Based on Diblock Copolymers of Poly(2-ethyl-2-oxazoline) and Linear Polyethylenimine, *Bioconjugate Chemistry*, 17, 3, 781–786, **2006**.
- [174] Z. Zhong, J. Feijen, M. C. Lok, W. E. Hennink, L. V. Christensen, J. W. Yockman, Y.-H. Kim, and S. W. Kim, Low Molecular Weight Linear Polyethylenimine-B-Poly(Ethylene Glycol)-B-Polyethylenimine Triblock Copolymers: Synthesis, Characterization, And *in Vitro* Gene Transfer Properties, *Biomacromolecules*, 6, 6, 3440–3448, **2005**.
- [175] B. Brissault, A. Kichler, C. Leborgne, O. Danos, H. Cheradame, J. Gau, L. Auvray, and C. Guis, Synthesis, Characterization, and Gene Transfer Application of Poly(ethylene glycol- b -ethylenimine) with High Molar Mass Polyamine Block, *Biomacromolecules*, 7, 10, 2863–2870, **2006**.
- [176] S. Bauhuber, R. Liebl, L. Tomasetti, R. Rachel, A. Goepferich, and M. Breunig, A Library Of Strictly Linear Poly(Ethylene Glycol)–Poly(Ethylene Imine) Diblock Copolymers To Perform Structure–Function Relationship Of Non-Viral Gene Carriers, *Journal of Controlled Release*, 162, 2, 446–455, **2012**.
- [177] B. Brissault, A. Kichler, C. Leborgne, N. Jarroux, H. Cheradame, and C. Guis, Amphiphilic Poly[(propylene glycol)-block-(2-methyl-2-oxazoline)]

Copolymers for Gene Transfer in Skeletal Muscle, *ChemMedChem*, 2, 8, 1202–1207, **2007**.

- [178] T. von Erlach, S. Zwicker, B. Pidhatika, R. Konradi, M. Textor, H. Hall, and T. Lühmann, Formation And Characterization Of DNA-Polymer-Condensates Based On Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) Grafted Poly(L-Lysine) For Non-Viral Delivery Of Therapeutic DNA, *Biomaterials*, 32, 22, 5291–5303, **2011**.
- [179] V. M. Gaspar, C. Gonçalves, D. De Melo-Diogo, E. C. Costa, J. a. Queiroz, C. Pichon, F. Sousa, and I. J. Correia, Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)-PLA-G-PEI Amphiphilic Triblock Micelles For Co-Delivery Of Minicircle DNA And Chemotherapeutics, *Journal of Controlled Release*, 189, 90–104, **2014**.
- [180] V. M. Gaspar, P. Baril, E. C. Costa, D. De Melo-Diogo, F. Foucher, J. A. Queiroz, F. Sousa, C. Pichon, and I. J. Correia, Bioeducible Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)-PLA-PEI-SS Triblock Copolymer Micelles For Co-Delivery Of DNA Minicircles And Doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, 213, 175–191, **2015**.
- [181] Addgene, [https://www.addgene.org/vector-database/2489/\(Temmuz, 2018\)](https://www.addgene.org/vector-database/2489/(Temmuz, 2018)).
- [182] Addgene, [https://www.addgene.org/10952/\(Temmuz, 2018\)](https://www.addgene.org/10952/(Temmuz, 2018)).
- [183] S. Gulyuz, U. U. Ozkose, P. Kocak, D. Telci, O. Yilmaz, and M. A. Tasdelen, In-Vitro Cytotoxic Activities Of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)-Based Amphiphilic Block Copolymers Prepared By CuAAc Click Chemistry, *Express Polymer Letters*, 12, 2, 146–158, **2018**.
- [184] A. Kara, N. Ozturk, G. Esendagli, U. U. Ozkose, S. Gulyuz, O. Yilmaz, D. Telci, A. Bozkir, and I. Vural, Development Of Novel Self-Assembled Polymeric Micelles From Partially Hydrolysed Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)- Co -PEI-B-PCL Block Copolymer As Non-Viral Vectors For Plasmid DNA *In Vitro* Transfection, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 1–10, **2018**.
- [185] C. Kim, S. C. Lee, I. C. Kwon, H. Chung, and S. Y. Jeong, Complexation of Poly(2-ethyl-2-oxazoline)- block -poly(ϵ -caprolactone) Micelles with Multifunctional Carboxylic Acids, *Macromolecules*, 35, 1, 193–200, **2002**.
- [186] Y. Gao, Y. Li, Y. Li, L. Yuan, Y. Zhou, J. Li, L. Zhao, C. Zhang, X. Li, and Y. Liu, PSMA-Mediated Endosome Escape-Accelerating Polymeric Micelles For Targeted Therapy Of Prostate Cancer And The Real Time Tracing Of Their Intracellular Trafficking, *Nanoscale*, 7, 2, 597–612, **2015**.
- [187] V. M. Gaspar, E. C. Costa, J. A. Queiroz, C. Pichon, F. Sousa, and I. J. Correia, Folate-Targeted Multifunctional Amino Acid-Chitosan Nanoparticles for Improved Cancer Therapy, *Pharmaceutical Research*, 32, 2, 562–577, **2015**.
- [188] M. Wilhelm, C. Le Zhao, Y. Wang, R. Xu, M. A. Winnik, J. L. Mura, G. Riess, and M. D. Croucher, Poly(Styrene-Ethylene Oxide) Block Copolymer Micelle Formation In Water: A Fluorescence Probe Study, *Macromolecules*, 24, 5, 1033–1040, **1991**.
- [189] C. Sarisozen, I. Vural, T. Levchenko, A. A. Hincal, and V. P. Torchilin, Long-Circulating PEG-PE Micelles Co-Loaded With Paclitaxel And Elacridar (GG918) Overcome Multidrug Resistance, *Drug Delivery*, 19, 8, 363–370, **2012**.
- [190] M. Li, P. Pan, G. Shan, and Y. Bao, Thermoresponsive Poly(ϵ -Caprolactone)-Graft-Poly(N-Isopropylacrylamide) Graft Copolymers Prepared By A

Combination Of Ring-Opening Polymerization And Sequential Azide-Alkyne Click Chemistry, *Polymer International*, 64, 3, 389–396, **2015**.

- [191] R. Sharma, J.-S. Lee, R. C. Bettencourt, C. Xiao, S. F. Konieczny, and Y.-Y. Won, Effects of the Incorporation of a Hydrophobic Middle Block into a PEG–Polycation Diblock Copolymer on the Physicochemical and Cell Interaction Properties of the Polymer–DNA Complexes, *Biomacromolecules*, 9, 11, 3294–3307, **2008**.
- [192] M. Jafari, W. Xu, R. Pan, C. M. Sweeting, D. N. Karunaratne, and P. Chen, Serum Stability and Physicochemical Characterization of a Novel Amphipathic Peptide C6M1 for siRNA Delivery, *PLoS One*, 9, 5, e97797, 2014.
- [193] G. Temizkan, S. Yilmazer, M. Öztürk, Ş. Arı, H. Ertan, A. Sarıkaya Topal, and N. Arda, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Tıp Kitapevleri, **2004**.
- [194] J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2001**.
- [195] A. Carbone, F. M. Fioretti, L. Fucci, J. Ausió, and M. Piscopo, High Efficiency Method To Obtain Supercoiled DNA With A Commercial Plasmid Purification Kit, *Acta Biochimica Polonica*, 59, 2, 275–278, **2012**.
- [196] S. C. Lee, Y. Chang, J. Yoon, C. Kim, I. C. Kwon, Y. Kim, and S. Y. Jeong, Synthesis and Micellar Characterization of Amphiphilic Diblock Copolymers Based on Poly (2-ethyl-2-oxazoline) and Aliphatic Polyesters 1, *Macromolecules*, 32, 1847–1852, **1999**.
- [197] M. A. Tasdelen, Poly(epsilon-caprolactone)/Clay Nanocomposites Via ‘Click’ Chemistry, *European Polymer Journal*, 47, 5, 937–941, **2011**.
- [198] K. Lava, B. Verbraeken, and R. Hoogenboom, Poly(2-oxazoline)s and Click Chemistry: A Versatile Toolbox Toward Multi-Functional Polymers, *European Polymer Journal*, 65, 98–111, **2015**.
- [199] R. Luxenhofer and R. Jordan, Click Chemistry with Poly(2-oxazoline)s, *Macromolecules*, 39, 10, 3509–3516, **2006**.
- [200] S. Petrova, C. G. Venturini, A. Jäger, E. Jäger, M. Hrubý, E. Pavlova, and P. Štěpánek, Supramolecular Self-Assembly Of Novel Thermo-Responsive Double-Hydrophilic And Hydrophobic Y-Shaped [MPEO-b-PETox-b-(PCL)2] Terpolymers, *RSC Advances*, 5, 77, 62844–62854, **2015**.
- [201] V. R. de la Rosa, E. Bauwens, B. D. Monnery, B. G. De Geest, and R. Hoogenboom, Fast And Accurate Partial Hydrolysis Of Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) Into Tailored Linear Polyethylenimine Copolymers, *Polymer Chemistry*, 5, 17, 4957–4964, **2014**.
- [202] C. Park, M. Rhue, J. Lim, and C. Kim, Metal Nanoparticles in The Template Of poly(2-ethyl-2-oxazoline)-block-poly(ε-caprolactone) Micelle, *Macromolecular Research*, 15, 1, 39–43, **2007**.
- [203] A. R. Salgarella, A. Zahoranová, P. Šrámková, M. Majerčíková, E. Pavlova, R. Luxenhofer, J. Kronek, I. Lacík, and L. Ricotti, Investigation Of Drug Release Modulation From Poly(2-oxazoline) Micelles Through Ultrasound, *Scientific Reports*, 8, 1, 1–13, **2018**.

- [204] X. Ai, L. Zhong, H. Niu, and Z. He, Thin-Film Hydration Preparation Method And Stability Test Of DOX-Loaded Disulfide-Linked Polyethylene Glycol 5000-Lysine-Di-Tocopherol Succinate Nanomicelles, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9, 5, 244–250, **2014**.
- [205] Y. Hao, Y. Huang, Y. He, J. Peng, L. Chen, X. Hu, and Z. Qian, The Evaluation Of Cellular Uptake Efficiency And Tumor-Targeting Ability Of MPEG–PDLLA Micelles: Effect Of Particle Size, *RSC Advances*, 6, 17, 13698–13709, **2016**.
- [206] G. Navarro, J. Pan, and V. P. Torchilin, Micelle-like Nanoparticles as Carriers for DNA and siRNA, *Molecular Pharmaceutics*, 12, 2, 301–313, **2015**.
- [207] Q.-Q. Zhao, J.-L. Chen, T.-F. Lv, C.-X. He, G.-P. Tang, W.-Q. Liang, Y. Tabata, and J.-Q. Gao, N/P ratio Significantly Influences The Transfection Efficiency And Cytotoxicity Of A Polyethylenimine/Chitosan/DNA Complex, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32, 4, 706–10, **2009**.
- [208] J. Hao, X. Sha, Y. Tang, Y. Jiang, Z. Zhang, W. Zhang, Y. Li, and X. Fang, Enhanced Transfection Of Polyplexes Based On Pluronic-Polypropylenimine Dendrimer For Gene Transfer, *Archives of Pharmacal Research*, 32, 7, 1045–1054, **2009**.
- [209] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, and C. Yin, Effects Of Particle Size And Surface Charge On Cellular Uptake And Biodistribution Of Polymeric Nanoparticles, *Biomaterials*, 31, 13, 3657–3666, **2010**.
- [210] S. Honary and F. Zahir, Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2), *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12, 2, **2013**.
- [211] Y. Li, J. Li, B. Chen, Q. Chen, G. Zhang, S. Liu, and Z. Ge, Polyplex Micelles with Thermoresponsive Heterogeneous Coronas for Prolonged Blood Retention and Promoted Gene Transfection, *Biomacromolecules*, 15, 8, 2914–2923, **2014**.
- [212] C. Sarisozen, *Kanser Tedavisinde Kullanılacak Aktif Hedeflendirilmiş Farmasötik Nanotaşıyıcılar*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.
- [213] W.-Q. Chen, H. Wei, S.-L. Li, J. Feng, J. Nie, X.-Z. Zhang, and R.-X. Zhuo, Fabrication Of Star-Shaped, Thermo-Sensitive Poly(N-Isopropylacrylamide)–Cholic Acid–Poly(ε-Caprolactone) Copolymers And Their Self-Assembled Micelles As Drug Carriers, *Polymer (Guildf)*, 49, 18, 3965–3972, **2008**.
- [214] M. Neu, D. Fischer, and T. Kissel, Recent Advances in Rational Gene Transfer Vector Design Based On Poly(Ethylene İmine) And İts Derivatives, *Journal of Gene Medicine*, 7, 8, 992–1009, **2005**.
- [215] J. Dai, S. Zou, Y. Pei, D. Cheng, H. Ai, and X. Shuai, Polyethylenimine-Grafted Copolymer Of Poly(L-Lysine) And Poly(Ethylene Glycol) For Gene Delivery, *Biomaterials*, 32, 6, 1694–1705, **2011**.
- [216] K. Yang, S. Li, S. Jin, X. Xue, T. Zhang, C. Zhang, J. Xu, and X.-J. Liang, Micelle-Like Luminescent Nanoparticles As A Visible Gene Delivery System With Reduced Toxicity, *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 42, 8394–8400, **2015**.
- [217] A. V Kabanov and V. Y. Alakhov, Pluronic Block Copolymers İn Drug Delivery: From Micellar Nanocontainers To Biological Response Modifiers,

Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 19, 1, 1–72, **2002**.

- [218] A. del Pozo-Rodríguez, D. Delgado, M. A. Solinís, A. R. Gascón, and J. L. Pedraz, Solid lipid nanoparticles: Formulation Factors Affecting Cell Transfection Capacity, *International Journal of Pharmaceutics*, 339, 1–2, 261–268, **2007**.
- [219] H. Akbaba, *Gen Tedavisi Amacıyla DNA Yüklü Katı Lipid Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2010**.
- [220] M. von Kockritz-Blickwede, O. A. Chow, and V. Nizet, Fetal Calf Serum Contains Heat-Stable Nucleases That Degrade Neutrophil Extracellular Traps, *Blood*, 114, 25, 5245–5246, **2009**.
- [221] G. B. Barra, T. H. Santa Rita, J. de A. Vasques, C. F. Chianca, L. F. A. Nery, and S. S. S. Costa, EDTA-Mediated Inhibition Of Dnases Protects Circulating Cell-Free DNA From Ex Vivo Degradation in Blood Samples, *Clinical Biochemistry*, 48, 15, 976–981, **2015**.
- [222] D. A. Spandidos, G. Ramandanis, J. Garas, and S. D. Kottaridis, Serum Deoxyribonucleases in Patients With Breast Cancer, *European Journal of Cancer*, 16, 12, 1615–1619, **1980**.
- [223] H. Bordelon, A. S. Biris, C. M. Sabliov, and W. Todd Monroe, Characterization Of Plasmid DNA Location Within Chitosan/PLGA/pDNA Nanoparticle Complexes Designed For Gene Delivery, *Journal of Nanomaterials*, 2011, 9, **2011**.
- [224] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, Factors Affecting The Clearance And Biodistribution Of Polymeric Nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, 5, 4, 505–515, **2008**.
- [225] S. Y. Lee, C. Y. Yang, C. L. Peng, M. F. Wei, K. C. Chen, C. J. Yao, and M. J. Shieh, A Theranostic Micelleplex Co-Delivering SN-38 And VEGF siRNA For Colorectal Cancer Therapy, *Biomaterials*, 86, 92–105, **2016**.
- [226] A. Mero, G. Pasut, L. D. Via, M. W. M. Fijten, U. S. Schubert, R. Hoogenboom, and F. M. Veronese, Synthesis And Characterization Of Poly(2-ethyl 2-oxazoline)-Conjugates With Proteins And Drugs: Suitable Alternatives To PEG-Conjugates?, *Journal of Controlled Release*, 125, 2, 87–95, **2008**.
- [227] R. P. C. Driessen, G. Sitters, N. Laurens, G. F. Moolenaar, G. J. L. Wuite, N. Goosen, and R. T. Dame, Effect Of Temperature On The Intrinsic Flexibility Of DNA And Its Interaction With Architectural Proteins, *Biochemistry*, 53, 41, 6430–6438, **2014**.
- [228] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, and T. Kissel, In Vitro Cytotoxicity Testing Of Polycations: Influence Of Polymer Structure On Cell Viability And Hemolysis, *Biomaterials*, 24, 7, 1121–31, **2003**.
- [229] C. M. Bowman, E. M. Berger, E. N. Butler, K. M. Toth, and J. E. Repine, Hepes May Stimulate Cultured Endothelial Cells To Make Growth-Retarding Oxygen Metabolites, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 21, 3, 140–142, **1985**.
- [230] C. A. Poole, H. C. Reilly, and M. H. Flint, The Adverse Effects Of HEPES, TES, And BES Zwitterion Buffers On The Ultrastructure Of Cultured Chick

- Embryo Epiphyseal Chondrocytes, *In Vitro*, 18, 9, 755–65, **1982**.
- [231] J. Akagi, M. Kordon, H. Zhao, A. Matuszek, J. Dobrucki, R. Errington, P. J. Smith, K. Takeda, Z. Darzynkiewicz, and D. Wlodkowic, Real-Time Cell Viability Assays Using A New Anthracycline Derivative DRAQ-7®, *Cytometry Part A*, 83A, 2, 227–234, **2013**.
- [232] Biostatus, DRAQ-7™ in FC-Based Apoptosis Assays, http://www.biostatus.com/site/biostatus/documents/DR7.APPNOTE_FLOW_APOPTOSIS_001_060814.pdf (Temmuz, **2018**).
- [233] S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton, and L. Tang, Nanomaterial Cytotoxicity Is Composition, Size, And Cell Type Dependent, *Part. Fibre Toxicology*, 7, 1, 22, **2010**.
- [234] D. Mishra, H. C. Kang, and Y. H. Bae, Reconstitutable Charged Polymeric (PLGA)₂-B-PEI Micelles For Gene Therapeutics Delivery, *Biomaterials*, 32, 15, 3845–3854, **2011**.
- [235] S. Shi, X. Zhu, Q. Guo, Y. Wang, T. Zuo, F. Luo, and Z. Qian, Self-Assembled Mpeg-PCL-G-PEI Micelles For Simultaneous Codelivery Of Chemotherapeutic Drugs And DNA: Synthesis And Characterization in vitro, *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1749–59, **2012**.
- [236] M. Zheng, Z. Zhong, L. Zhou, F. Meng, R. Peng, and Z. Zhong, Poly(ethylene oxide) Grafted with Short Polyethylenimine Gives DNA Polyplexes with Superior Colloidal Stability, Low Cytotoxicity, and Potent In Vitro Gene Transfection under Serum Conditions, *Biomacromolecules*, 13, 3, 881–888, **2012**.
- [237] K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt, and T. Kissel, Low-Molecular-Weight Polyethylenimine As A Non-Viral Vector For DNA Delivery: Comparison Of Physicochemical Properties, Transfection Efficiency And In Vivo Distribution With High-Molecular-Weight Polyethylenimine, *Journal of Controlled Release*, 89, 1, 113–25, **2003**.
- [238] Q. Peng, F. Chen, Z. Zhong, and R. Zhuo, Enhanced Gene Transfection Capability Of Polyethylenimine By Incorporating Boronic Acid Groups, *Chemical Communications*, 46, 32, 5888, **2010**.
- [239] H. Yin, F. Zhao, D. Zhang, and J. Li, Hyaluronic Acid Conjugated β -Cyclodextrin-Oligoethylenimine Star Polymer For CD44-Targeted Gene Delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 483, 1–2, 169–179, **2015**.
- [240] R. Lu and G. Serrero, Inhibition of PC Cell-Derived Growth Factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression By Antisense PCDGF cDNA transfection Inhibits Tumorigenicity Of The Human Breast Carcinoma Cell Line MDA-MB-468, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 8, 3993–8, **2000**.
- [241] A. Htb-, Breast Adenocarcinoma, 26, 1–25, **2012**.
- [242] Biostatus, DRAQ-7, <http://www.biostatus.com/DRAQ-7/> (Temmuz, **2018**).
- [243] S. Jiao, M. Wu, F. Ye, H. Tang, X. Xie, and X. Xie, BikDDA, A Mutant Of Bik With Longer Half-Life Expression Protein, Can Be A Novel Therapeutic Gene For Triple-Negative Breast Cancer, *PLoS One*, 9, 3, **2014**.

- [244] L. Polisenò, L. Bianchi, L. Citti, S. Liberatori, L. Mariani, A. Salvetti, M. Evangelista, L. Bini, V. Pallini, and G. Rainaldi, Bcl₂-Low-Expressing MCF7 Cells Undergo Necrosis Rather Than Apoptosis Upon Staurosporine Treatment, *Biochemical Journal*, 379, Pt 3, 823–32, **2004**.



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Aslı KARA
Doğum Yeri : Üsküdar/İstanbul-12.09.1987
Medeni Hali : Evli
E-posta : aslicaplikara@gmail.com
Adresi : Ulukavah mh. Adnanözejder cd. Özgürevler 2. Sk. ÇORUM

Eğitim

Lisans : Gazi Üniversitesi Çorum Fen Edebiyat Fakültesi-Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Hitit Üniversitesi FBE - Biyoloji ABD
Doktora : Hacettepe Üniversitesi FBE- Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- İyi derecede

İş Deneyimi

Hitit Üniversitesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi 2011-halen

Deneyim Alanları

Nanoteknoloji
Gen ve ilaç taşıyıcı sistemler
Gen tedavisi
Hücre kültürü

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

213M728 numaralı TÜBİTAK 1003 Projesi

Proje Adı: Prostat ve meme kanseri teşhis ve tedavisinde kullanılacak Poli (2-etil-2-oksazolin)(PEtOx) esaslı çok işlevsel taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi

Proje bütçesi: 156,520 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. **Kara A.**, Vural I., Yılmaz Ö., Bozkır, A. Gen taşınması için olası bir yaklaşım; Poli (2-oksazolin) tabanlı vektörler, Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy Volume 34 / Number 2 / July 2014 / 113-132 Received : 18.02.2015 Revised : 30.03.2015 Accepted : 02.07.2015
2. **Kara A.**, Ozturk N., Esendagli G., Ozkose U.U., Gulyuz S., Yilmaz O., Telci D., Bozkir A., Vural I. Development of novel self-assembled polymeric micelles from partially hydrolysed poly(2-ethyl-2-oxazoline)-co-PEI-b-PCL block copolymer as non-viral vectors for plasmid DNA *in vitro* transfection. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 2018. DOI:[10.1080/21691401.2018.1491478](https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1491478).

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı toplantılar

1. **Kara A.**, Ozturk N., Gulyuz S., Yilmaz Ö., Bozkir A., Vural I., The Effect Of Preparation Method On Size Of Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline)(PetOx)-b-Polycaprolactone (PCL) Polymeric Micelles. GPSS-Ankara-Poster sunumu-2-15 Kasım 2015.
2. Ozturk N., **Kara A.**, Ozkose, U.U, Yilmaz Ö., Bozkir A., Vural I., Polymeric Micelles Based On Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline) As Drug Carriers. GPSS-Ankara-Poster sunumu 12-15 Kasım 2015.
3. **Kara, A.**, Öztürk, N., Gulyuz, S., Ozkose, U.U., Vural, I, Yilmaz, O., Bozkır, A., Micellar characteristics of poly-(2-ethyl-2-oxazoline)-co-poly(ethylenimine)-block-poly(ϵ -caprolactone) (PEtOx-co-PEI-b-PCL) block copolymers of different hydrolysis degrees of PEtOx. *18th International Pharmaceutical Technology Symposium IPTS*. Antalya, Turkey, 246-247, 18-21 Eylül 2016.
4. **Kara, A.**, Öztürk, N., Ozkose, U.U., Bolat, Z.B., Yilmaz Ö., Telci, D., Bozkir A., Vural I, (2017). Evaluation Of Morphological And Physical Characteristics of Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline)-co-Poly(Ethylenimine)-block-Poly(ϵ -Caprolactone)(PEtOx-co PEI-b-PCL) Polymeric Micelle As A Gene Delivery Agent. AAPS 2017 National Biotechnology
5. **Kara, A.**, Öztürk, N., Esendağı, G., Bolat, Z.B., Gulyuz, S., Telci, D., Yilmaz Ö., Bozkir A., Vural I, (2107). Novel Polymeric Micelles Based On Poly-(2-Ethyl-2-Oxazoline)-co-Poly(ethylenimine)-block-Poly(ϵ -caprolactone) PEtOx-co-PEI-b-PCL Block Copolymer With Various Hydrolysis Degree to Evaluate The Effect Of Transfection Efficiency On MCF-7 Cells. AAPS 2017 National Biotechnology

EKLER

Gen taşınması için olası bir yaklaşım; Poli (2-oksazolin) tabanlı vektörler

Received : 18.02.2015

Revised : 30.03.2015

Accepted : 02.07.2015

Ash Kara^{*,}, İmran Vural^{*,}, Özgür Yılmaz^{***}, Asuman Bozkır^{****o}

Giriş

Sentetik polimerler taşıyıcı sistemler için umut verici materyaller olma yolunda hızla ilerlemektedir. Son zamanlarda biyomateryal olarak kullanılan çevresel şartlara duyarlı polimerlerin sentezi için oldukça yoğun bir ilgi bulunmaktadır. İstenilen kinyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip çeşitli polimer formülasyonları geliştirilmiştir. Bu özellikler pH, sıcaklık, ılgık ve iyonik güç gibi bir uyarıcının etkisine bağlı olarak etkin maddenin kontrollü salını için oldukça önemlidir. Bu bahsedilen özellikler polimerik materyallerin, etkin madde ve gen taşıma, biyomembran teknolojisi ve biyokataliz gibi biyomedikal uygulamalarda kullanımını için gereklidir. Polimerik materyalin biyouyumluluk ve immünotoksitesi, taşıyıcı sistemler için uygun materyallerin keşfedilmesi açısından önemli bir konudur¹. Polimer tabanlı kendiliğinden düzenlenen sistemler, etkin madde taşınması, ayırma teknolojileri, dağılım stabilizasyonu gibi geniş uygulama alanlarında gerekli çok moleküllü yapıların oluşumunda önemli bir ilerlemeyi temsil eder. Bu bağlamda, farklı taşıyıcı sistemler için uygun sentetik polimerlerin bir çeşidi olarak, 2-oksazolinler çok yönlü ve umut verici materyallerdir.

2-oksazolin tabanlı polimerler, fonksiyonel gruplar ile işlevselleştirilerek kendi alanlarında biyolojik ve medikal kullanım için önemli bir rol üstlenmekte birlikte özellikle biyolojik ve tıbbi olarak etkin ve genetik madde taşınması gibi temel uygulama alanlarında etkinlik göstermektedirler.

* Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çorum

** Hacettepe Üniversitesi İczacılık Fakültesi, Farmasözik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara

*** TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Malzeme Enstitüsü, Kocaeli

****Ankara Üniversitesi İczacılık Fakültesi, Farmasözik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara

^o Yazışma Yapılacak Tazar: Email: asticaglikara@gmail.com



Development of novel self-assembled polymeric micelles from partially hydrolysed poly(2-ethyl-2-oxazoline)-co-PEI-b-PCL block copolymer as non-viral vectors for plasmid DNA *in vitro* transfection

Asli Kara^{a,b}, Nalle Ozturk^c, Gunes Esendagli^d, Umut Ugur Ozkose^{e,f,g}, Sevgi Gulyuz^{h,i}, Ozgur Yilmaz^e, Dilek Telci^h , Asuman Bozkirⁱ and Imran Vural^c

^aDepartment of Biology, Faculty of Art and Science, Hitit University, Corum, Turkey; ^bDepartment of Nanotechnology and Nanomedicine, Hacettepe University Institute of Science, Ankara, Turkey; ^cDepartment of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey; ^dDepartment of Basic Oncology, Hacettepe University Cancer Institute, Ankara, Turkey; ^eMaterials Institute, Marmara Research Center, TUBITAK, Gebze, Turkey; ^fDepartment of Chemistry, Faculty of Science and Letters, Istanbul Technical University, Istanbul, Turkey; ^gDepartment of Chemistry, Faculty of Science and Letters, Piri Reis University, Istanbul, Turkey; ^hDepartment of Genetics and Bioengineering, Faculty of Engineering, Yeditepe University, Istanbul, Turkey; ⁱDepartment of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Ankara, Turkey

ABSTRACT

A new efficient, non-viral gene delivery cationic polymeric micellar system was developed by partial hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) (PEtOx) with two different hydrolysis percentages of PEtOx (30% and 60%) to reduce the disadvantages of the PEI. These self-assemble amphiphilic cationic micelles prepared from poly(2-ethyl-2-oxazoline)_{20%}-co-poly(ethyleneimine)-block-poly(ϵ -caprolactone) (PEtOx_{20%}-co-PEI-b-PCL) (PPP30) and poly(2-ethyl-2-oxazoline)_{40%}-co-poly(ethyleneimine)-block-poly(ϵ -caprolactone) (PEtOx_{40%}-co-PEI-b-PCL) (PPP60) block copolymers were successfully condensed with pEGFP-C3 plasmid DNA via electrostatic interactions to form micelle/DNA complexes with desirable particle sizes. All formulations showed low critical micelle concentration (CMC) values that means highly stable in serum containing medium. Polymeric micelles were also evaluated for their stability in the presence of serum and nuclease as well as cytotoxicity and transfection efficiency. All our results proved that our novel polymeric micellar system prepared by PPP60 block copolymer offer to be an efficient promising carrier for gene delivery applications. Moreover, these findings contribute to design and development of novel gene vectors with tunable and functionality features and also to reduce the cytotoxicity of PEI by partial hydrolysis of PEtOx an alternative synthesis method to produce linear PEI.

ARTICLE HISTORY

Received 9 April 2018
Revised 13 June 2018
Accepted 15 June 2018

KEYWORDS

Polymeric micelle; partial hydrolysis; PEtOx; non-viral gene delivery



Introduction

Gene therapy is a technique to transfer the genes into the nuclei of target cells to replace a mutated gene with a healthy copy. To perform the efficient gene delivery, it is necessary to develop specific gene carriers that can be safely used in humans and protect the DNA from nucleases. There are two approaches to deliver gene effectively to the target site [1]. In spite of high transfection efficiency of viral vectors, because of several intrinsic drawbacks including inherent immunogenicity, difficulties in repeated administrations, alternative nonviral gene delivery systems have become attractive

interest [2–4]. Among them, polymeric polycationic systems have recently attracted more attention with special role in various biomedical applications. Recently, polymeric micelles derived from block copolymers have gained interest as promising drug and gene delivery vehicles because of unique morphological behaviour and prolonged circulation [5]. Block copolymer micelles with hydrophobic block, hydrophilic block and cationic block can form self-assembly into a core-shell structure [6]. This structure serves complexation of negatively charged DNA with the cationic block to form complexes [7]. PEI is a widely studied polymer with ability to condense

THE EFFECT OF PREPARATION METHOD ON SIZE OF POLY (2-ETHYL-2-OXAZOLINE) (PEtOx)-b- POLYCAPROLACTONE (PCL) POLYMERIC MICELLES

Aslı Kara^{1,2}, Naila Ozturk¹, Sevgi Gulyuz³, Ozgur Yilmaz³, Asuman Bozkir⁴, Imran Vural⁴

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Sıhhiye, Ankara, Turkey

² The Institute of Science Department of Nanotechnology and Nanomedicine, Hacettepe University, 06000, Beytepe, Ankara, Turkey; Hitt University, Department of Biology, 19030, Corum, Turkey

³ TUBITAK Marmara Research Center, Materials Institute, 41470, Gebze, Kocaeli, Turkey

⁴ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Tandoğan, Ankara, Turkey

Poly (2-ethyl-2-oxazoline) (PEtOx) is a novel hydrophilic polymer [1]. PEtOx has similar biocompatibility and stealth function as PEG and it has also more advantage like chemical versatility, stability and pH sensitivity [2]. Micellar systems are an aggregate composed of amphiphilic block copolymer which formed a core-shell structure and good candidate for drug and gene delivery applications. Also the preparation technique is quite simple by using chemical and physical methods. Among these, dialysis and thin-film hydration methods are often used due to their simplicity and ability to yield low size and uniform particles [3]. In this study, we prepared blank PEtOx-b-PCL polymeric micelles by three methods as dialysis, self-assembly solvent evaporation and thin-film hydration method. We aimed to determine the effect of preparation method on micelle size, zeta potential and polydispersity index (PDI) to obtain optimum micelle formulation. We used PEtOx₄₆₉₀-b-PCL₂₂₉₀ copolymer with low molecular weight to investigate the optimum micelle formulations. The fresh resulting micelles were characterized for size, zeta potential and PDI. Results showed that optimum micelle formulation was obtained by dialysis method as 53.8±1.4 nm, -2.38 ± 0.28 mV and 0.39 ± 0.04 for size, zeta and PDI, respectively. Also, the results of thin film hydration method were obtained similar to dialysis method (71.2±0.2 nm, -1.27±0.85 mV and 0.19±0.01 for size, zeta and PDI, respectively). According to solvent evaporation method, results significantly higher than other methods, size 246.1±7.1 nm, zeta -11.6±0.42 mV, PDI, 0.38±0.05. As it was seen from the results, preparation methods considerably affect the micelle formulation. Thus, dialysis method was determined as an ideal method to prepare optimum PEtOx-b-PCL micelle formulation. These PEtOx-b-PCL micelles which have optimum size, are promising vehicles for gene and drug delivery and further research should be performed on these micellar systems. (This study was supported by TUBITAK research grant 213M728).

References

- [1] Victor R. de la Rosa, "Poly(2-oxazoline)s as materials for biomedical applications", *J Mater Sci: Mater Med.* (2014) 25:1211-1225
- [2] L. Yan and L. Qiu, "Indocyanine green targeted micelles with improved stability for near-infrared image-guided photothermal tumor therapy," *nanomedicine*, vol. 10, pp. 361–373, 2015.
- [3] X. Ai, L. Zhong, H. Niu, and Z. He, "Thin-film hydration preparation method and stability test of DOX-loaded disulfide-linked polyethylene glycol 5000-lysine- α -tocopherol succinate nanomicelles," *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 5, pp. 244–250, 2014.

POLYMERIC MICELLES BASED ON POLY (2-ETHYL-2-OXAZOLINE) AS DRUG CARRIERS

Nalle Ozturk¹, Aslı Kara^{1,2}, Umut Uğur Ozkoş³, Ozgur Yilmaz³,
Asuman Bozkır⁴, İmran Vural¹

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Sıhhiye, Ankara, Turkey

² The Institute of Science Department of Nanotechnology and Nanomedicine, Hacettepe University, 06500, Beytepe, Ankara, Turkey; Hitt University, Department of Biology, 19030, Corum, Turkey

³ TUBITAK Marmara Research Center, Materials Institute, 41470, Gebze, Kocaeli, Turkey

⁴ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ankara University, Tandoğan, Ankara, Turkey

Biocompatibility and stealth behavior are the reasons of recent popularity of poly(2-oxazoline)s in biomedical applications. Due to advantages such as the easy variation of the monomer composition and the introduction of side-chain functionalities, poly(2-oxazoline)s could be an alternative to polyethylene glycol (PEG) which is the gold standard for stealth behavior. Polymeric micellar systems formed from block copolymers have been studied as drug delivery systems especially for drug targeting of anticancer drugs. Block copolymers consisting poly(2-ethyl-2-oxazoline) (PEtOx) as hydrophilic segment and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) as hydrophobic segment are promising micellar carriers for drug and gene delivery. In this study, effect of the molecular weight of hydrophilic block on micelle size, zeta potential and polydispersity index (PDI) was investigated using solvent evaporation technique. PEtOx-b-PCL copolymers with two different molecular weights (PEtOx₇₄₀₀-b-PCL₁₅₀₀, PEtOx₉₄₀₀-b-PCL₁₅₀₀) were used for investigation of the properties of micelles.

Micelles were prepared by dissolving diblock copolymer in tetrahydrofuran (THF) and then adding to distilled water via dropping. THF was evaporated by using rotary evaporator. The resulting micelles were characterized for size, zeta potential and PDI. Effect of freeze-drying on micelle size, zeta potential and PDI was also investigated. Results showed that PEtOx₇₄₀₀-b-PCL₁₅₀₀ copolymer formed micelles with the average diameter 106.3 $\pm$ 1.2 nm and zeta potential -14.3 $\pm$ 0.6 mV, PDI 0.5 $\pm$ 0.0 and freeze-drying did not affect the average size. Micelles based on PEtOx₉₄₀₀-b-PCL₁₅₀₀ copolymer had average diameter 89.6 $\pm$ 2.1 nm, zeta potential -9.0 $\pm$ 0.5 mV, and PDI 0.4 $\pm$ 0.0. However, the size of freeze-dried micelles was increased by two-fold compared to freshly prepared ones. Our results indicated that PEtOx-b-PCL micelles have appropriate size and zeta-potential values for delivering of drug and genes. It was also found that molecular weight of hydrophilic block caused only a slight difference on these values. (This study was supported by TUBITAK research grant 213M728).

References

- [1] R. Hoogenboom, Poly(2-oxazoline)s: A polymer class with numerous potential applications, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 48, 7978-7994, 2009.

Quick Search:
All Fields

Advanced Search

BROWSE

Browse Collection:

NBC 2017

Kara, Asli

Displaying 1 - 2 of 2

Display: 25

Title

- Authors
- Authors
- A
- B
- C
- D
- E
- F
- G
- H
- I
- J
- K
- L
- M
- N
- O
- P
- Q
- R
- S
- T
- U
- V
- W
- X
- Y
- Z
- Affiliations

Evaluation of Morphological and Physical Characteristics of Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline)-co-Poly(Ethyleneimine)-block-Poly(ϵ -Caprolactone) (PEtOx-co-PEI-b-PCL) Polymeric Micelle as a Gene Delivery Agent

Abstract: Purpose In this study we aimed to prepare new polymeric micellar system to evaluate the efficiency as a gene delivery agent by using Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline)-co-poly(ethyleneimine)-block-poly(ϵ -caprolactone) PEtOx-co-PEI-b-PCL block copolymers which obtained by partially hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). For this purpose, characterization studies, stability studies (DNase I nuclease stability and physical stability) and gene entrapment efficiency of PEtOx-co-PEI-b-PCL micelles were evaluated successfully. Methods Initially, PEtOx-co-PEI copolymer was synthesized by partially hydrolysis of PEtOx including 30% hydrolysis percentage of PEI and then PCL was blocked to copolymer by click chemistry by the team of TUBITAK (Gebze, Turkey). PEtOx7300(%70)-co-PEI1500(%30)-b-PCL2500 (PPP30) polymeric micelles were prepared by thin film hydration method. Micelle-plasmid DNA (pEGFP-C3) complexes were prepared by mixing the various diluted micelle solution with fixed amount of DNA at different N/P ratios. Size, zeta potential and polydispersity index of blank micelles and micelle DNA complexes were determined by dynamic light scattering method (Malvern® Zetasizer). Gene entrapment efficiency of micelles was determined by gel retardation assay in agarose gel electrophoresis. The stability of designed complexes were tested for DNase-I nuclease assay. Also physical stability of designed complexes was evaluated. Morphological characterization of blank micelles and selected micelle-DNA complexes were analyzed by Transmission electron microscopy (TEM). Results The results showed that blank micelles have ideal size as 81.6±0.3 nm with a zeta potential and polydispersity index. Micelle-DNA complex formation of different N/P ratios were determined by agarose gel electrophoresis. According to gel retardation assay selected N/P ratios displayed a size in the range of 134.4±2.6, 132.4±2.2, 119.2±2.7, and 123.3±8.3 nm. The results exhibited that high N/P ratios showed low particle size. The stability results of selected N/P ratios showed that these micelle formulations resistant to the DNase-I degradation. No major differences observed for physical stability results. TEM results showed that micelle formulations exhibited smaller size compared with dynamic light scattering results. This is attributed to reduction of the size depending on the drying of the samples during preparation. Conclusion The results demonstrated that our new polymeric micellar system showed ideal size and polydispersity index with high stability to nuclease enzymes and protect physical stability. These micelle DNA complex system might be potential not for only plasmid DNA but also therapeutic gene delivery agent for further experiments.

Authors: Kara, Asli, Ozturk, Nalile, Ozkose, Umut, Bolat, Zeynep, Yilmaz, Ozgur, Telci, Dilek, Bozkir, Asuman, Vural, Imran

Affiliations: Hitit University, Hacettepe University, Tubitak Marmara Research Center, Yeditepe University, Ankara University

Poster Number: T2020

[NBC17-T2020.pdf](#)

Novel Polymeric Micelles Based on Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline)-co-Poly(Ethyleneimine)-block-Poly(ϵ -Caprolactone) PEtOx-co-PEI-b-PCL Block Copolymer with Various Hydrolysis Degree to Evaluate the Effect of Transfection Efficiency on MCF-7 Cells

Abstract: Purpose The purpose of the present study was to prepare novel Poly (2-Ethyl-2-Oxazoline)-co-Poly(Ethyleneimine)-block-Poly(ϵ -caprolactone) PEtOx-co-PEI-b-PCL block copolymer micelle formulations which included two different hydrolysis degree of PEI and to evaluate the effect on transfection efficiency by comparing the two different hydrolysis degree (%30 and %60) of polymeric micelles. Methods PEtOx polymers including two different hydrolysis degree of PEtOx (PEtOx7300(%70)-co-PEI-1500(%30)-b-PCL2500(PPP30) and (PEtOx 2700(%40)-co-PEI4100(%60)-b-PCL2500) (PPP60) were used to prepare polymeric micelles. Polymeric micelles were prepared by thin film hydration method. Micelle-plasmid DNA (pEGFP-C3) complexes were prepared and used for characterization and transfection studies. Size, zeta potential and polydispersity index of micelle DNA complexes were determined by dynamic light scattering method (Malvern® Zetasizer). In vitro cytotoxicity and transfection efficiency studies of two micelle-DNA complex formulation were analyzed by flow cytometry (FACS Aria II, Becton-Dickinson, NJ, USA). The density of 1x10⁵ MCF-7 human breast adenocarcinoma cells were seeded into 24 well and incubated for 24 h at 37°C. At the end of the incubation time two different hydrolysis degrees of micelle formulations were added to each well that is not contain fetal bovine serum and incubated for 4 hours. After 4 hours serum was

**MICELLAR CHARACTERISTICS OF POLY-(2-ETHYL-2-OXAZOLINE)-*co*-
POLY(ETHYLENIMINE)- block-POLY(ϵ -CAPROLACTONE) (PEtOx-*co*-PEI-*b*-PCL)
BLOCK COPOLYMERS OF DIFFERENT HYDROLYSIS DEGREES OF PEtOx**

A. Kara^{1,2,3}, N. Öztürk¹, S. Gülyaz⁴, U.U. Özköse⁴, I. Vural¹, O. Yılmaz⁴, A. Bozkır²

¹Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology,
Ankara

²Hittit University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Çorum

³Hacettepe University, Institute of Science, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine, Ankara

⁴TUBITAK Marmara Research Center, Materials Institute, 41470, Gebze, Kocaeli

⁵Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology,
Ankara

INTRODUCTION

Poly (2-ethyl-2-oxazoline) (PEtOx) is a novel hydrophilic polymer with biocompatible and stealth functions. Due to advantages such as the easy variation of the monomer composition and the introduction of side-chain functionalities, poly(2-oxazoline)s could be an alternative to polyethylene glycol (PEG) which is the gold standard for stealth behavior (1). These features make the polymer effective for biological applications like drug and gene delivery studies. Poly (ethylensimine) (PEI) is a cationic, hydrophilic polymer with versatile functions like efficient vector for gene and oligonucleotide delivery for biomedical applications. In spite of high ability to bind the DNA, linear Poly (ethylensimine) (PEI) is not preferred because of the high cytotoxicity of a suitable source. Therefore, PEtOx-*co*-PEI which is obtained by partial hydrolysis of PEtOx, was efficient polymer because of low cytotoxicity (2). Polymeric micelles are composed of amphiphilic block copolymers which formed a core-shell structure and good candidates for drug and gene delivery applications (3). Block copolymers consisting Poly(2-ethyl-2-oxazoline) (PEtOx) as hydrophilic segment and poly (ϵ -caprolactone) (PCL) as hydrophobic segment are promising micellar carriers for drug and gene delivery.

In this study, PEtOx-*b*-PCL copolymer was partially hydrolyzed to obtain different hydrolysis degrees of PEtOx, including PEtOx-*co*-PEI-*b*-PCL block copolymer micelles with two different hydrolysis degrees (30% and 60%) of PEtOx were prepared by thin film hydration method to evaluate the effect of different hydrolysis degrees on micelle size, zeta potential and polydispersity index. PEtOx-*co*-PEI-*b*-PCL copolymers with two different hydrolysis degrees were used for investigation of the properties of micelles.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

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

Tarih: 10/09/2018

Tez Başlığı: **NANOBOYUTLU POLİMERİK MİSELLER SİSTEMLER İLE GEN TEDAVİSİNE YÖNELİK YAKLAŞIMLAR**
Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 184 sayfalık kısmına ilişkin, 10/09/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

10.09.2018

Adı Soyadı: ASLI KARA

Öğrenci No: N12140953

Anabilim Dalı: NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP

Programı: NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP

Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. İmran VURAL